



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Secretaría de Investigación y posgrado

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

Programa de Doctorado en Ciencias Químico-biológicas

**Identificación de los mecanismos moleculares del fenotipo Rh
negativo en sujetos del valle de México.**

Tesis Doctoral

**Que como uno de los requisitos para obtener el grado
de Doctor en Ciencias Químico-biológicas**

Presenta:

M en C. Héctor Alfredo Baptista González.

Directores de tesis:

Dr. Luis A. Jiménez Zamudio.

Dra. Elba Reyes Maldonado.

México D.F., Diciembre 2008.

**Este trabajo se desarrolló con financiamiento de fondos federales aportados por el
Instituto Nacional de Perinatología en el Proyecto**

**“Identificación de los fenotipos poco frecuentes del sistema Rh en sujetos del Valle de
México y creación de un Banco de ADN”, número 07241-319.**

**A la Fundación Clínica Médica Sur por el apoyo en la realización de estudios de
inmunoematología.**

Si la gratitud es en silencio, no sirve a nadie...

En reconocimiento al compromiso, esfuerzo, dedicación e inteligencia de quienes, al avanzar en este paso más, le han dado un valor real y distinto a la amistad...

Para la compañera de mi vida: Lulú.

Para mis hijos: Cris y Diana y los recién llegados Janis y Pino.

Al Instituto Nacional de Perinatología, que generó el espacio y recursos necesarios, siendo nuestra razón de ser y actuar profesional las mamás y sus hijos que ahí se atienden.

A la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional: Dra. Elba Reyes, Dr. Luis Jiménez Zamudio y Dra. Ethel García Latorre.

Del Laboratorio de Hematología Perinatal, a Fany por brindarme su apoyo e inteligencia, Carmen, Luisa, Maribel, Gina, Ivonne, Jazmín y muy especialmente a Rocío por su compromiso y entrega total a este proyecto.

De Médica Sur: Dr. Nahúm Méndez, a Dulce, Meche, Carmen e Isabel.

INDICE

Índice	i
Abreviaturas	ii
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iv
Resumen	v
Abstract	vii
I. Introducción	1
1. Antecedentes	1
2. Planteamiento del problema	8
3. Justificación	11
4. Objetivo e Hipótesis	11
II. Material y Métodos	12
1. Diseño del estudio	12
2. Selección de los sujetos de estudio y tamaño de la muestra	10
3. Recolección de datos	13
4. Desarrollo de las pruebas de laboratorio	13
5. Plan de análisis	21
6. Aspectos éticos	21
III. Resultados	23
1. Descripción fenotípica de la población evaluada	19
2. Descripción fenotípica en la muestra de estudio	23
3. Estimación de la frecuencia alélica	26
4. Resultados de la estrategia molecular sobre el mecanismo de generación de la condición Rh negativo	26
IV. Discusión	34
V. Conclusiones	43
VI. Bibliografía	45

Abreviaturas

Anti-IgG	Anticuerpos dirigidos contra la fracción gama de los anticuerpos
Del/Del	Condición homocigota para la delección del gen RHD
Del/ RHD ψ	Condición de heterocigoto para la delección del gen RHD y pseudogen RHD ψ .
D/H	Condición de heterocigoto para la delección del gen RHD y mecanismo híbrido del gen RHD.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
D/H	Condición homocigota para los alelos híbridos del gen RHD.
RHD ψ /H	Condición de heterocigoto para la formación pseudogen RHD ψ y mecanismo híbrido del gen RHD.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Variabilidad de los antecedentes de los grupos étnicos primarios con mayor influencia, en diferentes áreas de la República Mexicana	12
Tabla 2	Distribución de frecuencias de los fenotipos a la condición de RhD, obtenidos para la población mexicana	13
Tabla 3	Combinación de mecanismos moleculares en sujetos Rh negativo.	22
Tabla 4	Frecuencia de los fenotipos del Sistema Rh en sujetos Rh negativo, de acuerdo al grupo ABO.	26
Tabla 5	Frecuencia de los fenotipos del Sistema Rh de los sujetos Rh negativo, por grupo ABO.	27
Tabla 6	Frecuencia alélica de los alelos C, c, E y e en sujetos Rh negativo.	28
Tabla 7	Fenotipo del sistema Rh y amplificación del exón 10 del gen RHD.	29
Tabla 8	Fenotipo del sistema Rh y amplificación del intrón 3 exón 4 del gen RHD.	29
Tabla 9	Fenotipo del sistema Rh y amplificación del exón 7 del gen RHD.	30
Tabla 10	Fenotipo del sistema Rh y amplificación de la caja híbrida del gen RHD.	32
Tabla 11	Distribución de resultados por la presencia de la caja híbrida y amplificación de las secuencias del exón 7 y exón 10 del gen RHD.	32
Tabla 12	Distribución del Fenotipo Rh de acuerdo al mecanismo molecular propuesto.	33
Tabla 13	Frecuencia alélica de los alelos C, c, E y e en sujetos Rh negativo.	34
Tabla 14	Comparación de frecuencias fenotípicas para individuos Rh positivo y Rh negativo.	37
Tabla 15	Frecuencia alélica en sujetos RhD negativo.	38
Tabla 16	Prevalencia de los principales mecanismos moleculares en sujetos Rh negativo	41

Resumen

Introducción. Las proteínas del sistema Rh revisten una especial importancia médica, antropológica y evolutiva. La condición Rh negativo, esta dada por la ausencia de la proteína RhD en la membrana del eritrocito. Los mecanismos mediante los cuales se pierde esta expresión están relacionados con diversos cambios moleculares en el gen RHD, que varían entre los distintos grupos étnicos.

Objetivo. Identificar los mecanismos moleculares dominantes en una muestra de sujetos residentes en el Valle de México.

Material y métodos. Se seleccionaron a donadores de sangre, pacientes y familiares Rh negativo, residentes en el Valle de México. En ADN leucocitario se elaboraron las estrategias para amplificar por PCR en tiempo real al exón 7, la región 3' no traducida del exón 10, la secuencia específica del pseudogen RHD ψ (intrón 3 y exón 4). Mediante amplificación convencional y corte con PstI, se identificaron los productos de PCR que reconocen a la caja RH híbrida.

Resultados. Se incluyeron las muestras de 216 sujetos Rh negativo, con frecuencia haplotípica variable en *ccdee* (179/82.8 %), *ccdEe* (7/3.2 %), *Ccdee* (25/11.6 %), *CcdEe* (4/1.9 %) y *CCdEE* (1/0.5 %). La frecuencia génica de la delección del gen RHD fue del 0.870, para genes RHD híbridos fue del 0.032 y mecanismos combinados (delección e híbrido) del 0.098, sin encontrarse casos por la formación del pseudogen RHD ψ . La frecuencia alélica para la caja híbrida fue 0.887 y de 0.113 para los alelos híbridos.

Conclusiones. El haplotipo *cde*, al igual que los fenotipos del sistema Rh reportados en otras series, es el de mayor ocurrencia en nuestra muestra. El mecanismo molecular principal mediante el cual se genera la condición Rh negativo en la muestra de sujetos evaluados es por la delección del gen *RHD*. Contrario a nuestra hipótesis de trabajo, los mecanismos mixtos en la formación de genes híbridos del *RHD*, ocuparon el segundo lugar en frecuencia y no se identificó ningún caso con el mecanismo molecular del pseudogen *RHD ψ* . Se debe continuar con la búsqueda de otros mecanismos moleculares distintos al pseudogen RHD ψ , como es la presencia del alelo *r's*, en la población Rh negativo para sujetos no blancos, incluidos los mestizo-mexicanos con amplia variabilidad en la mezcla génica como la nuestra.

Summary

Introduction. Proteins of RhD system have a special medical, anthropological and evolutionary importance. Rh negative condition is given by the absence of RhD protein on the erythrocyte membrane. The mechanisms by which means this expression is lost are related to diverse molecular changes in RHD gene that vary depending on the different ethnic groups.

Objective. To identify the dominant molecular mechanisms in a sample of subjects residents in the Valley of Mexico.

Material and methods. We selected blood donors, patients and relatives Rh negative, inhabitants in the Valley of Mexico. We elaborated strategies to amplify through real time-PCR technique for exon 7; not translated region 3' exon 10, specific sequence of pseudo gene RHD ψ (intron 3 and exon 4). Through conventional amplification and restriction with PstI, we identified PCR products that recognize hybrid box RH.

Results. The samples of 216 negative Rh subjects were included, the haplotypic frequency was *ccdee* (179/82,8%), *ccdEe* (7/3,2%), *Ccdee* (25/11,6%), *CcdEe* (4/1,9%) and *CCdEE* (1/0,5%). The gene frequency of the deletion of RHD gene was 0,870, and 0.032 for hybrid genes RHD and 0.098 for combined mechanisms (deletion and hybrid). We collected no reported cases of formation of pseudo gene RHD ψ . The allelic frequency for RHD hybrid box was 0,887 and of 0,113 for the hybrid alleles.

Conclusions. The *cde* haplotype, such as other series, is the most frequent occurrence in our population. The main molecular mechanism by Rh negative condition is generated by gene RHD deletion. In opposition to our hypothesis, the mixed mechanisms in the formation of RHD hybrid genes, occupied the second place in frequency and without identification of any case with molecular mechanism of pseudogen RHD ψ . We need to research other molecular mechanisms, different from pseudogen RHD ψ , like allele *r's*, In Rh negative nonwhite subjects, including the mestizo-Mexicans with wide variability in genetic mixture, the strategy study must be carefully designed to include diverse segments of RHD gene.

I. INTRODUCCION

1. ANTECEDENTES

El grupo sanguíneo del sistema Rh es uno de los sistemas eritrocitarios más complejos, pues a la fecha se han identificado al menos 48 antígenos. Esta variabilidad antigénica no está representada por la diversidad serológica. Existen únicamente dos genes, aquel que codifica para la proteína RhD, llamado gen RHD y el gen RCE, que se encarga de codificar a las proteínas C, c, E y e (Wagner et al, 2004).

1.1 Genes del sistema RHD.

En 1991 (Colin Y et al 1991), se reportó la clonación de los dos genes del RH. Ya se ha descrito la secuencia completa de nucleótidos de los genes RHD y RHCE, así como del gen asociado RHAG. Los dos genes son altamente homólogos (97.8 %), mientras que el gen RHAG tiene una homología del 40 %. Los dos genes RH, son el RHD y el RHCE, cada uno está compuesto por 10 exones con una secuencia genómica de 60,000-69 000 pb. Codifican para una proteína de 417 aminoácidos y solamente difieren en cerca de 36 de ellos. Estos dos genes se ubican en el brazo corto del cromosoma 1, muestran orientación opuesta, enfrentados en su posición 3' y separados por el gen SMP1 de 30,000 pb, sin relación funcional con los genes RH. Todos los exones son menores de 200 pb, con excepción de los que son terminales 3' del RHD y SMP1 (figura 1).

El gen RHD, se localiza en la posición 1p34-36. Los exones 4, 5 y 6 son críticos para los epítopes: D1, D2, D5, D6-7 y D8. El gen RHCE, se localiza en la posición 1p34-36. Los exones 1 y 2 codifican la expresión Cc. El exón 5 codifica la expresión Ee. El gen RHD es un gen duplicado, mientras que el RHCE, debido a su proximidad a SMP1 es el gen ancestral. El gen RHD está flanqueado hacia ambos lados por dos segmentos de ADN de 9000 pb, llamados cajas Rhesus, con alta homología entre ellos (figura 1).

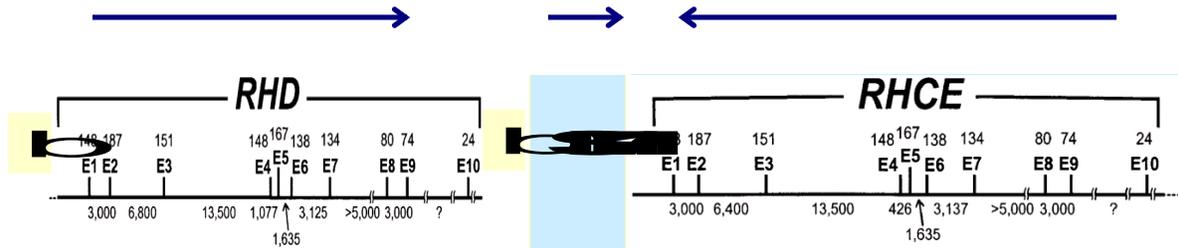


Figura 1. Organización de los genes RHD y RHCE.

El tamaño de los exones (letra E) se presenta por encima de la línea como número de nucleótidos. El tamaño del intrón está por debajo de la línea. La letra b, en tabla amarillo, identifica la región de las cajas (box Rh). SMP1, es el gen intermedio y no relacionado con RHD y RHCE. Las flechas señalan la orientación del gen (Wagner, Flegel, 2000).

1.2 Eventos moleculares que generan la condición de Rh negativo

La prevalencia de la condición Rh negativo, depende del origen étnico del sujeto bajo evaluación. En las personas Rh negativo de origen sajón, la delección del gen RHD es el mecanismo predominante, ya que < 1 % de los sujetos muestran variantes de gen híbrido. En sujetos de raza negra, predomina la formación del pseudogen RHD ψ (40-45 %), seguido de la delección del gen RHD (40 %) y por último, la formación de un gen híbrido *RHD-CE-D*, asociado al haplotipo *Cde* (< 10-15 %). En población de origen asiático, se incluyen multitud de variantes, como la delección del gen RHD (94 %), alelos *D_{el}*, *RHD (K409K)*, *Taiwán*, *RHD (delEx9)* y el alelo *RhD+* no expresado asociado a *RHD (G314V)*, entre otros alelos reportados (Daniels G, 2004).

La delección del RHD, es el mecanismo dominante en sujetos de origen caucásico. Es una condición homocigota con la ausencia del gen RHD (figura 2). El punto de ruptura se localiza en la región de las cajas del Rh (1463 pb) y se explica por un entrecruzamiento desigual con otros elementos de alta homología (THE-1B, L2 repetitivo).

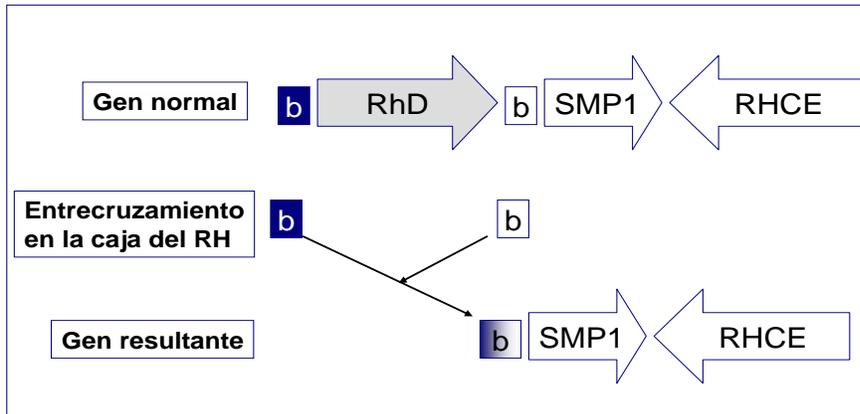


Figura 2. Mecanismo de delección del gen RHD.

Los sujetos RhD, muestran la presencia de la caja inicial y final (b), localizada en los extremos del gen RHD. Debido a su alta homología, ocurre el entrecruzamiento de ambas cajas, formando la caja híbrida, al inicio del marco de lectura. En la condición homocigota de ausencia del gen RHD, no se expresa el fenotipo RhD, denominándose al sujeto como Rh negativo (Wagner, Flegel, 2000).

El segundo mecanismo es por formación del pseudogen RHD ψ (Singleton, 2000), situación que predomina en sujetos de origen africano. Este mecanismo ocurre mediante la inserción de un fragmento de 37 pb de repetición entre los últimos 19 nucleótidos del intrón 3 y los primeros 18 nucleótidos del exón 4 del RHD, que da como resultado un codón de paro en el exón 6 al correr el marco de lectura (figura 3).

La formación del pseudogen RHD ψ (Singleton et al, 2000), se ha descrito hasta en el 30 % de los sujetos negro africanos con fenotipo Rh negativo y en aproximadamente el 24 % de los norteamericanos o sudamericanos (Rodríguez et al, 2002).



Figura 3. Inserción de un fragmento de 37 pb en la unión de intrón 3 y exón 4.
 Esta inserción genera un codón de paro en el exón 6 y varias mutaciones sin sentido. La expresión de la mutación genera una proteína RhD trunca que no se incorpora a membrana eritrocitaria (Singleton et al, 2000),

El tercer grupo de sujetos con fenotipo Rh negativo se origina por la formación de diversas variantes del gen híbrido, se proponen diversas opciones como es el gen híbrido RHD-CE-D (figura 4), el haplotipo: (C) ces o los fenotipos: VS, *cm c anormal*, e *anormal*, pero sin D.

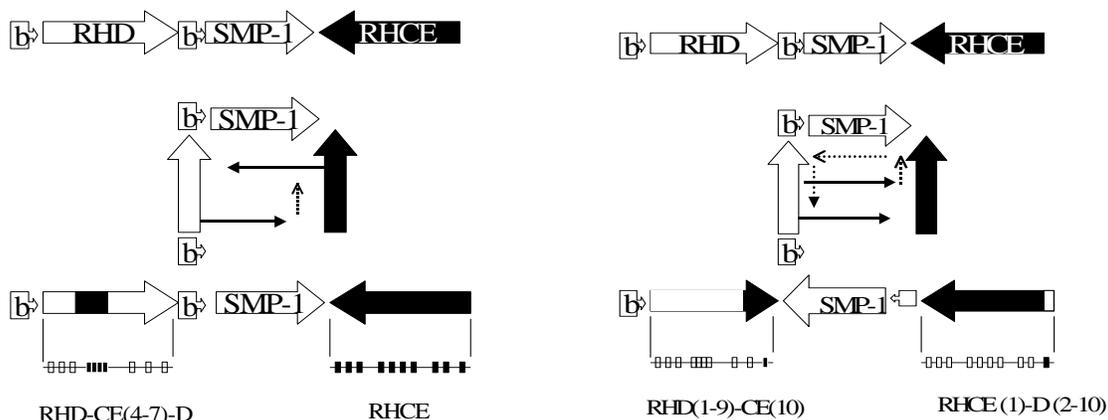


Figura 4. Conversión del gen en posición cis. Pérdida de la expresión del gen RHD por formación de haplotipos.

La proximidad de los segmentos homólogos en orientación idéntica, son reemplazados por los segmentos del otro gen y formar el haplotipo RHD-CE-D. Si la transcripción continúa en la misma plantilla errónea hasta SMP1, resulta en la conversión multigénica con haplotipos de dos alelos híbridos. (Wagne y, Flegel., 2000).

Una evidencia adicional sobre la diversidad étnica o poblacional de los mecanismos de generación de los sujetos Rh negativo, se documenta en los sujetos Rh negativo con pérdida de expresión del RhD de origen Japonés (Okuda et al, 1999). Se han descrito al menos dos mecanismos: La delección del gen RHD (94 %), ya descrita previamente en grupos sajones y la formación del alelo D negativo RhD positivo asociado a *RHD(G314V)*.

La presencia de la condición Rh positivo, es una característica de la población mesoamericana y aparece como una evidencia del mestizaje. Así la prevalencia más elevadas de la condición Rh negativo, se observa en aquellos núcleos poblaciones donde existe mayor evidencia de mezcla génica. Por el contrario, los sujetos Rh positivo son más prevalentes en poblaciones indígenas. En estos términos, la prevalencia del Rh negativo varía desde 0 al 3 % en la población mexicana (Grumbaum et al, 1980).

1.3 Frecuencia fenotípica de RhD y RhCcEe en población mexicana.

La población de nuestro México, muestra una amplia variabilidad regional en la mezcla génica. Los antecedentes predominantes son pertenecientes a los indígenas mesoamericanos, distintos a los norteamericanos o sudamericanos. En los últimos quinientos años, se agregó al flujo de genes provenientes de la colonización Europea, la negro-africana relacionada con los esclavos traídos a México y en menor medida, la de grupos orientales, especialmente chinos y japoneses (Tabla 1).

Tabla 1. Variabilidad de los antecedentes de los grupos étnicos primarios con mayor influencia, en diferentes áreas de la República Mexicana. (Lisker R, 1986, 1988 y 1990)*

Ubicación del grupo	Distribución de los antecedentes étnicos		
Evaluado	Negro-Africano	Indígena	Caucásico
León, Guanajuato.	0.084	0.513	0.413
Mérida, Yucatán	0.059	0.512	0.429
Oaxaca, Oaxaca	0.018	0.676	0.306
Saltillo, Coahuila	0.073	0.547	0.380
Puebla, Puebla	0.107	0.563	0.330
Ciudad de México	0.293	0.562	0.408
Promedio Nacional	0.106	0.562	0.377

*Frecuencia alélica.

Debido a esta variabilidad génica, se espera también que la frecuencia fenotípica de RhCcEe, sea dependiente de la mezcla poblacional. En nuestro país, se tiene un amplio historial acerca del estudio de los fenotipos Rh en diversos grupos poblacionales (Tiburcio V, 1978, Lisker R, 1980, Grunbaum BW, 1980. Long CJ, 1991). Sin embargo, en la práctica cotidiana de los bancos de sangre y servicios de medicina transfusional, se emplea como referente el reporte publicado en el año 1980 (Grunbaum et al, 1980) y está realizado en muestras obtenidas de donadores del banco de sangre del CMN del IMSS en la ciudad de México, los datos obtenidos pueden ser comparables también con donadores de sangre de la misma Ciudad de México, en muestras obtenidas más de 20

años después, donde ha ocurrido mayor mezcla génica debido a la migración interna. Estos resultados pueden compararse con los compilados por Lisker en 1980 y con los diferentes reportes de la población sajona de los Estados Unidos de Norteamérica e Inglaterra (tabla 2).

Estos son los estudios más amplios realizados en sujetos del Valle de México, donde las diferencias observadas parecen deberse a un efecto del tamaño muestral de las poblaciones comparadas.

Tabla 2. Distribución de frecuencias de los fenotipos de acuerdo a la condición de RhD, obtenidos para población Mexicana (Lisker, 1990. Tiburcio, 1978. Long, 1991. Duval 2007)*.

Autor Fenotipo	Tiburcio (n 43)	Grunbaum (n 42)	Lisker (n 8)	Long (n 49)	Duval (n 2559)
ccdee	0.930	0.761	1	0.918	0.925
CCdEE	--	0.095	0	--	0.001
ccdEe	0.023	0.048	0	--	0.022
Ccdee	0.047	0.048	0	0.082	0.046
CcdEe	--	--	--	--	0.005
ccdEE	--	0.048	--	--	<0.001
CCdee	--	--	--	--	<0.001

*Frecuencia alélica.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La condición de ser Rh positivo, se refiere a la existencia del antígeno RhD, que es una proteína que se pone de manifiesto generalmente mediante el empleo de un antisuero que lo reconoce. La ausencia de la reactividad con el antisuero anti-D, identifica a los eritrocitos de los sujetos como Rh negativo (Baptista-González et al, 1991).

El sistema eritrocitario Rh, es un conjunto de proteínas con afinidad bioquímica y genética. Este sistema está codificado por dos genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 1: el gen RHD y el gen RHCE. El gen RHD es el que se encarga de la codificación de la proteína RhD, mientras que el gen RHCE, de las proteínas RhC, Rhc, RhE y Rhe (Wagner & Flegel, 2004).

Los mecanismos moleculares que determinan la condición de Rh negativo se clasifican en tres grupos: a) delección del gen, que es el mecanismo más común y predomina en la población de origen caucásico. b) pérdida de la expresión con la formación del pseudogen RHD ψ , mecanismo predominante en la población de origen africano y c) un amplio grupo de diversas variedades de gen híbrido, presente en poblaciones orientales, pero también en distintos grupos étnicos.

Así, las combinaciones fenotípicas se modifican como resultado de la mezcla génica, y son efecto del intercambio de genes en la mezcla de las diversas poblaciones, que en nuestro caso conforman al grupo mestizo-mexicano. Estas diferencias, han permitido renovar el interés por describir los mecanismos moleculares del RhD y otros sistemas sanguíneos en diferentes grupos poblacionales, con grado variable de mestizaje, tal y como ocurre en nuestro medio.

En México, nuestro grupo de trabajo reportó la ausencia de amplificación del gen RHD en un grupo de sujetos Rh negativo como evidencia de la delección del gen (Baptista-González, 2005). Sin embargo, en este reporte no se incluyó el estudio de

otros mecanismos moleculares, lo que constituye un hueco en el conocimiento de la genética poblacional que se requiere subsanar.

3. JUSTIFICACIÓN.

La condición de ser Rh negativo en la población obstétrica del Instituto Nacional de Perinatología, así como la enfermedad derivada que es la isoimmunización materno fetal, permanecen dentro de los primeros 20 motivos de consulta de primera vez y subsiguiente. No es un problema menor en términos del impacto sobre la población obstétrica que se atiende en el Instituto.

La identificación de los diversos mecanismos moleculares mediante los cuales se genera la condición de Rh negativo en una población con alto grado de mestizaje, como lo es la ubicada en el Valle de México, nos permitirá establecer la referencia epidemiológica y antropológica de la manera como se generó esta condición. Esta información es útil para obtener el mapa genómico para el diseño y desarrollo de posteriores estudios genéticos poblacionales.

Pregunta de investigación:

¿Cuál es el mecanismo molecular predominante para generar la condición Rh negativo en residentes del valle de México?

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Hipótesis exploratoria

- El mecanismo molecular predominante para generar la condición Rh negativo, es mediante la deleción del gen RHD en más del 90 % de los casos, seguidos por la formación del pseudogen RHD ψ en cerca del 9 % de los casos y mediante la presencia de alelos híbridos del gen RHD en menos del 1 %.

Objetivo general:

- Identificar el mecanismo molecular prevalente que genera la condición Rh negativo en población mexicana.

Objetivos específicos:

1. Determinar el fenotipo del sistema Rh en las muestras de estudio.
2. Determinar el mecanismo molecular de la condición Rh negativo a través de la amplificación de: caja RH híbrida, pseudogen RHD Ψ , exón 7, región 3' no traducida del exón 10 del RhD

II. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Diseño Del Estudio.

Se desarrolló un diseño de estudio transversal, prospectivo, descriptivo y no experimental.

2. Selección de los sujetos de estudio y tamaño de la muestra.

Se seleccionaron mediante un modelo de muestreo no probabilístico discrecional a sujetos Rh negativo que fueron reclutados de diferentes fuentes: donadores de sangre de Medicina Transfusional y Banco de Sangre de Médica Sur, pacientes Rh negativo atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología.

Para estimar el tamaño de la muestra se consideró la prueba de la hipótesis para una proporción de población, se estimó un tamaño de la muestra de 203 sujetos Rh negativo, más 15 % de las muestras, para reponer las posibles pérdidas (manejo de muestra, extracción de ADN y otros).

Se incluyeron consecutivamente a los sujetos Rh negativo, independientemente de la condición de edad o género. Se excluyeron aquellos sujetos en quienes aplicaron los criterios de transfusión eritrocitaria reciente, antecedente de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, citopenia de origen inmunológico y exposición reciente a inmunosupresores. Se eliminaron las muestras donde la recolección de ADN leucocitario insuficiente o inadecuada.

Se registraron como variables de resultado al mecanismo molecular de generación de la condición RhD negativo (delección del gen, pseudogen RHD Ψ y genes híbridos). Como variable dependiente a la expresión fenotípica del RhD y como variables concurrentes a la condición del fenotipo RhCcEe.

3. Recolección de datos

A partir de la punción venosa, se recolectaron las muestras de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA. Los sujetos RhD negativo fueron reclutados de la Coordinación de Hematología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología y del servicio de Medicina Transfusional y Banco de Sangre del Hospital Médica Sur.

Se identificaron las muestras del banco de ADN mediante un número consecutivo para ser integradas al banco de muestras biológicas. Cada centro se encargó de identificar a sus candidatos, obtener el consentimiento bajo información, conservar en su poder tal documento.

4. Desarrollo de las pruebas de laboratorio.

Las muestras de sangre total conservadas en EDTA de los sujetos seleccionados, se enviaron a la Coordinación de Hematología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología para extracción y conservación de las muestras de ADN y desarrollo de las pruebas moleculares. La identificación del fenotipo de los sujetos de estudio se realizó en el servicio de Medicina Transfusional y Banco de Sangre del Hospital Médica Sur.

4.1 Identificación del antígeno D.

Para definir la condición del sujeto como Rh positivo o negativo, se procedió a la identificación del antígeno RhD, mediante el método de aglutinación en tubo empleando una mezcla de anticuerpos monoclonales contra el antígeno RhD (Immucor Gamma, Laboratorios Licon, S.A.) y se incluyó el control RhD (Control Rh-Hr Gamma clone, Immucor Gamma, Laboratorios Licon, S.A.), que es una matriz

proteica con la misma composición que el anti-D, pero sin anticuerpos. Cuando en la fase de salina rápida el resultado de la aglutinación resultó negativo, se procedió a llevar la muestra a la fase de la antiglobulina, empleando un reactivo comercial de Coombs (Anti-globulina humana anti-IgG+C3d, Immucor Gamma, Laboratorios Licon S.A.), que es una mezcla de anticuerpos murinos monoclonales dirigidos contra proteínas humanas en cantidades óptimas para detectar anti-IgG, anti-C3d y anti-C3b.

4.2 Identificación de los antígeno C, c, E y e.

Para la determinación de los antígenos C, c, E y e. Se emplearon anticuerpos específicos de origen monoclonal (Immucor Gamma, Laboratorios Licon S.A.) Anti-E, anti-e, anti-C y anti-c. La identificación de éstos antígenos se realizó mediante aglutinación en medio sólido o gel (Procesador DIANA).

4.3 Interpretación del fenotipo del Sistema Rh.

Una vez identificados los antígenos D, C, c, E y e, se procedió a determinar el fenotipo del sistema Rh, bajo la siguiente secuencia.

- a.- Considerando que el orden debe ser C c D/d E e, colocando siempre primero las letras mayúsculas en una secuencia de cinco posiciones (1 2 3 4 5).
- b.- En la tercera posición se anotó la letra D o d según corresponda, D o bien d).
- c.- Para el antígeno RhC negativo, se anotó la letra “c” en las posiciones 1 y 2 (c c); cuando fue positivo, se anotó la letra “C” en la posición 1 de la secuencia de cinco letras (C); cuando Rhc fue negativo y RhC positivo, se anotó “C” en la primera y segunda posición (C C) ; cuando ambos resultaron positivos, se anotaron en el orden recomendado, mayúsculas

primero (C c _ _ _). El resultado negativo para ambos antígenos, se registró con un guión en las posiciones 1 y 2 (— — _ _ _).

d.- Para el antígeno RhE negativo, se anotó “e” en las posiciones 4 y 5 (_ _ _ e e); para *RhE* positivo y *Rhe* negativo, se anotó “E” en las posiciones 4 y 5 (_ _ _ E E); para *RhE* y *Rhe* positivo, se anotó “Ee” (_ _ _ E e). El resultado negativo para ambos antígenos se registró con un guión en las posiciones 4 y 5 de la secuencia de cinco letras (_ _ _ — —).

e.- Se consultó la tabla de referencia para frecuencias fenotípicas y el diagrama de alelos del Rh.

f.- Para establecer la condición probable de cigocidad, se anotaron los dos haplotipos separados por una diagonal, en secuencia de tres letras (cde/cde), tomando en cuenta que:

- Si RhE es heterocigoto (Ee), se coloca “E” del mismo lado que “D”, excepto si está “C”, y “e” se coloca en el otro alelo. (cDE/ cde).
- Si “C” y “E” se colocan juntos en el mismo cromosoma solo si otras combinaciones no son posibles.

g.- En el orden de frecuencias: CDe (R1) >cDE (R2)>cDe (Ro) >CDE (Rz), y ,cde (r) >Cde (r') >cdE (r'') >CdE (ry).

4.4 Control de calidad en la identificación de los inmunofenotipos.

En cada determinación se incluyeron células con fenotipo conocido, positivas o negativas para el antígeno a buscar (células control).

Los procedimientos técnicos preanalíticos, analíticos y postanalíticos, se llevaron

a cabo dentro de un Sistema de Gestión de la Calidad, bajo la acreditación de la normativa ISO-15189.

4.5 Estudios Moleculares.

4.5.1 Extracción del ADN

La técnica utilizada se basó en la lisis celular mediante un proceso de incubación con la proteinasa K que, en presencia de un medio caotrópico inactiva de inmediato todas las nucleasas. El ácido nucleico liberado se une entonces, de forma selectiva, a una fibra pre-empacada contenida en una columna y se purificó mediante una serie de lavados. Finalmente, el ADN unido al filtro de la columna se liberó de ésta gracias a una solución baja en sales (líquido de elusión), obteniendo así un producto libre de sales, proteínas y demás impurezas celulares.

La extracción del ADN leucocitario de las muestras con fenotipo Rh negativo, se realizó por triplicado: El ADN obtenido libre de impurezas se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tres diferentes ultracongeladores, por cuestiones de seguridad.

Se evaluó la integridad del ADN por visualización mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

4.5.2. Estrategia molecular.

La estrategia diseñada, se basó en establecer el protocolo de estudio para cada mecanismo:

4.5.2.1. Protocolo para la amplificación de la caja RHD híbrida.

Se empleó la estrategia molecular previamente descrita (Wagner, 2000). Se emplearon las siguientes secuencias de oligonucleótidos, que identifican la caja RH

normal río bajo y la caja RH híbrida:

- Oligonucleótido de sentido (res7). 5' cctgtcccatgattcagttacc. Reconoce la región de identidad de la caja RH superior, inferior e híbrida.
- Oligonucleótido antisentido (rnb31): 5' ggtttttgtttgttttgccggtgc. Reconoce la región de identidad de la caja RH inferior y caja RH híbrida.

Se amplificó un fragmento de 3030 bp, para poder diferenciar las cajas amplificadas. Las condiciones de reacción desnaturalización a 94 °C, alienación 65 °C por 30 segundos, extensión de 68 °C durante 5 minutos por 45 ciclos, extensión final de 68 °C durante 10 minutos, con enzima taq de alta fidelidad (Expand High Fidelity plus. PCR System, nDTPack, Roche). El producto de PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa y digerido con enzima de restricción PstI, que reconoce las secuencias 5'ctgcag 3', 3' gacgtc 5', generando las bandas respectivas para la condición d/d (1887, 567, 397 y 179 bp), D/d (1887, 746, 567, 397 y 179) y DD (1887, 746 y 397). Se empleó un marcador de peso molecular de 50 bp, (DNA Molecular Weigh Marker XII, Roche®), que genera 15 fragmentos desde 50 a 750 bp, con una banda final de 2642 bp.

4.5.2.2. Protocolo para la amplificación del Pseudogen RHD ψ .

Este protocolo identificó directamente al pseudogen Phi y consistió en la amplificación de la región entre el intrón 3 y exón 4, donde se ubica la duplicación de 37 pb.

Para la identificación de esta secuencia se empleó la metodología de amplificación en PCR tiempo real (Light Cycler II, Roche), con el método de detección de sondas de hibridación, con las siguientes secuencias de oligonucleótidos:

- Sonda de hibridación (ancla). 5' cgaacacgtagatgtgcatcatgttca-FL.
- Sonda de hibridación (sensor). 5' LC640-gtggtagtctgtctgcaataaaacccagtaagtt
- Oligonucleótido de sentido. 5' cagaggatgccgacactca
- Oligonucleótido antisentido. 5' tctgctcagcccaagtagga

El protocolo de amplificación fue programando 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, seguidos de la alineación a 64°C durante 10 segundos y de extensión a 72°C durante 12 segundos.

Para el programa de detección se aplicó un solo ciclo de curvas meelting de 95°C 0 segundos, seguidos de 58°C 0 segundos y 80°C, durante 0 segundos, con una detección continua de fluorescencia.

4.5.2.3. Protocolo para la amplificación del exón 7.

Debido a que únicamente se incluyen sujetos con fenotipo Rh negativo y se excluyeron a los sujetos que mostraron una reacción de aglutinación débil para anti-D. La amplificación de esta secuencia, señala la presencia del gen RHD, como puede ocurrir en los sujetos con el pseudogen phi o en los mecanismos mixtos donde se identifica esta región. Es decir, se encuentra presente el gen RHD, pero la mutación existente impide la expresión de la proteína RhD. El resultado negativo para la amplificación del exón 7, indicó la ausencia del gen RHD como ocurre en el mecanismo de la deleción del RHD.

Para la identificación de esta secuencia se empleó la metodología de amplificación en PCR tiempo real (Light Cycler II, Roche), con el método de detección de sondas de hidrólisis (Taqman, Roche), con el diseño propuesto por Legler et al 2002; con las siguientes secuencias de oligonucleótidos:

- Sonda de hidrolisis: 5' 6FAM-agcagcacaatgtagatgatctctcca-TMR
- Oligonucleótido de sentido. 5' ctccatcatgggctacaa 3'
- Oligonucleótido antisentido. 5' ccggctccgacggtatc 3'

El protocolo de amplificación fue programado 40 ciclos de desnaturalización a 95°C

durante 10 segundos, seguidos de alineación a 58°C durante 30 segundos y posteriormente extensión a 72°C durante 1 segundo, fase de enfriamiento a 40°C durante 30 segundos, con una detección sencilla de fluorescencia.

4.5.2.4. Protocolo para la amplificación de la región 3' no traducida del exon10 del RHD.

La amplificación de esta secuencia, señaló la presencia del gen RHD, como ocurrió en el pseudogen phi o en los mecanismos mixtos donde se identificó esta región. Es decir, se encuentra presente el gen RHD, pero la mutación existente impide la expresión de la proteína RhD. El resultado negativo para la amplificación del exón 10, indicó la ausencia del gen RHD como ocurrió en el mecanismo de delección del RHD.

Para la identificación de esta secuencia se empleó la metodología de amplificación en PCR tiempo real (Light Cycler II, Roche), con el método de detección de sondas de hibridación, con las siguientes secuencias de oligonucleótidos:

- Sonda de hibridación (ancla). 5' ccagtgctgcgcgaacattgg-FL.
- Sonda de hibridación (sensor). 5' LC640-gactttgctgtcatgagcgtttctcacgta
- Oligonucleótido de sentido. 5' tctcactgttgctgcatt
- Oligonucleótido antisentido. 5' tctagcctgggtgacagagta

El protocolo de amplificación fue programado a 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, seguidos de alineación a 61°C durante 10 segundos y posteriormente extensión a 72°C durante 15 segundos.

Para el programa de detección se aplicó un solo ciclo de curvas melting de 95°C durante 20 segundos, seguidos de 40°C durante 20 segundos y 80°C durante 0 segundos, con una detección continua de fluorescencia.

4.5.2.5 Control de calidad de las amplificaciones.

En cada corrida se incluyó una muestra conocida con la secuencia en evaluación, así como muestra blanco o sin ADN.

En las muestras de ADN con resultados negativos, se amplificó el gen constitutivo de la albúmina para constatar la presencia de ADN en la muestra biológica en estudio.

4.5.3. Interpretación de los resultados en la estrategia molecular.

De acuerdo a la estrategia de estudio, se identificaron a los dos alelos en los sujetos Rh negativo, de la siguiente manera (Tabla 3).

Tabla 3. Combinación de mecanismos moleculares en sujetos Rh negativo.

Mecanismo	Alelos	RH box wt	RH box wt	Caja híbrida	Caja híbrida	RHD ψ	RHD ψ	Exón 7	Exón 7	Exón 10	Exón 10
Delección gen RHD	Del/ Del	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Pseudogen RHD ψ	RHD ψ / RHD ψ	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Delección/ RHD ψ	Del/RHD ψ	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
RHD ψ / Híbrido	RHD ψ /H	+	+	-	-	+	-	+/-	+/-	+/-	+/-
Delección/ Híbrido	D/H	+	-	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
Híbrido	H/H	+	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-

La interpretación del mecanismo molecular, a partir de la tabla de combinaciones, supone las siguientes premisas:

- 1.- La presencia únicamente de cajas híbridas, define al mecanismo de delección del gen.

- 2.- La amplificación exclusiva del pseudogen Phi, con presencia del exón 7 y 10, define a los sujetos Rh negativo con mecanismo molecular de pseudogen phi.
- 3.- La amplificación o no del exón 7, con la presencia del exón 10 y la ausencia de amplificación de la caja híbrida RHD y ausencia del pseudogen Phi, identifica a los sujetos Rh negativo perteneciente al grupo de mecanismos moleculares “híbridos”.
- 4.- La combinación de mecanismos moleculares, por ejemplo caja híbrida con pseudogen RHD ψ , caja híbrida híbrida con exón 10 y así sucesivamente.

5. Plan de análisis.

Se describen las frecuencias absolutas, así como la ocurrencia proporcional de cada fenotipo del gen RHCE en sujetos Rh negativo, así como el mecanismo de generación de la condición del fenotipo Rh negativo. Adicionalmente, se compararon las frecuencias esperadas de cada variante del fenotipo Rh negativo y el mecanismo observado. La misma situación se aplicó para la condición o no de isoimmunización al antígeno RhD y origen étnico.

6. Aspectos éticos

6.1. Aprobación.

El proyecto de investigación fue sujeto a revisión y aprobación por el Comité de Investigación y el Comité de Ética del Instituto Nacional de Perinatología.

6.2 Consentimiento de los participantes.

El protocolo fue sometido a evaluación y aprobación por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Perinatología. Debido a que las muestras de ADN, fueron conservadas en un banco de ADN, que es un centro de acopio y almacenamiento, perteneciente al proyecto **“Identificación de los fenotipos poco frecuentes del sistema Rh en sujetos del Valle de México y creación de un Banco**

de ADN”, número 07241-319, se obtuvo el consentimiento bajo información del sujeto Rh negativo participante en el estudio. Las muestras de ADN están identificadas con un número progresivo de cinco dígitos único debido a que no contiene su nombre u otra información que permita la identificación directa. Las muestras de ADN, se encuentran almacenadas en una unidad de congelación con acceso restringido, en apoyo de garantía de confidencialidad del sujeto de estudio.

III. RESULTADOS.

1. Descripción fenotípica de la población evaluada.

Para conformar la población motivo de estudio, se efectuó la identificación fenotípica de un total de 2 692 sujetos Rh negativo. De esta población se seleccionaron a 573 sujetos Rh negativo que fueron incluidos en el banco de ADN. Al distribuir por fenotipo las muestras de sujetos Rh negativo incluidas, el fenotipo *ccdee* fue el que presentó la mayor frecuencia, en 529 casos, con un 92.3 % de la muestra evaluada. Se encontraron otros cuatro fenotipos que fueron *Ccdee*, *CcdEe*, *ccdEe* y *CcdEE*, con 28, 5, 19 y un solo caso, que representaron el 4.9, 0.9, 1.7 y 0.2 % respectivamente de la frecuencia global.

Para la distribución de los fenotipos del sistema Rh, comparados respecto al sistema ABO, los dos grupos sanguíneos más prevalentes del sistema ABO, correspondieron al grupo O, con 325 sujetos, con un 56.7 % de toda la muestra, y aquellos del grupo sanguíneo A, con 194 casos que representaron el 33.9 %. Se observó que la distribución del fenotipo *ccdee*, se presentó en el 92.3 y 91.8 %, sin diferencia estadística en las frecuencias observadas. Bajo el mismo análisis, el resto de los fenotipos del sistema Rh encontrados en la muestra del banco de ADN, se obtuvo una distribución de las frecuencias similar entre los sujetos con grupo sanguíneo O y A. La excepción se observó para el caso de los sujetos AB, cuya prevalencia es del 0.7 % (4 casos); de estos, tres casos presentaron el fenotipo *ccdee* y uno el *ccdEe* (tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de los fenotipos del Sistema Rh en sujetos Rh negativo, de acuerdo al grupo ABO.

Fenotipo del sistema RhCcEe (n/%)					
Grupo ABO	<i>ccdee</i>	<i>Ccdee</i>	<i>CcdEe</i>	<i>ccdEe</i>	<i>CcdEE</i>
(573)	(529/92.3)	(28/4.9)	(5/0.9)	(19/1.7)	(1/0.2)
A	178	11	2	2	0
(194/33.9)	(91.8)	(5.7)	(1.0)	(1.5)	
B	48	2			
(50/8.7)	(96.0)	(4.0)			
AB	3			1	
(4/0.7)	(75.0)			(25.0)	
O	300	15	3	6	1
(325/56.7)	(92.3)	(4.6)	(0.9)	(1.8)	(0.3)

2. Descripción fenotípica en la muestra de estudio.

Para ajustar el tamaño muestral a lo descrito en la sección de material y métodos; se seleccionó la muestra de sujetos Rh negativo, mediante el empleo de una tabla electrónica de números aleatorios, obteniéndose un total de 246 casos para ser analizados. Posterior a este proceso de muestreo, se procedió a determinar la estimación de la concentración e integridad del ADN en todas las muestras seleccionadas, mediante la detección de la presencia de un gen constitutivo presente en cada muestra mediante electroforesis. Así resultaron inadecuadas las muestras de 20 sujetos, donde no se obtuvo amplificación satisfactoria del mismo. Así el tamaño muestral para la determinación del mecanismo molecular de la condición de RH negativo se realizó en 216 sujetos.

Para identificar posibles sesgos en la selección de las muestras del ADN, nuevamente se efectuó la comparación entre los antígenos del sistema ABO y la distribución de los fenotipos del sistema Rh en los sujetos Rh negativo seleccionados. La distribución de la frecuencia de los principales componentes del sistema sanguíneo ABO presentó una distribución dominante del grupo sanguíneo O, seguido del grupo A, B y finalmente el AB, con frecuencias de 56.4, 34.2, 7.9 y 1.3 % respectivamente. La frecuencia de los diferentes fenotipos del sistema Rh en los 216 sujetos de estudio, demostró mayor prevalencia del fenotipo *ccdee* (*r/r*) con 82.8 %, seguido del fenotipo *Ccdee* con 11.6, y con mucho menor frecuencia los fenotipos *CcdEe*, *ccdEe*, *CcdEE*, con ocurrencia del 1.8, 3.2 y 0.46 %, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia de los fenotipos del Sistema Rh de los sujetos Rh negativo, por grupo ABO.

Grupo ABO (n 216)	Fenotipo del sistema RhCcEe n(%)				
	<i>ccdee</i> (179/82.8)	<i>Ccdee</i> (25/11.6)	<i>CcdEe</i> (4/1.8)	<i>ccdEe</i> (7/3.2)	<i>CCdEE</i> (1/0.46)
A (n 74/34.2)	60 (0.810)	10 (0.135)	2 (0.027)	2 (0.027)	
B (n 17/7.9)	16 (0.940)	1 (0.060)			
AB (n 3/1.3)	2 (0.666)			1 (33.3)	
O (n 122/56.4)	101 (0.827)	14 (0.114)	2 (0.016)	4 (0.032)	1 (0.008)

3. Estimación de la frecuencia alélica.

La frecuencia de los alelos *C*, *c*, *E* y *e*, se presentó con mayor ocurrencia para los alelos *c* y *e*, con una frecuencia alélica de 0.455 y 0.485 respectivamente, y con menor frecuencia los alelos *C* y *E*, con frecuencia alélica de 0.043 y 0.015, respectivamente (tabla 6)

Tabla 6. Frecuencia alélica de los alelos *C*, *c*, *E* y *e* en sujetos Rh negativo.

Alelo	<i>C</i> (n 31)	<i>c</i> (n 401)	<i>E</i> (n 13)	<i>E</i> (n 419)
Frecuencia	0.071	0.929	0.030	0.970

4. Resultados de la estrategia molecular sobre el mecanismo de generación de la condición Rh negativo.

4.1 Amplificación de la región 3' no traducida del exón 10 del gen RHD.

Con el empleo del método de PCR en tiempo real, se revisaron los resultados de las curvas y picos melting. Se pueden diferenciar los valores de aquellos que amplifican esta secuencia específica, con diversos estratos, homocigoto, heterocigoto y negativo (figura 5).

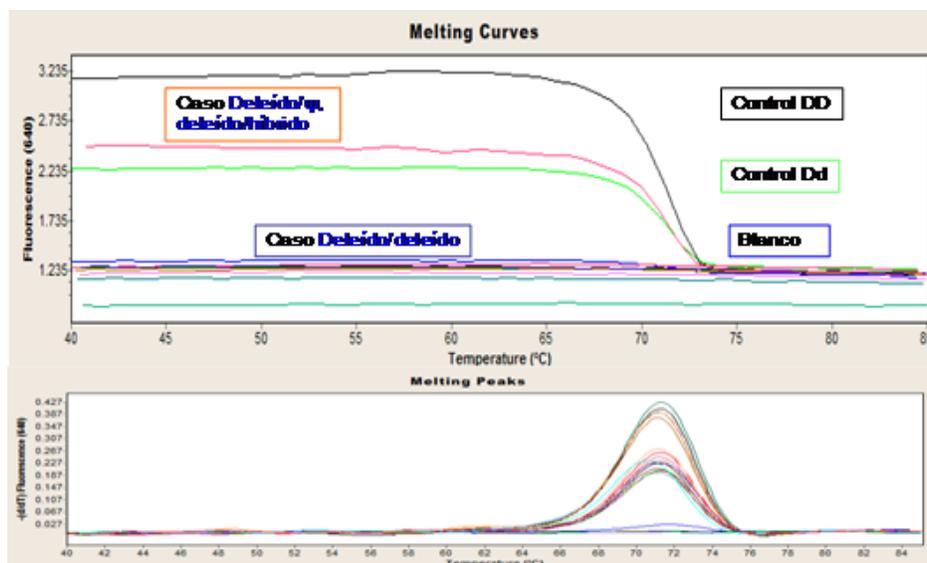


Figura 5. Curvas de disociación en PCR tiempo real (Light Cycler) de la región no traducida 3' del exón 10 del gen RHD.

a) Se muestran las curvas de disociación de los diferentes controles. b) Muestra los picos de disociación de los controles.

De los 216 casos seleccionados, en 20 de ellos (9.3 %), se logró amplificar la porción 3' del exón 10 del gen RHD (tabla 7). Al comparar la distribución de los casos positivos para esta amplificación, respecto al fenotipo del sistema Rh, se observó que para el fenotipo *cde (r)*, en 11 casos (6.1 %), presentaron amplificación; para el fenotipo *ccdEe (r/r')*, esta fue en 3 casos (42.9 %), mientras que para el fenotipo *Ccdee (r/r')*, fue positivo en los restantes seis casos (24.0 % para este fenotipo).

Tabla 7. Fenotipo del sistema Rh y amplificación del exón 10 del gen RHD.

Fenotipo del sistema Rh (216)	Amplificación del exón 10 n(%)	
	Negativo (186/90.7)	Positivo (20/9.3)
<i>ccdee</i> (179/82.8)	168 (93.9)	11 (6.1)
<i>ccdEe</i> (7/3.2)	4 (57.4)	3 (42.9)
<i>Ccdee</i> (25/11.6)	19 (76.0)	6 (24.0)
<i>CcdEe</i> (4/1.9)	4 (100)	
<i>CCdEE</i> (1/0.5)	1 (100)	

4.2 Amplificación del intrón 3 y exón 4 con la secuencia específica del pseudogen RHD ψ .

Para el caso del pseudogen RHD, se amplificó una secuencia específica que incluyó el intrón 3 y exón 4 del gen RHD. Esta secuencia no se encontró positiva en ninguno de los 216 casos evaluados. Para comprobar el estado del ADN en la muestra estudiada, se demostró la presencia del gen constitutivo de la albúmina en todas ellas (Tabla 8).

Tabla 8. Fenotipo del sistema Rh y amplificación del intrón 3 exón 4 del gen RHD.

Fenotipo del sistema Rh (216) n(%)	Amplificación intrón 3 exón 4 n (n/%)	
	Negativo (216/100)	Positivo (0)
<i>ccdee</i> (179/82.8)	168 (93.9)	
<i>ccdEe</i> (7/3.2)	4 (57.4)	
<i>Ccdee</i> (25/11.6)	19 (76.0)	
<i>CcdEe</i> (4/1.9)	4 (100)	
<i>CCdEE</i> (1/0.5)	1 (100)	

4.3 Amplificación del exón 7 del gen RHD.

La amplificación de las secuencias específicas del exón 7 del gen RHD, esta se encontró en 35 sujetos Rh negativo (Tabla 9), con ocurrencia global de 16.2 %; Al comparar la distribución de los casos positivos para esta amplificación, respecto al fenotipo del sistema Rh, se observó que para el fenotipo *cde* (*r*), en 27 casos (15.1 %) se presentó amplificación; para el fenotipo *ccdEe* (*r/r''*), en 3 casos (42.9 %), mientras que para el fenotipo *Ccdee* (*r/r'*), se obtuvo en los restantes cinco casos (20.0%).

Tabla 9. Fenotipo del sistema Rh y amplificación del exón 7 del gen RHD.

Fenotipo del sistema Rh (216)	Amplificación del exón 7 n(%)	
	Negativo (181/83.8)	Positivo (35/16.2)
<i>ccdee</i> (179/82.8)	152 (84.9)	27 (15.1)
<i>ccdEe</i> (7/3.2)	4 (57-1)	3 (42.9)
<i>Ccdee</i> (25/11.6)	20 (80.0)	5 (20)
<i>CcdEe</i> (4/1.9)	4 (100)	
<i>CCdEE</i> (1/0.5)	1 (100)	

4.4 Amplificación de la caja híbrida del gen RHD.

La amplificación de la caja híbrida del gen RHD, revistió una estrategia distinta comparada con la amplificación del intrón 3 y exón 4, del exón 7 y del exón 10. Para este caso se efectuó la amplificación de la caja híbrida en gel de agarosa y el producto de PCR se sometió a corte con enzima de restricción. Así el resultado posible sería negativo para la amplificación de la caja híbrida, heterocigoto o bien homocigoto (Figura 6).

La amplificación en la muestra de DNA de los sujetos con doble dosis de caja RH híbrida (*d/d*), al compararse con aquellos heterocigotos (*D/d*), presentaron una sola banda electroforética de diferencia, con peso de 744 bp

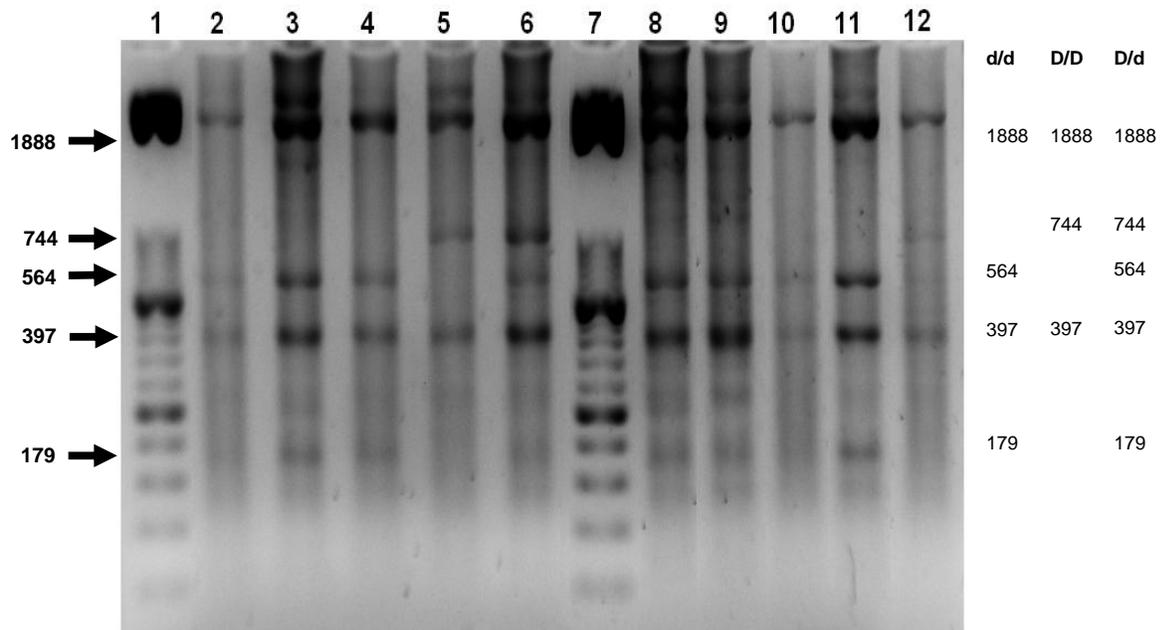


Figura 6. Amplificación del producto de PCR bajo el corte de la enzima de restricción PstI. Carril 1 y 7, marcador de peso molecular 250 bp (XIII, Roche). Carril 2, 3, 4, 8, 9 10 y 11 Homocigoto para la caja híbrida Carril 5. Homocigoto para caja río arriba (híbrido/híbrido). Carril 6 y 12 heterocigoto para caja híbrida.

Para la amplificación de las secuencias específicas de la caja híbrida del gen RHD, las opciones de los resultados se definieron como negativo, es decir no amplificó la secuencia específica que reconoce a la caja híbrida del gen RHD, la segunda opción fue heterocigoto, es decir se amplificó la caja híbrida y la caja río abajo y, finalmente homocigoto, cuando únicamente se amplificó la caja híbrida (Tabla 10). La frecuencia para el resultado negativo fue (3.2 %), para heterocigotos 21 casos (9.7 %) y homocigotos 188 casos (87.0 %), (tabla 10). Al distribuir los casos estudiados para esta amplificación y como negativo, heterocigoto u homocigoto para la caja híbrida del gen RHD, respecto al fenotipo del sistema Rh, se encontró la siguiente distribución: para el fenotipo *cde (r)*, con tres casos (1.7 %) negativos, 13 casos (7.3 %) heterocigotos y 163 casos (91.0 %) homocigotos. Para el fenotipo *ccdEe (r/r')*, un caso (14.3 %) fue negativo, dos casos (28.6 %) fueron heterocigotos y cuatro casos (57.1 %) homocigotos. Mientras que para el fenotipo *Ccdee (r/r')*, se obtuvieron tres casos (12.0 %) negativos, siete casos (28.0 %) heterocigotos y 15 casos (60.0 %) homocigotos. Finalmente, para los fenotipos *CcdEe (r'/r')* y *CcdEE (ry/ry)*, se encontraron cuatro y un

caso, respectivamente, todos ellos bajo la condición de homocigoto para la amplificación de la caja híbrida del gen RHD (tabla 10).

Tabla 10. Fenotipo del sistema Rh y amplificación de la caja híbrida del gen RHD.

Fenotipo del sistema Rh (n 216)	Amplificación de la caja híbrida n (%)		
	Negativo (7/3.2)	Heterocigoto (21/9.7)	Homocigoto (188/87.0)
<i>ccdee</i> (179/82.8)	3 (1.7)	13 (7.3)	163 (91.0)
<i>ccdEe</i> (7/3.2)	1 (14.3)	2 (28.6)	4 (57.1)
<i>Ccdee</i> (25/11.6)	3 (12.0)	7(28.0)	15 (60.0)
<i>CcdEe</i> (4/1.9)			4 (100)
<i>CCdEE</i> (1/0.5)			1 (100)

La estrategia basada en la amplificación de los exones 7 y porción terminal del exón 10 del gen RHD, mostró un comportamiento diferente respecto a la amplificación de las cajas híbridas. Cuando la caja híbrida no amplificó (7 casos), se asoció con la presencia de la amplificación del exón 10 en dos casos (28.6%) y en combinación de los exones 7 y 10 en los restantes cinco casos (71.4%). La amplificación homocigota solamente de la caja híbrida del gen RHD, se encontró en el 91 % de los casos sin amplificación de los exones 7 y 10 o a la combinación de ambos. Es decir, se presentó amplificación inespecífica de ambos exones en el 9 % de los casos (tabla 11)

Tabla 11. Distribución de resultados de acuerdo a la presencia de la caja híbrida y amplificación de las secuencias de los exones 7 y 10 del gen RHD.

Amplificación de la Caja híbrida	Presencia del exón 7 y 10 n (%)			
	Exón 7 y exón 10 (n 12/5.6)	Exón 7 (n 23/10.6)	Exón 10 (n 8/3.7)	Ninguno (n 173/80.1)
Negativo (7)	5 (71.4)		2 (28.6)	
Heterocigoto (21)	5 (23.8)	10 (47.6)	4 (19.0)	2 (9.5)
Homocigoto (188)	2 (1.1)	13 (6.9)	2 (1.1)	171 (91.0)

Para establecer el mecanismo molecular asociado a la condición de Rh negativo, se analizaron las opciones de delección del gen RHD, a través de mecanismos distintos a la delección del gen RHD y pseudogen RHD ψ . Los resultados se clasificaron como delección del gen RHD que se presentó en 188 (87%), el gen RHD híbrido se presentó en 7 casos (3.2%) y la combinación de lesión/híbrido en 21 casos (9.7%) (Tabla 12). No se amplificaron las secuencias específicas del intrón 3 y exón 4 del gen RHD, que caracteriza a la condición del pseudogen RHD ψ .

Al distribuir los casos positivos para cada mecanismo molecular asociado a la condición Rh negativo, respecto al fenotipo del sistema Rh, se encontró que para el fenotipo *cde* (*r*), se encontró en 163 casos (91.1 %), para la delección del gen RHD, tres casos (1.7 %) y para el gen RHD híbrido 13 casos (7.3 %), para la combinación de lesión/híbrido. Para el fenotipo *ccdEe* (*r/r'*), se encontró en cuatro casos (57.1 %) con delección del gen RHD, un caso (14.3 %) para el gen híbrido y dos casos (28.6 %) para la combinación delección híbrido. Mientras que para el fenotipo *Ccdee* (*r/r'*), se detectaron 16 casos (64.0 %) para la delección del gen, 3 casos (12.0 %) para el RHD híbrido y 6 casos (24.0 %) para la combinación delección/híbrido, Finalmente, para los fenotipos *CcdEe* (*r'/r''*) y *CcdEE* (*ry/ry*), se encontraron 4 y un caso, respectivamente, todos ellos bajo la condición de homocigoto para la amplificación de la caja híbrida del gen RHD.

Tabla 12. Distribución del Fenotipo Rh de acuerdo al mecanismo molecular propuesto.

Fenotipo del sistema Rh (216)	Delección del gen RHD (188/87.0)	Gen RHD híbrido (7/3.2)	Combinación delección/híbrido (21/9.7)
<i>ccdee</i> (179/82.8)	163 (91.1)	3 (1.7)	13 (7.3)
<i>ccdEe</i> (7/3.2)	4 (57.1)	1 (14.3)	2 (28.6)
<i>Ccdee</i> (25/11.6)	16 (64.0)	3 (12.0)	6(24.0)
<i>CcdEe</i> (4/1.9)	4 (100)		
<i>CCdEE</i> (1/0.5)	1 (100)		

La frecuencia alélica del gen de la caja híbrida fue de 0.886 y de los genes alelos híbridos del RHD fue del 0.113, tomando en consideración que no se identificaron casos correspondientes al pseudogen RHD ψ (tabla 13). La presencia de los alelos de la caja híbrida fueron más comunes en el fenotipo *cde* (*r*), con 329 casos (0.902), seguido en frecuencia para el fenotipo *ccdEe* (*r/r'*), con 9 alelos (0.642) y para el fenotipo *Ccdee* (*r/r'*), con 35 alelos (0.700) y finalmente ocho y dos alelos de la caja híbrida para los fenotipos *CcdEe* (*r'/r''*) y *CcdEE* (*ry/ry*). En el mismo sentido, la mayor frecuencia de alelos híbridos se presentó para los fenotipos *ccdEe* y *Ccdee*, con una frecuencia alélica de 0.358 y 0.300, respectivamente (tabla 13).

Tabla 13. Frecuencia alélica de los alelos C, c, E y e en sujetos Rh negativo.

Fenotipo del sistema Rh (n 432)	Caja Híbrida (383/0.886)	Alelos Híbridos (49/0.113)
<i>ccdee</i> (n 358/0.828)	329 (0.902)	33 (0.098)
<i>ccdEe</i> (n 14/0.032)	9 (0.642)	5 (0.358)
<i>Ccdee</i> (n 50/0.116)	35 (0.700)	15 (0.300)
<i>CcdEe</i> (n 8/0.019)	8 (1.0)	
<i>CCdEE</i> (n 2/0.005)	2 (1.0)	

IV. Discusión

El fenotipo Rh negativo se encuentra en el 15 % de la población europea, mientras que en los grupos vascos por su condición de protoeuropeos puede llegar al 30 %; se reporta entre el 5-7 % de la población negro-africana y con mucho menor frecuencia en la población asiática y amerindia, menor al 1 % (Lisker, 1980).

La homocigocidad para la delección del gen RHD, es el mecanismo más común en la población blanca de origen caucásico (Wagner, 2004). Para la población no blanca, en el establecimiento de la condición Rh negativo participan mecanismos adicionales, ya que el gen RHD se encuentra intacto en mayor o menor medida. En población con ancestros negro-africanos, la presencia del pseudogen RHD ψ (Singleton, 2000) y el alelo r's ocurren con mayor frecuencia (Grootker-Tax et al, 2005a). En la población asiática Rh negativo, se agrega otro mecanismo que es mediante la presencia de alelo Del. Debido a la extremadamente baja expresión del antígeno RhD, que solamente puede ser identificado mediante técnicas de levigado, esos fenotipos frecuentemente son identificados como Rh negativo (Grootker-Tax et al, 2005b).

La muestra de sujetos Rh negativo evaluada en el presente proyecto, proviene de una población de mezcla génica elevada. La población indígena mesoamericana, presenta una prevalencia muy baja de los grupos sanguíneos A, B o AB, así como de la condiciones Rh negativo, entre otros fenotipos (Lisker et al, 1980); es decir, predominantemente son del grupo sanguíneo O y RhD positivo. La población del valle de México, donde fue seleccionada la muestra, presenta la característica de tener una elevada mezcla génica y la distribución de la frecuencia del grupo sanguíneo ABO, resultó similar a la reportada por diferentes autores para donadores de sangre del Valle de México, donde el grupo sanguíneo O es el más frecuente, seguido por el grupo A, posteriormente el B y por el último el grupo AB (Lisker et al, 1980).

El hecho de que la población amerindia, con excepción de los indígenas

canadienses que son del grupo sanguíneo A, pero no B, sea del grupo sanguíneo O y RhD positivo, pudiera deberse al menos a dos razones:

- a. Existió un grupo pequeño de colonizadores originales que fueran exclusivamente del grupo sanguíneo O (caso extremo de deriva génica) o
- b. La selección natural haya conducido a la desaparición de otros grupos humanos.

Para la población Rh negativo motivo de estudio, se puede apreciar que el fenotipo de mayor frecuencia fue *ccdee.*, Al compararse con otros autores y nuevamente, la población que muestra mayores semejanzas con la de éste estudio fue la de Tiburcio (Tiburcio, 1978), seguida de *Ccdee*, a diferencia del estudio realizado en la ciudad de México (Grunbaum, 1980), en donde el segundo fenotipo de mayor frecuencia fue *CCdEE* (0.095), así mismo, se observó la presencia de otros fenotipos, aunque en escasas proporciones, que no se encontraron en los estudios previos mencionados, como *CcdEe*, *ccdEE* (excepto para Grunbaum) y *CCdee*. Este hallazgo podría deberse a la gran diferencia en cuanto al tamaño muestral, además del alto índice de mezcla genética que se considera existe hoy en día en la población del Valle de México.

Tabla 14. Comparación de frecuencias fenotípicas para individuos Rh positivo y Rh negativo.

Autor	Tiburcio (n 43)	Grunbaum. (n 42)	Lisker (n 8)	Long (n 49)	Baptista (n 216)
<i>ccdee</i>	0.930	0.761	1	0.918	0.828
<i>ccdEe</i>	0.023	0.048	0	--	0.032
<i>Ccdee</i>	0.047	0.048	0	0.082	0.116
<i>CcdEe</i>	--	--	--	--	0.019
<i>CCdEE</i>	--	0.095	0	--	0.005
<i>ccdEE</i>	--	0.048	--	--	--
<i>CCdee</i>	--	--	--	--	--

El caso contrario ocurre con los alelos “E” y “e”, en donde la frecuencia del alelo “e” en sujetos Rh positivo es en promedio 2.6 veces mayor que el alelo “E” en los trabajos realizados por los diferentes autores (Long, 1991. Tiburcio, 1978), excepto para el de Lisker (Lisker, 1980), en donde la frecuencia del alelo e es 1.46 veces mayor que el alelo E en la población.

En la población mestizo-mexicana Rh negativa, los alelos predominantes son “c” y “e” para los diferentes estudios, aunque en distintas proporciones.

La importancia de éstos resultados, es que pueden ser tomados en cuenta como una base en los bancos de sangre, al inferir la posibilidad de encontrar donadores de sangre cuyo fenotipo sea el requerido para evitar la formación de anticuerpos en el receptor o paciente.

Tabla 15. Frecuencia alélica en sujetos RhD negativo.

Autor	C	c	E	e
Tiburcio (n 43)	0.023	0.977	0.012	0.988
Grunbaum (n 42)	0.119	0.881	0.166	0.833
Lisker (n 8)	0	1	0	1
Long (n 49)	0.041	0.959	0	1
Baptista (n 216)	0.043	0.455	0.015	0.485

Por otro lado, no es posible asegurar que las diferencias en cuanto a la frecuencia de los fenotipos del sistema Rh dependan fundamentalmente del flujo migratorio poblacional, salvo para los fenotipos ccdee, CCdEE y ccdEE, por lo que podría pensarse que las diferencias marcadas que se observan en cuanto a frecuencia de cada fenotipo y alelo, pueden ser debidas, en gran parte al tamaño muestral para cada estudio, para la población Rh positivo, previo a este estudio, la máxima cantidad de individuos estudiados fue de 2606, por Lisker, y para los individuos Rh negativo, el máximo numero de individuos considerado fue de 49, por Long., mientras que para el

estudio actual se consideraron 5707 y 2559 individuos, respectivamente y de ahí se extrajo la muestra de 216 casos Rh negativo.

El sistema Rh presenta al menos ocho haplotipos los cuales fueron formados mediante una serie de eventos de duplicación, mutación o recombinación (figura 8). El haplotipo *CDe* es la combinación ancestral.

Los primeros homínidos e inclusive la “eva mitocondrial”, tuvieron sus orígenes en el África (Klein, 2002), entonces explicaría del por qué el haplotipo con mayor frecuencia en estos grupos étnicos es *cDe*.

La delección del gen *RHD* u otro mecanismo relacionado, genera el haplotipo *cde*. Por otro lado, el haplotipo *CDe* puede resultar de la recombinación no recíproca del exón 2 del *RHD* hacia el alelo del gen *RGCE*. El haplotipo *cDE*, puede emerger de la mutación puntual del alelo *ce*. Así, el alelo *Cde* proviene de la recombinación entre *CDe* y *cde*. Adicionalmente, *cdE*, proviene de la recombinación entre *cDE* y *cde*, así como el haplotipo *CDE* proviene de la recombinación entre *CDe* y *cDE*. El haplotipo de muy baja prevalencia, *CdE*, proviene de la recombinación entre los también poco prevalentes haplotipos *cdE* y *Cde* (Grootker-Tax, 2005a).

La baja prevalencia del fenotipo Rh negativo entre los indígenas mesoamericanos y sudamericanos, se explica por las ramificaciones de los grupos humanos contemporáneos (Figura 7). La mayor prevalencia del fenotipo Rh negativo en los grupos caucásicos de alrededor del 12-15 %, contrasta con la frecuencia menor al 1 % o nula en los grupos indígenas americanos. Los indígenas americanos tienen mayor relación génica con grupos étnicos, por una rama del sur del pacífico y por otra de los grupos mongólicos del norte del continente asiático (Klein, 2002), en estos grupos étnicos, la prevalencia de sujetos Rh negativo es igualmente muy baja (Grootker-Tax, 2005a).

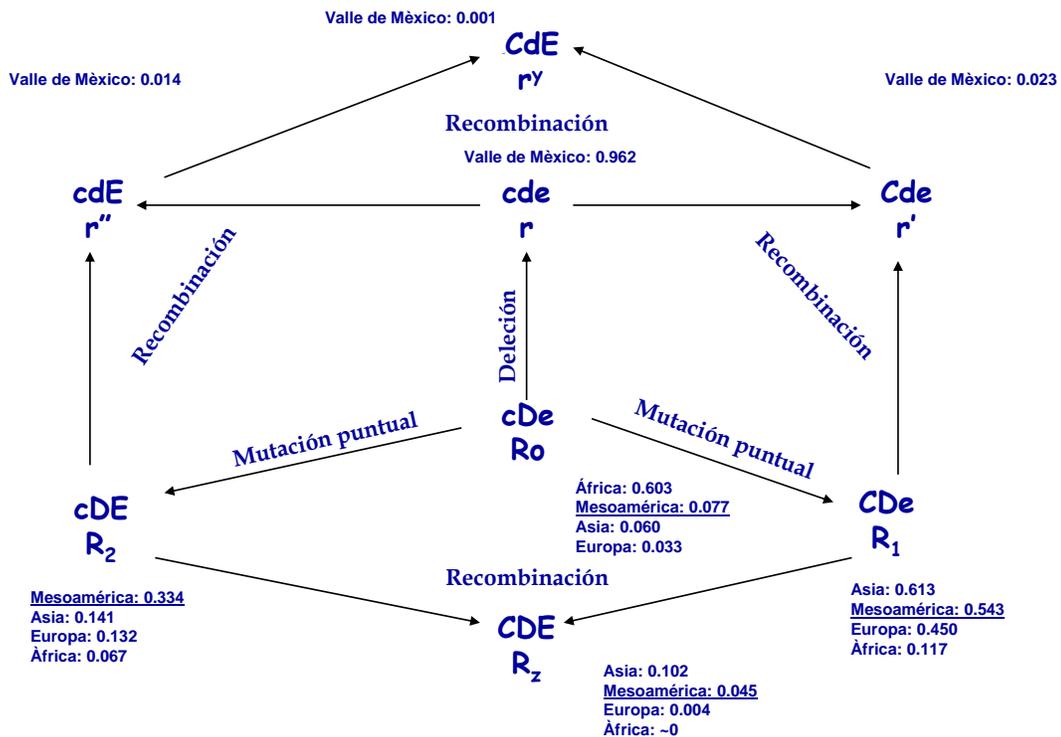


Figura 7. Evolución de los haplotipos del Rh en el humano.

El haplotipo original o primero fué cDE , de ahí que la frecuencia haplotípica sea mayor en la población de origen africano. Mediante la mutación puntual se generó el haplotipo CDe y cDE , ambos con prevalencia elevada en grupos mesoamericanos.

Esta delección ocurre mediante un entrecruzamiento desigual del locus RH, facilitado por la homología de las cajas RH. Como resultado de este entrecruzamiento dispar en los sujetos Rh negativo, se genera una tercera caja del Rh, denominada caja Rh híbrida, la cual es idéntica a la terminación 5' de la caja Rh superior y a la terminación 3' de la caja Rh inferior.

En la población caucásica Rh negativo, la delección del gen RHD es el mecanismo dominante. El análisis de la secuencia de la caja Rhesus híbrida del locus RHD en sujetos Rh negativo de origen caucásico, africano o asiático, señala que está presente en todas las poblaciones. Pero en la población de origen africano, está presente una segunda Rh híbrida. La presencia de esta segunda caja Rh híbrida indica que el mecanismo de delección del gen RHD, es el mecanismo dominante en todas las poblaciones y que los mecanismos moleculares distintos, como el pseudogen RHD ψ y el alelo *r's*,

En la comparación de la frecuencia de los mecanismos moleculares y etnicidad, se observa que la delección del gen RHD, predomina sustancialmente en los sujetos de origen caucásico europeo (96.55 %) y con menor medida en los negros africanos (18.3 %). Para el caso de nuestro trabajo la frecuencia observada fue del 88.6 %. La presencia de genes RHD híbridos, que ocurre fundamentalmente en grupos negro-africanos y chinos (14.6 y 10.3 %), la frecuencia es similar a la observada en nuestro estudio con un 11.3 %.

Finalmente la presencia del pseudogen RHD ψ , que ocurre predominantemente en población negro africana y en menor ocurrencia en orientales continentales o isleños (9-27.7 %) y mucho menor frecuencia en los europeos caucásicos (1.2 %), no se encontró en ningún caso de nuestra serie (Tabla 16).

Tabla 16. Prevalencia de los principales mecanismos moleculares en sujetos Rh negativo (n/%)

Mecanismo	Europa (2113)	África (82)	Japón (132)	China (179)	Corea (485)	México (216)
Delección RHD	96.55	18.3	70.8	84.2	81.45	88.6
Híbrido	2.25	14.6	1.5	10.3	9.55	11.3
RHD-CE-D						
Pseudogen RHD ψ	1.2	67.1	27.7	16.2	9	0

Una situación en particular de estos resultados, lo representan los sujetos Rh negativo, donde se amplifican secuencias específicas del exón 7, de la porción 3' del exón 10 o ambos, pero sin amplificarse el pseudogen RHD ψ ni la caja Rh híbrida. Esta situación, aparentemente contradictoria, pudiera explicarse por las limitaciones en la técnica empleada, donde la sensibilidad del reactivo hemoclasificador varía de acuerdo a la mezcla de anticuerpos monoclonales que se emplean. Esta situación genera resultados falsos negativos, es decir, identifica a sujetos fenotípicamente Rh negativo cuando son Rh positivo.

La ausencia en la identificación de sujetos Rh negativo, cuyo mecanismo molecular sea la formación del pseudogen RHD ψ , puede ser explicado por la confluencia de diversas razones, donde se incluye:

- a. Sesgo en la selección de la población, ya que se incluyeron donadores voluntarios y familiares, de un banco de sangre de un hospital privado y de pacientes y familiares de un Instituto Nacional de Salud. El primero atiende fundamentalmente a población de clase media de la ciudad de México y áreas circunvecinas, mientras que el Instituto es un hospital público que atiende a pacientes de familias asalariadas o independientes, provenientes de la zona centro-sur del país; mientras que la mayor densidad de población con antecedentes de

origen africano, se encuentra en las zonas costeras del golfo y del sur del pacífico (Lisker, 1986. Lisker, 1990).

b. Adicionalmente, pudo haber sido un efecto del azar, ya que la estimación de la mezcla génica de origen africano en la ciudad de México, ocupa la tercera raíz etnocultural de relevancia, precedida de la indígena y la europea, sin que se hayan seleccionado sujetos Rh negativo con esta característica.

c. La migración negra hacia Mesoamérica, proceso largo y cruento, se debió a su utilización como esclavos traídos directamente de África, o bien, provenientes de otras colonias, por ejemplo Cuba y posteriormente a la Nueva España. La conformación étnica de los esclavos negros fueron principalmente de grupos Sudanes y Bantú, que poseen una menor frecuencia en la condición Rh negativo (Martínez-Montiel. 2006. Menozzi, 1978).

d. La tercera posibilidad molecular que permita la identificación de los sujetos Rh negativo de origen africano, aparte de la delección del gen RHD y la formación del pseudogen RHD ψ , puede ser por la formación del alelo $r's$ o (C)cde^s. El alelo $r's$ es un híbrido del RHD caracterizado por la presencia de los exones del gen RHCE que inician en la posición 455 (exón 3) al exón 7, éste último no fue evaluado en el presente proyecto y pudiera tener una frecuencia alélica con influencia significativa, inclusive sobre la frecuencia del pseudogen RHD ψ , hecho que deberá ser valorado en futuras investigaciones.

e. En el tercer grupo de mecanismos, que se denominaron mecanismos híbridos, se refieren a una amplia variedad de sujetos Rh negativo, que presentan la combinación de segmentos variables de ambos genes expresando los alelos híbridos RHD-CE-D o RHCE-D-CE. La orientación inversa de los de los genes RH funciona como una característica que facilita la conversión entre ambos genes, hecho que explicaría la elevada frecuencia de los genes RH híbridos (Wagner, 2000).

La duplicación de los genes RH es un evento que ha tenido lugar durante la evolución de los primates, generando a los genes RHD y RHCE en los primates humanos. Mediante la comparación de diversas secuencias del locus RH del humano,

primates no humanos y otros mamíferos, se ha determinado, estableciendo su posición y orientación, se ha determinado que el gen *RHCE* se representa como el gen ancestral y que mediante un proceso de duplicación se generó el gen *RHD* en orientación invertida respecto al gen *RHCE*, jugando un papel central las cajas RH (Wagner, 2000).

Por razones, no identificadas todas ellas, el sistema Rh es con mucho el sistema de grupos sanguíneos con mayor complejidad. Los diversos polimorfismos en el gen *RHD* y la consecuente modificación en la expresión de la proteína RhD, pudieran ser explicados por uno o más de los siguientes mecanismos (van der Schoot 2003):

- a. Re-arreglos en tándem de los genes *RHD* y *RHCE*, donde la configuración genética ha llevado a la evolución frecuente de alelos aberrantes del *RHD* que son causados por los reemplazos unidireccionales de fragmentos de tamaño variable entre los genes *RHD* y *RHCE*, con su contraparte *RHCE* o *RHD*, conduciendo a la formación de los alelos *RHD-CE-D* o *RHE-D-CE*.
- b. Mutaciones sin sentido, que se modifica la secuencia del gen *RHD* o *RHCE* y puede modificar la expresión en la antigenicidad de las proteínas RhD o RhCcEe.
- c. Mutaciones en el templado de la secuencia de ADN, que probablemente generan conversiones génicas muy cortas, las cuales se han identificado en secuencias de nucleótidos de *RHD* y *RHCE* que son reemplazadas por sus contrapartes en *RHCE* y *RHD*, respectivamente.
- d. Delección de nucleótidos que generan un corrimiento del marco de lectura y codón de paro prematuro.
- e. Finalmente, las mutaciones de un solo nucleótido (SNP), llamadas mutaciones puntuales, que en los genes *RHD* y *RHCE*, generan cambios en la configuración de aminoácidos y consecuentemente expresión de las proteínas RhD o RhCcEe, generando la pérdida en la expresión de epítopes o a la expresión de nuevos epítopes.

V. CONCLUSIONES

El sistema Rh es con mucho el sistema de grupos sanguíneos con mayor complejidad, al no existir concordancia entre el genotipo de RHD y la expresión de la proteína RhD.

En la población Rh negativo para poblaciones no blancas, incluida la mestizo-mexicana con amplia variabilidad en la mezcla génica como la nuestra, la estrategia de estudio debe ser cuidadosamente diseñada para incluir diversos segmentos del gen RHD.

El haplotipo *cde*, al igual que los fenotipos del sistema Rh reportados en otras series, es el de mayor ocurrencia en nuestra muestra.

El mecanismo molecular principal mediante el cual se genera la condición Rh negativo en la muestra de sujetos evaluados es por la delección del gen *RHD*.

Contrario a nuestra hipótesis de trabajo, los mecanismos mixtos en la formación de genes híbridos del *RHD*, ocuparon el segundo lugar en frecuencia y no se identificó ningún caso del mecanismo molecular que implica la presencia del pseudogen *RHD ψ* .

V.1.Perspectivas.

Estos resultados generan un nicho de oportunidad para continuar con la investigación sobre la búsqueda de otros mecanismos moleculares distintos a la formación del pseudogen RHD ψ y orientarla hacia otras mutaciones del gen RHD, como la presencia del alelo *r's*, hecho que podría formar parte de esta línea de investigación, en proyectos futuros.

VI. Bibliografía

Baptista-González HA, Rosenfeld-Mann F, Pérez.Pérez J, Quintanar-García E. 1991. Anticuerpos irregulares antieritrocitarios fuera del sistema ABO en el periodo neonatal Bol Med Hosp Infant Méx; 48: 814-820.

Baptista-González HA. 2005. El sistema Rh, una mirada a fondo. Rev Med IMSS; 43 (Supl 1): 3-8.

Colin, Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel, V, Cartron, JP. 1991. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. Blood; 78: 2747-2752.

Daniels GL, Fletcher A, Garraty G, Henry S, Jorgensen J et al. 2004. Blood group terminology 2004; from de International society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens Vox Sang; 87: 304-316.

Daniels G. 2004. Molecular blood grouping Vox Sang; 87 (supp 1); S63-S66.

Duval GIA. 2007. Tesis de Maestría en CQB. Identificación de fenotipos poco frecuentes del sistema Rh y creación de un Banco de ADN de una muestra de sujetos del Valle de México. ENCB.

Gonzalez S, Jimenez LC, Hedges R, Huddart D, Ohman JC, Turner A et al. 2003. Earliest humans in the America: new evidence from México. J Hum Evol; 44: 379-87.

Grunbaum BW, Crim M, Selvin S, Myhere BA, Pace N. 1980. Distribution of gene frequencies and discrimination probabilities for 22 human blood genetic systems in four racial groups. J Forens Scien; 25: 428-444.

Klein J, Takahata N. 2002. Where Do We Come From? The molecular evidence for human descent. Berlin; Heidelberg: New York: Springer.

Legler TJ, Lynen R, Maas JH, Pindur G, Kulenkampff D et al. 2002. Prediction of fetal RhD and RhCcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. Transf Apher Sci; 27: 217-23.

Liker R. La Estructura Genética de la Población mexicana. Ed. Salvat. 1980.

Lisker R, Ramirez E, Briceno RP, Granados J, Babinsky V. 1990. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. Hum Biol; 62:791-801.

Lisker R, Perez BR, Granados J, Babinsky V, de Rubens J, Arrendares S, Buentello

L. 1986. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am J Phys Anthropol*; 71: 203-7.

Long CJ, Williams RC, McWahuley JF. 1991. Genetics variations in Arizona Mexican-Americans: estimation and interpretation of admixture proportions. *Am J Crit Anthropol*; 84: 141-57

Grootkerk-Tax MG, 2005. Rh Variability in Multi-Ethnic Perspective. Consequences for RH Genotyping. Ed. Thieme Med Center 2005a. The Netherlands.

Grootkerk-Tax MG, Maaskantn-van Wijk PA, van Drunen J, van der Schoot CE. 2005b. The highly variable RH locus in nonwhites persons hampers RHD zygosity determination but yields more insight into RH-related evolutionary. *Transfusion* 45: 293-4.

Martínez Montiel LM. Afro America I. La Ruta del Esclavo. Editorial PUMC 2006. México.

Menozi, A Piazza, and L Cavalli-Sforza. 1978. Synthetic maps of human gene frequencies in Europeans. *Science*; 201: 786-92

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. *Biochem Biophys Res Commun*; 263: 378-83.

Rodrigues A, Rios M, Pellegrino J Jr, Costa FF, 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: 767-73.

Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E et al. 2000. The presence of an RHD pseudogene containing 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*; 95:12-8.

Tiburcio V, Romero A, De Garay AL. 1978. Gene frequencies and racial intermixture in mestizo populations from México City. *Ann Hum Biol*; 5: 131-8.

Wagner FF, Flegel WA. 2004. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunoematol*; 20: 23-36.

Van der Schoot E, Martine Tax GH, Rinjnders JPR, de Haas M, Chritiaens CMLG. 2003. Prenatal typing of Rh and Kell blood group system antigens: The Edge of a watershed. *Trans Med Rev* 17: 31-44.

Wagner FF, Flegel, WA. 2000. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. Blood; 95: 3662-3668.

Wagner FF, Ladewing B, Angert KS, Herman GA, Eicher NI, Flegel WA. 2002. The DAU allele cluster of the RHD gene. Blood 100: 306-11.