

INMUNOHEMATOLOGÍA

I. Actualidades en el sistema Rh-Hr

Héctor A. Baptista-González*

El conocimiento sobre la estructura genética de los grupos sanguíneos, ha dado un salto cualitativo en los últimos 10 años. Los eventos moleculares que dan lugar a los antígenos eritrocitarios son diversos y complejos. Pueden ocurrir fenómenos de conversión o recombinación de genes (como es el caso del sistema MNS, Rh Ch/Rg), duplicación de un exón (Gerbich), delección de un gen, exón o nucleótido (ABO, MNS, Rh, Kell, Duffy, Dombrock, Gerbich) o inserción o substitución de un nucleótido (Rh, Colton).

El locus del Rh están compuesto de 2 genes estructuralmente, uno codifica al polipéptido RhD y el otro a los polipéptidos CcEe. El splicing alternativo del transcripto primario es considerado como el mecanismo más probable para los polipéptidos CcEe para un simple gen. Uno y otro grupos de polipéptidos (D y CE) difieren por 36 aminoácidos (8.4% de divergencia). La secuencia homóloga apoya el concepto que los genes evolucionaron a partir de la duplicación de un gen ancestral común. Este concepto es poyado por la identificación de los genes parecidos al RH observado en primates no humanos. Las proteínas Cc y Ee se producen por splicing alternativo de una mensajero de ARN. El gen RHD está flanqueado hacia ambos lados por dos cajas Rhesus, con alta homología. Está constituido por 10 exones. Los exones 4, 5 y 6 son críticos para los epítopes: D1, D2, D5, D6-7 y D8. El gen RHCE, está constituido también por 10 exones. Los exones 1 y 2 codifican la expresión Cc. El exón 5 codifica la expresión Ee.

Los marcos de lectura abierta de los genes RHD y RHCE presentan una orientación opuesta (Figura 1), enfrentados en la terminación 3' y separados por el gen SMP1. El gen RHD es flanqueado por dos segmentos de ADN, las cajas Rhesus, que contienen aproximadamente 9000 pb, con 98.6% de homología y orientación idéntica.

Para entender el mecanismo para la adquisición de la función de los genes duplicados en el proceso evolutivo, parte del hecho que el patrón de la variación alélica en los genes duplicados es determinado principalmente por el balance entre la conversión de genes. Este concepto opera en contra de la diversificación de genes duplicados y a su vez en la selección. La divergencia en la secuencia

de aminoácidos entre ambos genes señala un punto crítico en la región corta alrededor del exón 7- Este exón codifica los aminoácidos que caracterizan la diferencia entre los antígenos RhD y RhCE.

La homología entre humanos, gorilas, monos del nuevo mundo y monos del viejo mundo es a partir del gen antecesor común (gen RH-like), con la inserción del elemento *Alu-Sx* en el intrón 4. El elemento *Alu-Sx*, está presente en los humanos en el gen RHCE intrón 4. El gen RHD humano difiere del gen RHCE por la ausencia del *Alu-Sx*.

La controversia expuesta por Wiener en 1944, quién señaló la existencia de un solo gen con múltiples epítopes, mientras que la teoría de Fisher-Race que señaló la existencia de 2 genes estrechamente relacionados, pudo ser resuelta al ser clonado el gen del RHD comprando que ambas escuelas

Los antígenos del sistema Rh son transportado por una familia de proteínas de transmembrana hidrofóbicas, no glicosiladas de 30.32 kD. Estos antígenos están ausentes en los individuos con el fenotipo poco habitual Rh nulo. Las proteínas del sistema Rh (RhD y no RhD), exhiben una identidad de 92%. Los genes RHD y RHCE se organizan en grupos en la posición 1p36-p34 (cromosoma 1, brazo corto, región 2, banda 4, subbanda 4, subbanda 1 hasta banda 6).

Las proteínas del sistema Rh están limitadas a la células eritroides de vertebrados superiores y consisten en un tetrámero con 2 moléculas de RhAG y dos del Rh (CE o D). Las proteínas del sistema Rh se dividen en proteínas principales, como es RhD, RhCE y RhAG y las proteínas accesorias.

La proteína RhAg, se localiza en 6p21.1-p11, expresa al epítope MB2D10. Existe una relación ancestral con las proteínas del Rh (homología ~40% en la secuencia de aminoácidos) y presentan la misma orientación de las posiciones N-terminal y C-terminal. Es posible identificarla desde los progenitores CD34. Se expresa exclusivamente en la superficie del eritrocito y requieren obligadamente de la presencia de la proteína RhAG. Esta proteína comparte 39.2% en la secuencia de aminoácidos con RhCE y 38.5% con RhD. Se reconocen en el 3% de las

* Investigador titular en Hematología Perinatal, Instituto Nacional de Perinatología. Jefe del Banco de Sangre de Médica Sur.

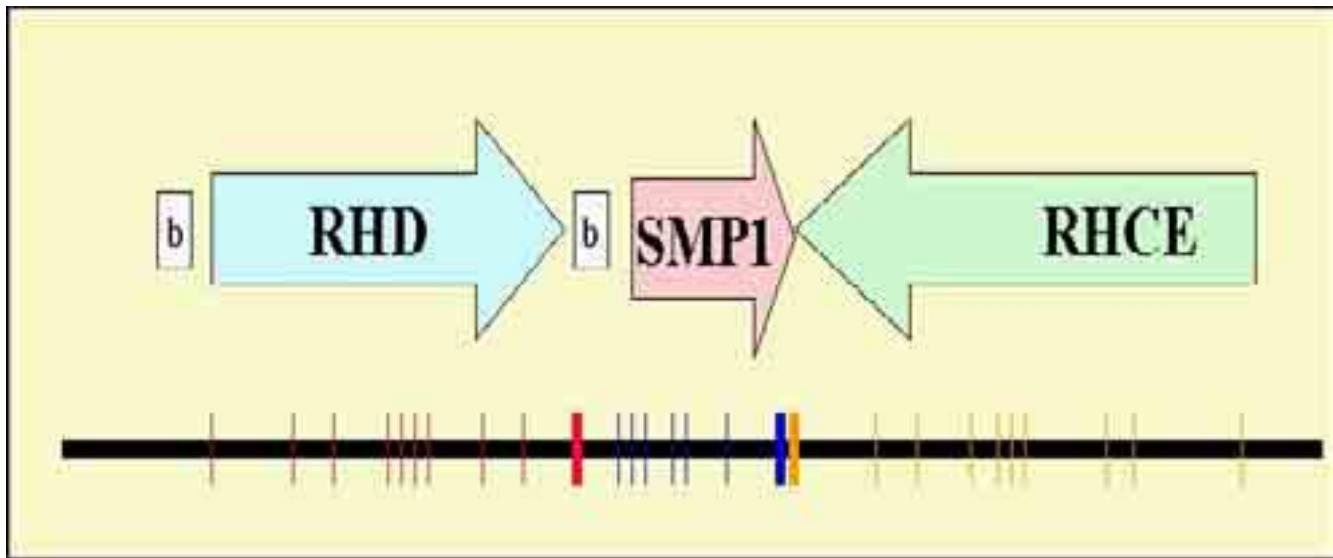


Figura 1. Locus del gen RH. El gen RHD está flanqueado hacia ambos lados por dos cajas Rhesus, con alta homología (b). Todos los exones son menores a 200 bp, con excepción de los exones terminales 3' del RHD y SMP1.

BFU-E y 68% de las CFU-E. Evolutivamente, las proteínas del sistema Rh presentan homología aproximada de 20% con el transportador del metilamino permeasa (Mep) y transportadores de amonio (Amt) de levaduras, bacterias y plantas. El gen RhAG-like está presente en *Caenorhabditis elegans* (nemátodo) y *Geodia cydonium* (esponja marina).

La proteína Rh CE Expresa los antígenos Ce, CE, ce, cE, está constituida por 417 aminoácidos. La proteína del C difiere de c por cuatro aminoácidos y la proteína del E difiere del e por un aminoácido (P226A). La correlación entre los epítopes del RhD y los polimorfismos de las proteínas del sistema Rh, no están completamente definidas. La substitución de un aminoácido (ser103pro) es el responsable del polimorfismo Cc, mientras que la substitución pro225ala es responsable de la especificidad Ee. La proteína RhD, expresa el antígeno D y está constituida por 417 aminoácidos. Se puede identificar desde las 6 semanas de la vida intrauterina (Figura 1).

Las proteínas accesorias del sistema Rh, son glicoproteínas relacionadas (+/-) con el fenotipo Rh null, que incluye a las estructuras Lw o ICAM-4 (Ag LW 19p13.3), IAP o CD47 (Ag no conocido, 3q13), GBP o sialoglicoproteína (N, S, s, U, 4q28-q31), banda 3 o AE1 (Diego, 17q12-q21) y la glicoproteína Fy o DARC.

Condición de los sujetos Rh negativo

Los mecanismos para explicar que un sujeto sea Rh negativo, son dependientes del grupo étnico en cuestión. Los mecanismos invocados son la delección parcial o total

del gen RhD (Rh(el)), la generación de alelos híbridos RHD/RHCE y la pérdida de expresión del RhD. En la mayoría de los haplotipos de los sujetos RhD negativo, están representados por la ausencia del gen RhD y con la presencia del gen RHCE, tal como ocurre en la mayoría de los sujetos RhD negativo de origen caucásico. En donadores de origen Japonés, se ha documentado que cerca de 27% de los donadores RhD negativo presentan delección parcial del gen RhD, observándose que se encuentra conservada e intacta la región promotora del gen RhD. Los fenotipos de esos donadores fueron CC o Cc, pero no cc. Esta diferencia parece ser derivada de la frecuencia de los fenotipos RhD negativo y RhC positivo o bien a las diferencias en las características de la glicoproteína asociada al sistema Rh o proteína Rh50. sin embargo, hay variaciones étnicas, pues aproximadamente 30% de los taiwaneses Rh negativo poseen el antígeno RhD(el), predominando el fenotipo Ccee. Esta es una variante poco frecuente, que puede contener al gen RhD intacto. En sujetos chinos del grupo Han, se ha observado al menos tres polimorfismos en sujetos Rh negativo. Estos incluyen en un nuevo haplotipo asociado al Rh negativo, que consiste en un alelo normal RHCE y un gen no funcional RhD.

Los puntos de ruptura de la delección RHD en los sujetos con haplotipo Rh negativo están localizados en una región idéntica de 1463 pb en la caja Rhesus. La estructura molecular del gen Rh, explica los mecanismos para la delección del gen RhD y la generación de los alelos híbridos RHD/RHCE. Cerca del 0.2% de los sujetos de raza blanca tienen reducción en la expresión del antígeno D, conocida como variante D débil (Du). La expresión del

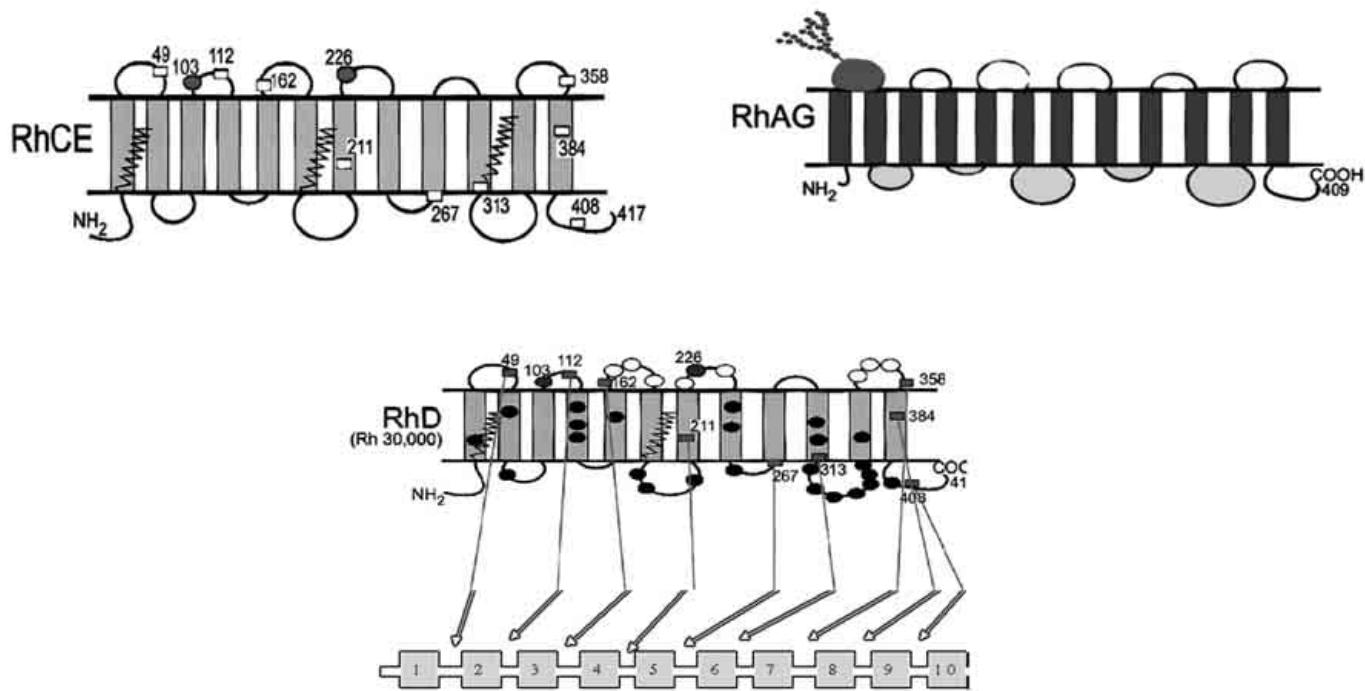


Figura 2. Topografía de las proteínas del sistema Rh en la membrana eritrocitaria.

D débil, no es una variante única. Existe multitud de polimorfismos que se relacionan con esta expresión. Hecho que dificulta su evaluación serológica, reportándose cada vez más variantes. Los sujetos con D débil, especialmente aquellos con menos de 400 sitios antígenicos, pueden desarrollar anti-D, luego de la exposición a eritrocitos Rh positivo.

Se ha observado que la sustitución de aminoácidos en la variante D débil, se puede localizar en los segmentos de proteínas de transmembrana e intracelulares, así como en los racimos de 4 regiones de la proteína (aminoácidos en la posición 2 a 12, alrededor de la 149, así como los aminoácidos 179 a 225 y los aminoácidos 267 a 397). Esto indica que los sujetos con fenotipo D débil, si bien no todos, es debido a una alteración cuantitativas de la proteína RhD.

Los individuos RhD positivo, pero con D parcial o variante de D, pueden producir anticuerpos anti-D, similar a al de los sujetos Rh negativo. El fenotipo D parcial ocurre en menos del 1% de la población europea. La base molecular principal es generalmente por conversión de genes, en la cual parte del gen RhD es substituido por sus respectivos segmentos del gen RhCE en una simple mutación sin sentido. En sujetos de raza negra de origen africano, debido a la presencia de alelos aberrantes del RHD (DAU-0 a DAU-4, Thr379met) es posible observar mayor frecuencia el desarrollo de anti-D en sujetos Rh positivo. Los fenotipos variantes de D, del 1 al 7, D(II) y

DFR, pueden desarrollar, posterior a una embarazo o transfusión incompatible. Los eritrocitos de estas variantes no expresan nueve determinantes (epD1 a epD9), los cuales normalmente componente la estructura del mosaico D.

Las pruebas moleculares pueden utilizarse junto con el estudio serológico y apoyar al diagnóstico de problemas inmunohematológicos. La reacción falsa positiva como RhD en sujetos Rh negativo, es una causa común de isoimmunización relacionada a la transfusión. Esto se debe a que diversas variantes del gen RhCE transportan secuencias de aminoácidos, específicas del RhD y provocar reacción de aglutinación, especialmente con el uso de reactivos anti-D de origen monoclonal.

Determinación de la cigocidad al RhD

Es un problema común ante la pareja donde el es RhD positivo y ella, isoimmunizada es Rh negativo y se desea establecer el estado de cigocidad del varón para estimar las probabilidades o no de que ambos tengan un hijo Rh negativo. Sin embargo, se vislumbra una señal esperanzadora para estas parejas, especialmente con el advenimiento de las técnicas de PCR en tiempo real o ELISA basada en PCR. Mediante estas técnicas es posible establecer el efecto de la dosis del gen RhD en el varón.

Identificación del Rh fetal presente en la circulación materna

En algunos reportes de la literatura se ha descrito que se pueden obtener hasta 25 eritroblastos fetales por mililitro de sangre materna obtenida. Este valor corresponde a la concentración 500 veces mayor que el promedio de células fetales presentes en la circulación maternal con un porcentaje de recuperación promedio de 45.55% de los eritroblastos contenidos originalmente.

Es posible identificar el genotipo del RhD por amplificación directa de la muestra de sangre materna, usando la capa leuco-eritroide. El gen RhD ha sido amplificado por PCR. Sin embargo, como los leucocitos fetales pueden sobrevivir en la circulación materna durante varios años luego del nacimiento este hecho presenta la probabilidad de enfrentarnos a resultados falsos positivos. Por otro lado, técnicamente es muy difícil separar los leucocitos fetales de los maternos. Igualmente. La estrategia de amplificación directa puede generar falsos negativos debido al bajo número de células fetales presentes en la circulación materna.

En constaste, los eritroblastos están presentes en tal cantidad durante el proceso de aislamiento que es posible obtenerlos aun en etapas tempranas del embarazo, con la ventaja de que su vida media es de 25 a 35 días en la circulación materna.

Referencias

1. Huang CH. The human Rh50 glycoprotein gene. *J Biol Chem* 1998;273:2207-13.
2. Chérif-Zahar B, Le van Kim C, Bailly P, Cartron JP, Colin Y. Localization of the Human Rh Blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p.36.1 by *in situ* hybridization. *Hum Genet* 1991;86:396.
3. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Pennec PY, Roussel M, Patereau C, Noizat-Pirenne F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion*. 2004;44:1282-6.
4. Chen JC, Lin TM, Chen YL, Wang YH, Jin YT, Yue CT. RHD 1227A is an important genetic marker for RhD(el) individuals. *Am J Clin Pathol* 2004;122:193-8.
5. Rouillac-Le Scellour C, Puillandre P, Gillot R, Baulard C, Metral S, Le Van Kim C, et al. Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol Diagn*. 2004;8:23-31.
6. Randen I, Hauge R, Kjeldsen-Kragh J, Fagerhol MK. Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. *Vox Sang*. 2003;85:300-6.
7. Wagner FF, Ladewig B, Flegel WA. The RHCE allele ceRT: D epitope 6 expression does not require D-specific amino acids. *Transfusion*. 2003;43:1248-54.
8. Frohn C, Dumbgen L, Brand JM, Gorg S, Luhm J, Kirchner H. Probability of anti-D development in D+ patients receiving D+ RBCs. *Transfusion*. 2003;43:893-8.
9. Perco P, Shao CP, Mayr WR, Panzer S, Legler TJ. Testing for the D zygosity with three different methods revealed altered Rhesus boxes and a new weak D type. *Transfusion*. 2003;43:335-9.
10. Hundhausen T, Petershofen EK, Doescher A, Bauerfeind U, Muller TH, Schunter F. RHCE-D-CE hybrid genes can cause false-negative DNA typing of the Rh e antigen. *Vox Sang*. 2002;83:268-72.
11. Wagner FF, Flegel WA. RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. *Blood* 2002;99:2272-3.
12. Ekman GC, Billingsly R, Hessner MJ. Rh genotyping: avoiding false-negative and false-positive results among individuals of African ancestry. *Am J Hematol*. 2002 Jan;69(1):34-40.
13. Baptista-GH, Rosenfeld MF. Frecuencia de los antígenos eritrocitarios del sistema Rh-Hr en los cónyuges de pacientes Rh negativo. *Perinatol Reprod Hum* 1993;7:44-48.
14. Saavedra TM, Rosenfeld MF, Baptista González HA. Identificación molecular del gen RhD mediante PCR. *Perinatol Reprod Hum* 1998;12:82-89.
15. Baptista GH, Rosenfeld MF, Leiss MMT. Prevención de la isoimunización al RhD, con gamma globulina anti-D. *Salud Pública (Méx)* 2001;43:52-58.
16. Baptista GHA, Rosenfeld MF, Leis MT. Aislamiento e identificación de células fetales presentes en la circulación materna. *Bol Med Hosp Infant Méx* 2001;58:362-369.