

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN *RHD* EN PACIENTES CHILENOS
CON EL FENOTIPO D DÉBIL O PARCIAL**

GISSELLE NATHALIE BARRA RETAMAL

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN GENÉTICA**

Director de Tesis: Jorge Osvaldo Fernández Ordenes.
Luisa Marcela Herrera Cisterna.
Elena Gloria Llop Romero

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la(el) candidata(o)

GISSELLE NATHALIE BARRA RETAMAL

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Genética en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 2 de abril de 2018.

Profs. Drs.

Jorge Osvaldo Fernández Ordenes.

Luisa Marcela Herrera Cisterna.

Elena Gloria Llop Romero

.....
Directores de Tesis
Instituto de Salud Pública
Programa de Genética Humana

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Lucía Cifuentes.
Presidente Comisión

Prof. Dra. Silvia Castillo.

Prof. Dra. Leonor Bustamante.

Prof. Dr. José Suazo.

Índice

Sección	Página
Resumen.....	2
Índice de figuras.....	3
Índice de tablas.....	4
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Sistema de grupo sanguíneo Rh.....	9
Fenotipos D débil, DEL y parcial.....	13
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	17
Materiales y métodos.....	18
Obtención de muestras.....	18
Extracción de ADN.....	18
Síntesis de oligonucleótidos.....	18
Amplificación mediante PCR.....	19
Purificación de productos PCR.....	19
Secuenciación de exones del gen <i>RHD</i>	21
Clonación de productos PCR.....	22
Análisis de secuencias.....	22
Análisis de mutaciones.....	22
Resultados.....	24

Estandarización de la técnica de amplificación por PCR de ADN.....	24
Secuenciación y análisis de secuencias.....	26
Predicción de efecto de mutaciones.....	34
Discusión.....	36
Análisis de mutaciones identificadas.....	36
Impacto funcional posible de las mutaciones.....	43
Diferencias poblacionales.....	47
Conclusión.....	50
Bibliografía.....	53

Índice de Figuras

Figura	Página
Figura 1. Diagrama de genes <i>RHD</i> y <i>RHCE</i>	9
Figura 2. Estructura de la proteína RhD y posición de algunos cambios aminoacídicos reportados en pacientes con fenotipo D débil.....	11
Figura 3. Conversión génica de la variante DVI.....	14
Figura 4. Esquema del gen <i>RHD</i> y la posición de los partidores utilizados para la amplificación por PCR y secuenciación.....	20
Figura 5. Diagrama de estrategia experimental.....	22
Figura 6. Resultados de amplificación mediante PCR de exones del gen <i>RHD</i> .	24
Figura 7. Electroferogramas representativos de las cuatro mutaciones exónicas identificadas.....	28
Figura 8. Electroferogramas correspondientes al borde intrón 5 - exón 6 de muestra 17-43366.....	29

Índice de Tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen <i>RHD</i>	19
Tabla 2. Mutaciones identificadas.....	30
Tabla 3. Resumen de mutaciones identificadas.....	32
Tabla 4. Predicciones de efecto de mutaciones exónicas sobre la función de la proteína.....	33
Tabla 5. Predicción de efecto de mutación intrónica c.1073+170G>A en splicing.....	35
Tabla 6. Estudios realizados en diferentes poblaciones donde se reportan las mutaciones asociadas a los fenotipos DEL y débil identificadas este estudio.....	37

Abreviaturas

RHD : Gen codificante para la proteína del antígeno D.

RhD : Proteína codificada por el gen *RHD*.

RHCE: Gen codificante para la proteína C y E.

RhCE : Proteína codificada por el gen *RHCE*.

RHAG: Gen codificante para la proteína *Rh-associated glycoprotein*.

DEL : Abreviatura de Anti-D adsorbed and Elution. Fenotipo que presenta una reacción de aglutinación más débil que los fenotipos “Rh débil”.

ISBT : International Society of Blood Transfusion.

ADN : Ácido desoxirribonucleico.

PCR : Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PEG : Polietilenglicol.

pGEMT: Plásmido utilizado para clonar fragmentos de PCR.

NCBI : National Center for Biotechnology Information.

PROVEAN : Software Protein Variation Effect Analyzer.

SIFT : Software Sorting Intolerant From Tolerant.

HSF : Human Splicing Finder.

SSP-PCR : Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction.

Leu : Aminoácido Leucina.

Pro : Aminoácido Prolina.

Trp : Aminoácido Triptofano.

Arg : Aminoácido Arginina.

Val : Aminoácido Valina.

Gly : Aminoácido Glicina.

Ala : Aminoácido Alanina.

HSF : Human Splicing Finder

ESS : Silenciador de splicing exónico (Exonic Splicing Silencers).

IIE : Elementos de identidad intrónica (Intron-identity elements).

ESR : Secuencias regulatorias de splicing exónico (Exon-identity elements).

Resumen

Los grupos sanguíneos se clasifican de acuerdo a los antígenos presentes en los glóbulos rojos. En el sistema de clasificación Rh no siempre es posible determinar inequívocamente el grupo sanguíneo, en cuyo caso los pacientes son clasificados como D débiles o parciales. El antígeno D es codificado por el gen *RHD*, y su análisis puede ser utilizado como una herramienta complementaria a los métodos serológicos convencionales.

En el presente trabajo se secuenciaron los exones y las secuencias aledañas del gen *RHD* en 35 pacientes previamente clasificados mediante pruebas inmunológicas como D débiles o parciales.

Se identificó una mutación relacionada al fenotipo débil o parcial en 31 de los 35 pacientes (88,57%), mientras que en 4 pacientes sólo se identificaron mutaciones intrónicas no relacionadas al fenotipo débil o parcial. La mutación del exón 1 c.46T>C, asociada al fenotipo DEL, fue identificada en 60% de las muestras, mientras que las mutaciones asociadas al fenotipo débil c.182G>T (exón 2), c.1148T>C (exón 8) y c.1154G>C (exón 9) fueron identificadas en el 14,29%, 11,43% y 2,78% de los pacientes respectivamente. El haplotipo con las mutaciones c.46T>C (exón 1), c.-368A>G (región 5') y c.1154-31T>C (intrón 8) presentó la mayor frecuencia entre las muestras estudiadas (48,57%). Las cuatro mutaciones exónicas identificadas habían sido reportadas previamente en Argentina con prevalencias menores a las de Chile, pero mayores que las europeas.

Estos resultados permiten conocer en mayor profundidad la diversidad genética del sistema Rh en pacientes chilenos con fenotipos DEL o débil, lo que presenta especial importancia clínica en transfusiones sanguíneas, transplantes y embarazos.

Abstract

The blood groups are classified according to the antigens present in the red blood cells. In the Rh system is not always possible to determine the blood group unequivocally, in which case the patients are classified as weak or partial D. The D antigen is encoded by the RHD gene, and the genetic analysis of this gene can be used as a complementary tool to conventional serological methods.

In the present study were sequenced the exons and the surrounding sequences of the RHD gene from 35 patients previously classified by immunological tests as weak or partial D.

A mutation related to the weak or partial phenotype was identified in 31 of the 35 patients (88.57%), whereas in 5 patients only intronic mutations unrelated to the weak or partial phenotype were identified. The mutation of exon 1 c.46T>C, associated with the DEL phenotype, was identified in 60% of the samples, whereas the mutations associated with the weak phenotype c.182G>T (exon 2), c.1148T>C (exon 8) and c.1154G>C (exon 9) were identified in 14.29%, 11.43% and 2.78% of the patients respectively. The haplotype with the mutations c.46T>C (exon 1), c.-368A>G (5' region) and c.1154-31T>C (intron 8) presented the highest frequency among the samples studied (48.57%). The four exonic mutations identified had previously been reported in Argentina with lower prevalences than those of Chile, but higher than those of Europe.

These results allow knowing in greater depth the genetic diversity of the Rh system in Chilean patients with DEL or weak phenotypes, which has special clinical importance in blood transfusions, transplants and pregnancies.

Introducción

Los grupos sanguíneos corresponden a sistemas genéticos que codifican para antígenos que se expresan en la membrana de los glóbulos rojos. Existen numerosos sistemas de grupos sanguíneos, de los cuales los más estudiados son los sistemas del grupo sanguíneo ABO y Rh debido a su importancia clínica (1). El sistema ABO fue descrito en 1900 por Karl Landsteiner y clasifica la sangre en cuatro grupos que expresan diferentes antígenos en la superficie de los glóbulos rojos; estos son el antígeno A, B, AB y molécula H en el caso del grupo O. El segundo sistema más importante de clasificación sanguínea es el sistema Rh (Rhesus), descrito en 1940 por Karl Landsteiner y Wiener. En comparación con el sistema ABO, el sistema Rh es mucho más complejo, debido a que los genes codificantes para la expresión de antígenos son altamente polimórficos (2).

A diferencia del sistema ABO, en la sangre de individuos Rh negativo no existen anticuerpos anti-D a menos que el individuo Rh negativo haya sido expuesto previamente a glóbulos rojos Rh positivos, lo que provoca la generación de anticuerpos anti-D (2).

Sistema de grupo sanguíneo Rh:

El sistema Rh se determina en base a dos genes altamente homólogos denominados *RHD* y *RHCE* (Figura 1A). Los genes *RHD* y *RHCE* se generaron por duplicación génica de un gen ancestral, presentan 90% de homología y cada uno de ellos contiene 10 exones, (Figura 1C). Los genes *RHD* y *RHCE* se encuentran en orientación opuesta en la banda 1p34-36 del cromosoma 1 y separados por aproximadamente 30,000 bp, donde se ubica el gen *SMP1*. Este último gen no tiene relación con las funciones de los genes Rh (3).

Los genes *RHD* y *RHCE* son muy similares entre sí con más de un 90% de identidad. Ambos genes codifican para proteínas conformadas por 417 aminoácidos distribuidos en 6 asas extracelulares y 12 dominios transmembrana (Figura 1B). Las proteínas RhD y RhCE presentan diferencias de entre 30 a 35 aminoácidos aproximadamente.

El gen *RHD* tiene 2 alelos en la población, un alelo dominante “D” codificante para la proteína D y un alelo recesivo “d” que corresponde a la delección completa del mismo gen.

El gen *RHCE* tiene cuatro alelos codominantes, denominados CE, cE, Ce y ce, cada uno de los cuales codifica para las proteínas o antígenos del mismo nombre (Figura 1A y 1B) (4).

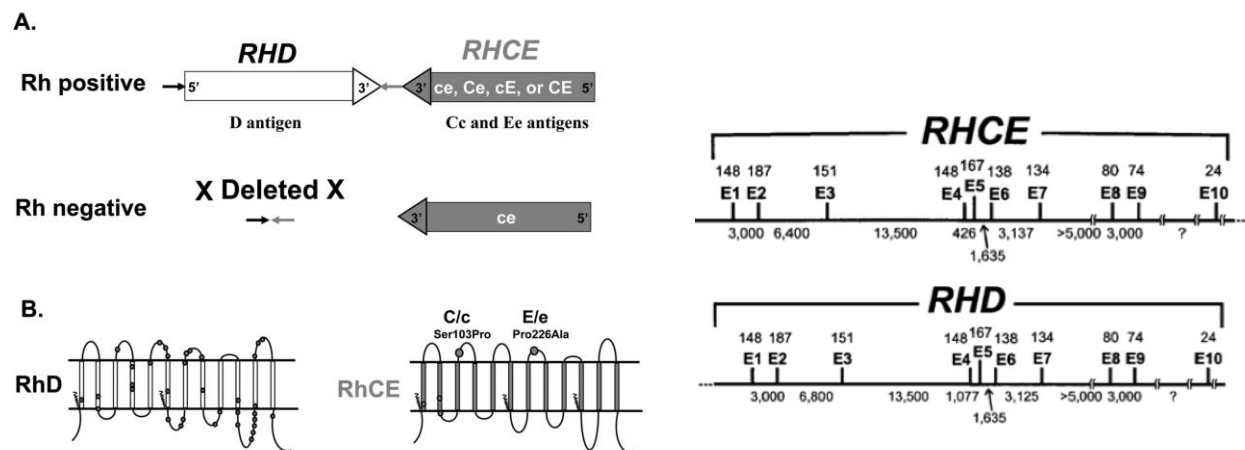


Figura 1: Diagrama de genes *RHD* y *RHCE*. **A.** Se señala orientación opuesta de genes *RHD* y *RHCE*. Se observa la delección del gen *RHD* que determina un fenotipo Rh negativo. **B.** Topología de proteínas RhD y RhCE en la membrana de los glóbulos rojos con 12 dominios de transmembrana. En RhD se observan en círculos oscuros las posiciones de aminoácidos que difieren con la proteína sintetizada a partir del gen *RHCE*. En RhCE se observa la posición de los cambios aminoacídicos responsables de los polimorfismos C/c o E/e. **C.** Esquema de estructura de los genes *RHCE* y *RHD*. Los exones están indicados con una letra E y el número correspondiente. El tamaño de los exones codificantes está indicado sobre la línea mientras que el tamaño de los intrones es indicado bajo la línea. Westhoff CM. Semin Hematol. 2007;44(1):42-50 (4). Avent ND, Reid ME. 2000;95(2):375-87 (5)

La secuencia aminoacídica de los antígenos RhCE que se expresen depende de las sustituciones genéticas existentes; las variantes C o c se localizan en la segunda asa extracelular de la proteína RhCE, mientras que las variantes E o e se localizan en la cuarta asa extracelular (Figura 2) (5, 6). Los antígenos Rh se expresan en etapas tempranas de la diferenciación eritropoyética. Además de los genes *RHD* y *RHCE*, existe otro gen homólogo, *RHAG* (Rh-associated glycoprotein), que codifica para la proteína RhAG, la que se relaciona con la expresión de las proteínas *RHD* y *RhCE*. La glicoproteína RhAG presenta un 38,5% y 39,2% de homología con las proteínas RhD y RhCE respectivamente (5). Las proteínas del sistema Rh se expresan en forma de tetrámero formado por dos moléculas de la proteína RhAG y dos de las proteínas RhD o RhCE (2, 4, 7, 8). Si la proteína RhAG no está presente, no se puede formar el tetrámero y se pierde por completo la expresión de los antígenos Rh. Por esta razón, existen mutaciones en el gen *RHAG* que interfieren directamente con la normal expresión de los antígenos Rh (4, 7, 9).

La función biológica del sistema Rh permanece sin ser comprendida completamente. En levaduras, bacterias y plantas simples las proteínas Rh presentan un 20% de homología con transportadores cuya función es la eliminación de metilamina y amonio en altas concentraciones, sin embargo, es improbable que la función del sistema Rh sea la misma en seres humanos, ya que en animales superiores existen sistemas más complejos de eliminación de amonio. Se ha propuesto que las proteínas Rh en humanos podrían relacionarse con el co-transporte de amonio en conjunto de otros cationes, sin embargo es necesario realizar más estudios para poder determinar realmente la función de estas proteínas (5, 10, 11).

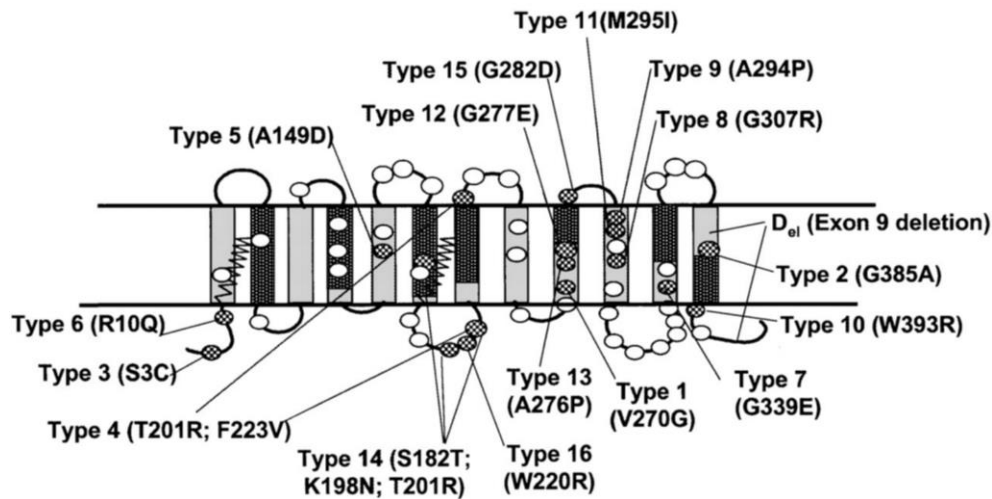


Figura 2. Estructura de la proteína RhD y posición de algunos cambios aminoacídicos reportados en pacientes con fenotipo D débil. Las mutaciones representadas en esta figura son principalmente *missense*. Los círculos grises indican las los cambios aminoacídicos generados como consecuencia de las mutaciones. Los aminoácidos específicos para la proteína RhD presentes en el gen *RHD* son indicados con círculos en blanco. En la membrana las regiones de secuencias conservadas dentro de la familia Rh están marcadas en rectángulos negros, mientras que los sitios no conservados son indicados como rectángulos grises. El “tipo” de mutaciones fueron numeradas en forma consecutiva en relación a la fecha de reporte, no a su posición en la proteína. Avent ND, et al. *Blood*. 2000;95(2):375-87. (5, 12).

En el sistema de grupo sanguíneo Rh la presencia o ausencia del antígeno D confiere la clasificación de Rh positivo (+) o negativo (-) respectivamente. La importancia clínica de la determinación del grupo Rh radica en las reacciones hemolíticas que ocurren cuando se realiza una transfusión sanguínea entre individuos con grupos no compatibles. Específicamente, cuando una persona con grupo sanguíneo Rh negativo recibe sangre de un donante Rh positivo, el sistema inmune del receptor destruye los glóbulos rojos recibidos durante la transfusión, reacción que puede ser incluso potencialmente mortal (2, 13). Es por eso que cada

vez que se realiza una transfusión de sangre se deben realizar pruebas inmunohematológicas para la determinación del grupo sanguíneo (14).

Fenotipos D débil, DEL y parcial.

Durante las pruebas para determinar el grupo sanguíneo de un paciente se detecta en algunas personas una reacción débil ante el anticuerpo anti-D. Estas personas son normalmente catalogadas como D débil o parcial (4).

Los fenotipos D débil o DEL corresponden a pacientes cuyos eritrocitos poseen una cantidad reducida del antígeno D (diferencia cuantitativa respecto a la variante positiva). El fenotipo DEL es una subclasificación del fenotipo D débil, y puede ser diferenciado de otros sólo mediante técnicas genéticas, ya que debido a su bajo o nulo nivel de reacción de aglutinación, generalmente es clasificado como RH negativo. El nombre del fenotipo DEL se debe a que originalmente sólo podía ser detectado mediante una técnica de Anti-D adsorbed and Elution, por lo que se utilizaron las iniciales de la técnica para referirse a ese fenotipo (15).

El fenotipo D parcial corresponde a pacientes cuyos eritrocitos carecen de una porción del antígeno D (diferencia cualitativa respecto a la variante positiva), por lo que al recibir glóbulos de pacientes positivos puede ocurrir una aloinmunización (5, 16). Esta aloinmunización no ocurre en los pacientes con fenotipo D débil por lo que es importante también discriminar genéticamente entre D débil y D parcial, aunque su aglutinación sea indistinguible.

Cuando no se tiene certeza del grupo Rh de un paciente, se recomienda la interpretación de una variante débil o parcial como Rh positivo en el caso de un donante y como Rh negativo en el caso de un receptor (14, 16), para así evitar

posibles reacciones de rechazo de transfusión. Esto es un problema especialmente en los receptores, porque cuando estos requieren transfusión de sangre se les debe transfundir sangre Rh negativa, que es generalmente escasa en los bancos de sangre.

Un fenotipo D débil o parcial puede expresarse a partir de diferentes genotipos. Frecuentemente D débil se asocia a mutaciones en el gen *RHD* y se han descrito al menos 98 variantes en el gen *RHD* que han sido asociadas con fenotipo D débil, de acuerdo a International Society of Blood Transfusion (ISBT) y la base de datos RhesusBase. La figura 2 muestra la estructura de la proteína RHD y algunos de los cambios aminoacídicos generados por estas mutaciones (17).

Se han reportado mutaciones asociadas al fenotipo D débil en regiones codificantes para dominios transmembrana, citoplásmicos, regiones conservadas y no conservadas, sin embargo la mayoría de las mutaciones han sido reportadas en dominios no conservados entre las diferentes proteínas de la familia Rh (Figura 2) (5, 18-20).

Actualmente en la base de datos RhesusBase (21) existen más de 400 mutaciones reportadas a lo largo de todo el gen *RHD* (Figura 2), muchas de las cuales (98 variantes) se encuentran asociadas al fenotipo D débil. Desde el año 1995 en la base de datos antes mencionada, la información de nuevas mutaciones ha aumentado exponencialmente, permitiendo así entender de mejor manera la relación entre los genotipos y fenotipos del gen *RHD*.

En relación a los tipos de mutaciones, se han descrito, mutaciones de sentido erróneo (missense), inserciones y deleciones en los 10 exones del gen *RHD*. Dichas mutaciones pueden afectar la eficiencia y la cantidad de proteína que logra insertarse

dentro de la membrana de los eritrocitos, pudiendo expresar el fenotipo D débil o parcial de acuerdo a la mutación que se produzca (12) (Figura 2).

Algunos fenotipos D parciales pueden ocurrir mediante conversión génica, esto sucede cuando se reemplaza una región del gen *RHD* por una región del gen *RHCE*. Esto se produce cuando dos genes homólogos, en este caso *RHD* y *RHCE*, se encuentran de forma adyacente, lo que facilita la transferencia de una región de un gen al gen vecino, formando un alelo que codifica para una proteína híbrida (Figura 3).

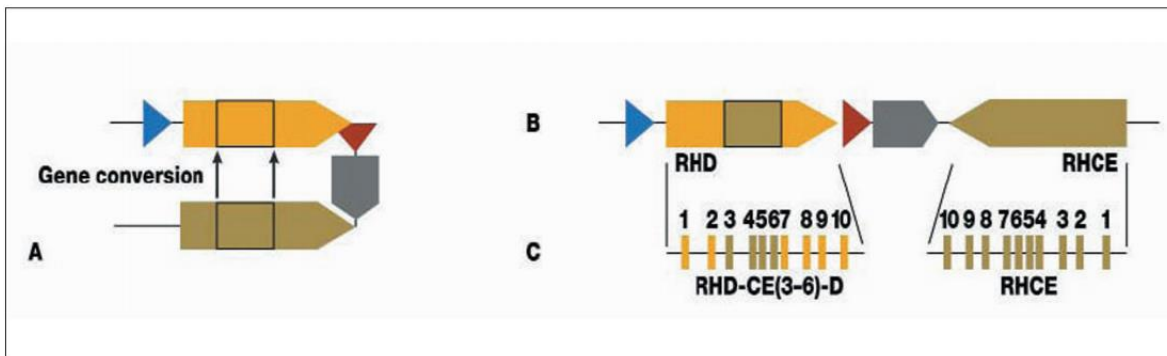


Figura 3. Conversión génica de la variante DVI. Este tipo de conversión ocurre en el alelo RHD-CE(3-6)-D, que codifica para la variante VI tipo 3 del gen *RHD*. En el gen *RHD* los exones 3 al 6 son sustituidos por los exones homólogos del gen *RHCE*. Flegel WA. Blood Transfus. 2007;5(2):50-7. (22)

En las variantes de D parcial algunos o muchos epítopes de la proteína RhD están ausentes. Al realizar ensayos de los resultados obtenidos al exponer a los glóbulos rojos de pacientes D parciales con anticuerpos de otros pacientes D parciales, se observaron diferencias serológicas que llevaron a definir así categorías nombradas con números romanos desde II al VII (la categoría I se encuentra obsoleta). Posteriormente, análisis con anticuerpos monoclonales y técnicas como la secuenciación genética se determinaron nuevas subvariantes en base a las

diferencias en su secuencia aminoacídica. Estas nuevas variantes han sido designadas con una nomenclatura de tres letras, como DBT, DFR y DHAR (5, 23).

En la figura 3 se observa la variante D parcial DVI, sin embargo, existen 4 subcategorías de esta variante, las que dependen del gen híbrido que se genere durante la conversión (23).

Debido a que las diferencias entre los fenotipos débiles, DEL y parcial sólo son detectables a nivel genético y no fenotípico, el análisis genético del gen *RHD* ha sido propuesto como un método molecular concluyente para la clasificación del grupo sanguíneo Rh, especialmente en casos donde existe discrepancia o no hay resultados claros en las pruebas serológicas (24).

El laboratorio de Hematología e Inmunohematología del Instituto de Salud Pública de Chile recibe muestras clasificadas como D débiles o parciales, dichas muestras son enviadas voluntariamente por servicios de salud de todo el país para intentar definir la correcta clasificación sanguínea Rh. Sin embargo, luego de realizar pruebas con kits comerciales para la determinación del genotipo Rh y después de repetir las pruebas inmunohematológicas, un grupo de muestras continúan siendo clasificadas como D débiles o parciales, sin que se logre realizar la identificación del sistema Rh. El objetivo de este estudio es identificar mutaciones en el gen *RHD* que estén relacionadas a los fenotipos débil o parcial en muestras recibidas entre los años 2013 al 2016 en el Instituto de Salud Pública.

Hipótesis

Pacientes cuyas muestras de sangre han sido clasificadas como D débiles o parciales según tipificación serológica del sistema de Rh presentan mutaciones en la región codificante del gen *RHD*, lo que explica una reacción débil al realizar las técnicas de identificación del grupo sanguíneo.

Objetivos

Identificar mutaciones en la región codificante del gen *RHD*, que expliquen las causas del fenotipo D débil o parcial en pacientes chilenos.

Objetivos específicos

1. Secuenciar los 10 exones del gen *RHD* en muestras de 35 personas con fenotipo D débil o parcial.
2. Relacionar las mutaciones identificadas con el fenotipo expresado en el sistema Rh.
3. Estudiar el posible efecto a nivel de proteína de las mutaciones identificadas en exones codificantes y que no hayan sido reportadas anteriormente.

Materiales y métodos

1. Obtención de muestras:

Entre los años 2013 y 2016 se han recibido en el Instituto de Salud Pública 100 muestras provenientes de laboratorios de todo el país con el objetivo de identificar la variante Rh en pacientes clasificados como D débil o parcial. Mediante técnicas serológicas y el uso de kits comerciales para la identificación de muestras D débiles se logró la clasificación en 65 pacientes. Sin embargo 35 pacientes siguieron siendo clasificadas como D débiles o parciales. Las muestras de estos pacientes fueron seleccionadas para realizar el análisis genético del gen *RHD*.

2. Extracción de ADN:

Se realizó la extracción de ADN desde muestras de sangre mediante el uso de un kit comercial marca Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante, removiendo los posibles contaminantes o inhibidores presentes en la muestra. El ADN purificado fue conservado congelado a -80°C hasta su uso. Posteriormente, se realizó la cuantificación del ADN antes de su uso en un equipo de espectrofotometría NanoDrop 2000.

3. Síntesis de oligonucleótidos:

Se utilizó el equipo MerMade 4 para realizar la síntesis de los 34 partidores (Tabla 1) que fueron utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *RHD* de acuerdo a lo descrito por T.J. Legler, et al (24).

4. Amplificación mediante PCR:

Se amplificaron mediante PCR los 10 exones que componen el gen *RHD*, usando los partidores descritos por Legler T.J. et al. *Transfus Med.* 2001;11(5):383-8 (Figura 4 y Tabla 1). Se utilizó un protocolo de amplificación consistente en una denaturación inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación consistentes en etapas de 92°C por 20 segundos, 64°C por 30 segundos y 68°C por 90 segundos. La temperatura de alineamiento utilizada fue diferente para los exones 5 y 7 (60°C). Se realizó una elongación final de 5 minutos a 72°C. Los productos PCR fueron visualizados en un gel de agarosa tipo II al 2%. Los productos fueron migrados a 120 V por 35 minutos y posteriormente fueron visualizados en un transluminador Gel Doc XR.

5. Purificación de productos PCR:

En los casos en los que se obtuvo un producto PCR con una amplificación única, se realizó un protocolo de purificación utilizando PEG 8000 NaCl 2,5 M y precipitación con etanol 70%. En los productos PCR donde se observaron amplificaciones inespecíficas se realizó la purificación del producto con el kit comercial "GeneJET Gel Extraction Kit" de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En ambos métodos los productos purificados fueron migrados en un gel de agarosa tipo II al 2% y visualizados en un transluminador Gel Doc XR.

Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen RHD (24).

Partidor	Orientación 5' 3'	Posición respecto a exón	Tamaño del producto (pb)
Ds1-s Ds1-a Ds1-seq (re01)	TCAACTGTGTAACATGAGGAGTCAG GCTATTTGCTCCTGTGACCACTT TCCATAGAGAGGCCAGCACAA	-554 +18 -132	767
Ds2-s Ds2-a Ds2-seq 16920RHDFW 17378RHDRV	TGACGAGTGAAACTCTATCTCGAT GGCATGTCTATTTCTCTCTGTCTAAT CCTGGATTCTTGTGATACACG AGTTGAGAACATTGAGGCTCAA GCTGTGCAATATTTAGGACATCC	-1037 +330 +206 -894 +108	1602 ó 1380*
Ds3-s (rb20d) Ds3-a Ds3-seq (rb21)	GTCGTCCTGGCTCTCCCTCTCT CTTTTCTCCCAGGTCCCTCCT GGTCCCTCCTCCCAGCAC	-8 +19 +11	219
Ds4-s Ds4-a Ds4-seq (rb22)	GCCGACACTCACTGCTCTTAC TGAACCTGCTCTGTGAAGTGC GGGAGATTTTTTCAGCCAG	-16 +174 +64	378
Ds5-s (rb11) Ds5-a (rb15) Ds5-seq (rb24)	TACCTTTGAATTAAGCACTTCACAG TTATTGGCTACTTGGTGCC AGACCTTTGGAGCAGGAGTG	-243 +1006 -34	1458
Ds6-s Ds6-a Ds6-seq	CAGGGTTGCCTTGTTCCTCA CTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG CTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG	-77 +21 +21	274
Ds7-s (re 621) Ds7-a (re 75) Ds7-seq	CATCCCCCTTTGGTGGCC AAGGTAGGGGCTGGACAG GTCTCACCTGCCAATCTGCT	-85 +152 -22	405
Ds8-s Ds8-a Ds8-seq (re73)	GGTCAGGAGTTCGAGATCAC TGGCAATGGTGAAGAAAGG AGTCCTTTTTGTCCCTGATGACC	-574 +16 -49	708
Ds9-s Ds9-a (re93) Ds9-seq (re82) 53907 EX9RHD FW 54919 EX9RHD RV	TGCAGTGAGCCGAGGTCAC CACCCGCATGTCAGACTATTTGGC GAGATTAATAATCCTGTGCTCCAAAC CATGCCTGTAATACTAGCACTTT AAGTGCTGGGATCACAGGCGTG	-284 +298 -31 -471 +446	697 ó 895¥
Ds10-s (re91) Ds10-a (rr4) Ds10-seq (rr3)	CAAGAGATCAAGCCAAAATCAGT AGCTTACTGGATGACCACCA CAGTCTGTTGTTACCAGATGTTGTTAT	-45 +271 +234	381

* El tamaño de 1602pb se obtiene con los partidores Ds2-s y Ds2-a. El tamaño de 1380pb se obtiene con los partidores Ds2-s y 17378RHDRV.

¥ El tamaño de 697pb se obtiene con los partidores Ds9-s y Ds9-a, mientras que el tamaño de 895pb se obtiene con los partidores 53907EX9RHD FW y Ds9-a.

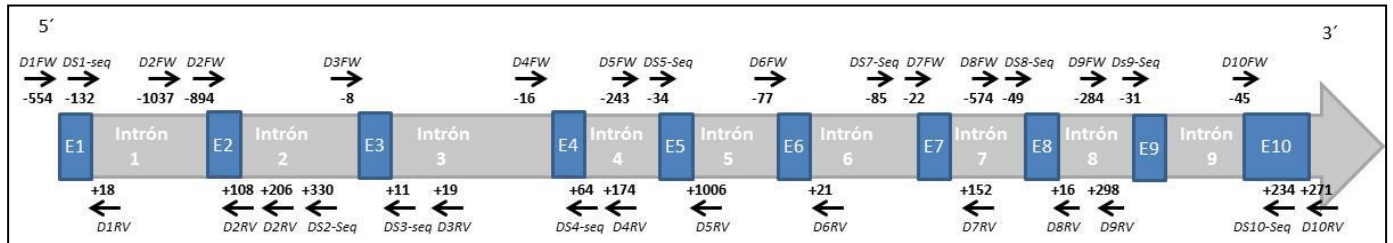


Figura 4. Esquema del gen *RHD* y la posición de los partidores utilizados para la amplificación por PCR y secuenciación. Los exones son indicados con una letra E y los números correspondientes. Con flechas se indica la posición y dirección de cada partidor. Con números se indica la posición del partidor con referencia al exón codificante más cercano. Sólo el exón 10 no fue secuenciado completo, ya que la secuencia codificante no incluye el exón completo. La secuencia de cada partidor se detalla en la Tabla 1.

6. Secuenciación de exones del gen *RHD*:

Se utilizó el Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para la secuenciación del gen *RHD*. Se utilizaron los mismos partidores usados en la amplificación y en el caso de los productos de mayor tamaño se usaron partidores internos como se indica en la figura 4. Para la reacción de PCR durante la secuenciación se utilizó un programa consistente en una desnaturación inicial de 1 minuto a 96°C y 30 ciclos de 10 minutos a 96°C, 5 segundos a 60°C y 2 minutos a 60°C. Los productos marcados fueron purificados mediante precipitación con etanol 100% para finalmente ser resuspendidos en formamida. Las muestras purificadas fueron procesadas y analizadas en un equipo Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer.

7. Clonación de productos PCR:

En los casos en que a pesar de repetir el proceso de secuenciación se siguió observando mezcla de señal durante el análisis de los electroferogramas, se realizó

la clonación del producto PCR. Los amplicones fueron ligados al vector de clonación pGEMT y luego fueron transformados en células competentes Nova blue tratadas previamente con cloruro de calcio. Las células transformadas fueron sembradas en medio agar luria en presencia de ampicilina. Luego de 16 horas de incubación a 37°C se seleccionaron 10 colonias positivas (resistentes) y se realizó una reacción de PCR con los partidores M13 forward y reverse, los cuales hibridan en la zona que flanquea el polilinker del vector. Los productos obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% y luego purificados con PEG 8000 NaCl 2,5 M.

8. Análisis de secuencias:

Las secuencias obtenidas fueron analizadas preliminarmente con el programa Data Collection 3500 versión 3.1. Posteriormente se utilizaron los software, Chromas versión 2.6, BioEdit versión 7.2.0 y Sequencher versión 5.4.1 para realizar el análisis, edición y ensamble de las secuencias obtenidas. Se utilizó la secuencia de referencia NG_007494.1 descargada desde la página de NCBI. Posteriormente se compararon las secuencias obtenidas con la referencia, para así determinar mutaciones presentes en las muestras analizadas.

9. Análisis de mutaciones:

Las mutaciones identificadas fueron comparadas con las variantes reportadas en la base de datos RhesusBase (<http://www.rhesusbase.info/>), además de realizar una búsqueda bibliográfica sobre los casos reportados para comprobar si existe o no relación del genotipo con el fenotipo D débil o parcial. Adicionalmente, se utilizó la página <http://provean.jcvi.org/index.php> para usar los algoritmos PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) y SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), permitiendo así

analizar las sustituciones exónicas identificadas y determinar el probable impacto biológico en la función de la proteína.

Entre las mutaciones intrónicas identificadas sólo la sustitución c.1073+170G>A no había sido reportada previamente, por lo que se utilizó el software online Human Splicing Finder (HSF) (<http://www.umd.be/HSF3/>) para predecir el impacto de esa mutación en el procesamiento de la proteína (25).

En la figura 5 se observa un diagrama del diseño experimental realizado para el análisis genético del gen *RHD*.

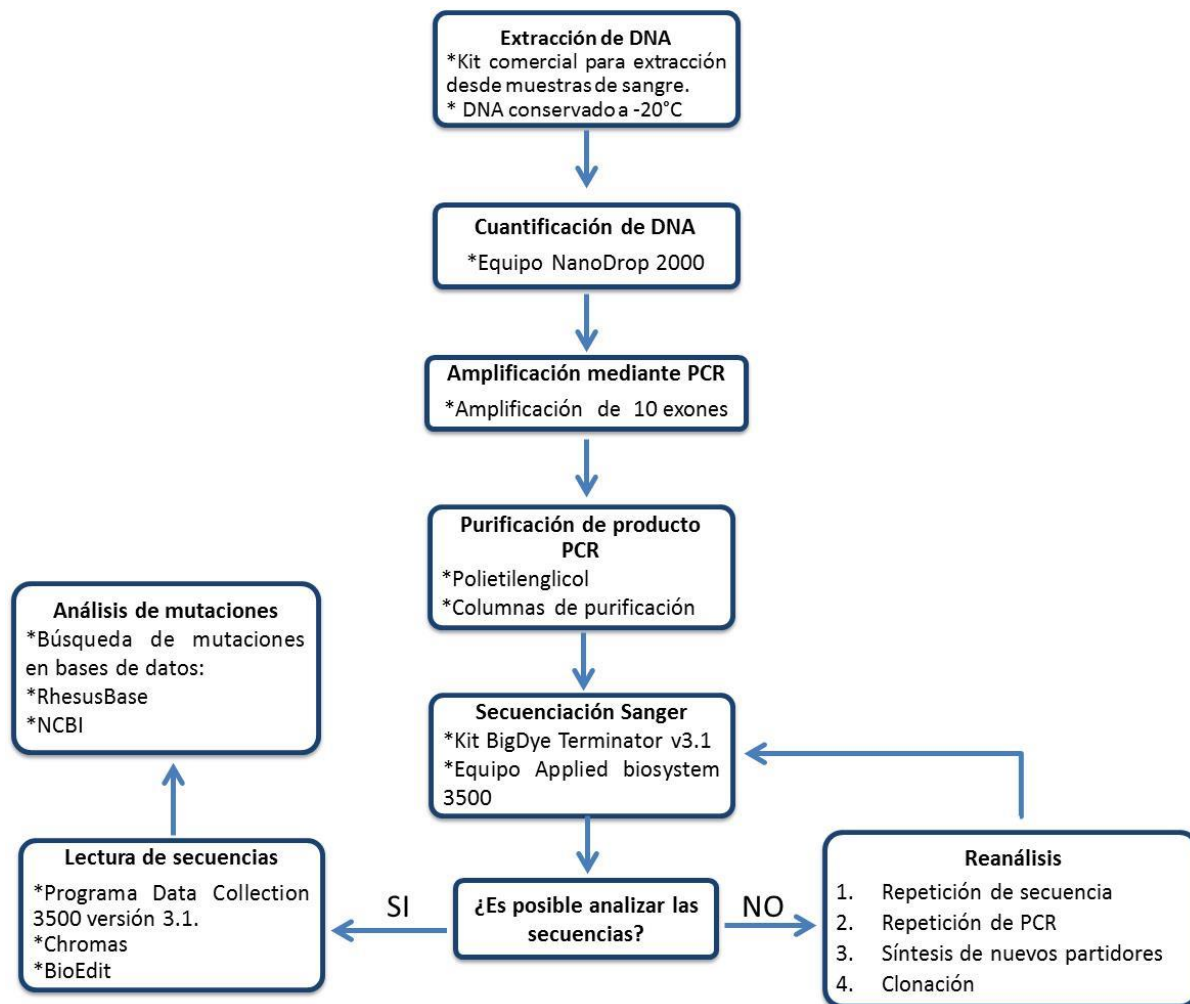


Figura 5. Diagrama de estrategia experimental. Descripción del procesamiento de muestras. En el paso de reanálisis se eligió una de las opciones y se repitió el proceso hasta obtener un resultado.

Resultados

Se analizaron 35 muestras recibidas en el Instituto de salud Pública desde diferentes servicios de salud. La mayoría de las muestras fueron enviadas desde la Región Metropolitana (29), 4 muestras provinieron de la Región de Los Lagos, 1 de Antofagasta y 1 de Valparaíso. Entre las 35 muestras analizadas 22 correspondieron a mujeres y 13 a hombres con edades entre 11 meses y 88 años. No existía relación de parentesco entre los pacientes.

Se realizó la extracción de ADN desde muestras de sangre mediante el uso de un kit comercial y posteriormente el ADN fue cuantificado en un equipo de espectrofotometría, obteniendo valores entre 7,8 y 88 ng/μl.

Estandarización de la técnica de amplificación por PCR de ADN

En el proceso de estandarización de amplificación de los exones por PCR se utilizaron los partidores descritos por Legler et al. (24). En la figura 6 se muestran los productos PCR obtenidos. En algunas muestras el exón 2 presentó una amplificación muy débil que no era adecuada para secuenciamiento, por lo tanto fue necesario diseñar y sintetizar nuevos partidores (incluidos en la Tabla 1 y Figura 4) con los cuales mejoró la amplificación del exón 2 (Figura 6B).

El exón 9 fue particularmente difícil de amplificar y secuenciar, ya que la amplificación presentaba bandas inespecíficas de tamaño similar a la banda correspondiente al exón 9 (697 pb). Se utilizó el método de purificación en gel de agarosa para separar las bandas y en la mayoría de las muestras se obtuvieron electroferogramas con secuencias con más de una secuencia. Para tratar solucionar la amplificación inespecíficas se diseñaron nuevos partidores para amplificar el exón

9 (Tabla 1 y Figura 4). Con los nuevos partidores se siguieron obteniendo bandas inespecíficas en el exón 9, sin embargo, estas bandas fueron de menor tamaño que el del producto PCR esperado (895pb). El producto PCR pudo ser purificado en un gel de agarosa y se obtuvieron electroferogramas aptos para la lectura.

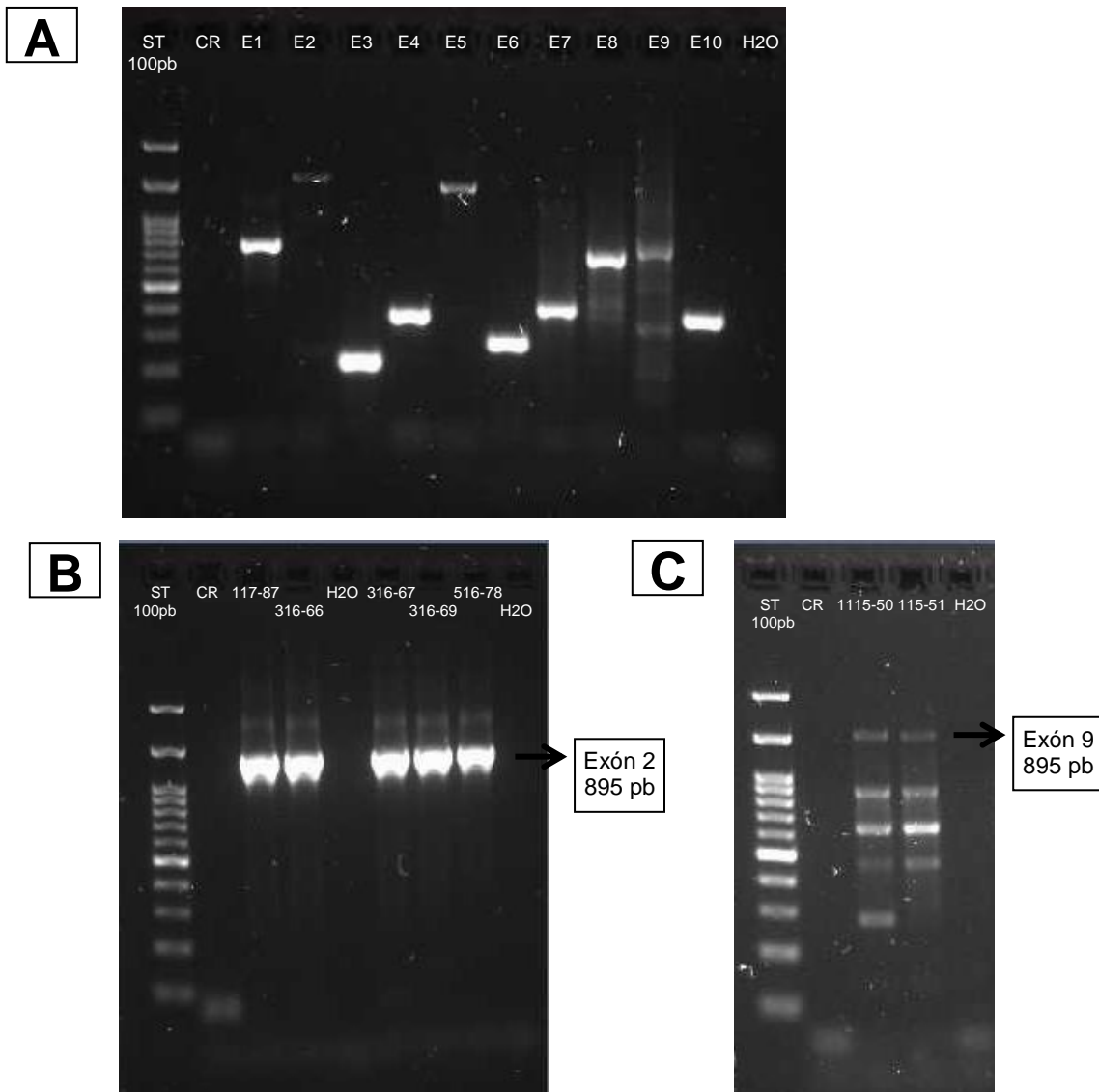


Figura 6. Resultados de amplificación mediante PCR de exones del gen *RHD*. En A se muestra un análisis mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación de los exones 1-10. Los tamaños esperado de cada producto son los siguientes: Exón 1: 767 pb, Exón 2: 1602 pb, Exón 3: 219 pb, Exón 4: 378 pb, Exón 5: 1458 pb, Exón 6: 274 pb, Exón 7: 405 pb, Exón 8: 708 pb, Exón 9: 697 pb, Exón 10: 381 pb. En B se observa el exón 2 amplificado en 5 muestras con los nuevos partidores sintetizados. En C se observa la amplificación del exón 9 con los nuevos partidores diseñados.

Secuenciación y análisis de secuencias.

Los productos de PCR fueron secuenciados y los electroferogramas fueron analizados visualmente para evaluar calidad de las secuencias y la posible presencia de cambios heterocigotos. Las figuras 6 y 7 muestran electroferogramas de algunos resultados representativos.

Posteriormente, una vez editadas y ensambladas las secuencias obtenidas, éstas se compararon con una secuencia de referencia obtenida del proyecto locus reference genomic, curado por el equipo de trabajo del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Al realizar esta comparación, se identificaron mutaciones presentes en las muestras. En todos los exones se analizaron al menos 20 pb que flanqueaban cada exón en las direcciones 5' y 3'.

Entre las 35 muestras estudiadas se analizaron las secuencias codificantes para los 417 aminoácidos de la proteína *RHD* y se identificaron 4 mutaciones, previamente reportadas en literatura como asociadas a los fenotipos DEL o débil (Tablas 2 y 3). En la Figura 7 se muestran los electroferogramas representativos de las mutaciones encontradas y en la Tabla 2 se detallan las mutaciones encontradas en cada muestra.

En el exón 1 se identificó la mutación c.46T>C, asociada al fenotipo DEL (Figura 7A). En los exones 2, 8 y 9 se identificaron las mutaciones c.182G>T, c.1148T>C y c.1154G>C respectivamente; todas asociadas al fenotipo débil (Figura 7B, 7C y 7D). En 31 (88,57%) de las muestras estudiadas se identificaron mutaciones relacionadas con los fenotipos DEL o débil, mientras que en 4 (11,43%) de las muestras no se identificó ninguna mutación que pueda ser asociada al fenotipo DEL, débil.

La mutación asociada al fenotipo DEL o débil que presentó una mayor frecuencia en este estudio fue sustitución del exón 1 c.46T>C identificada en 21 muestras (60%). Las otras tres mutaciones relacionadas al fenotipo débil fueron identificadas en un menor número de muestras: la mutación del exón 2 c.182G>T fue identificada en 5 muestras (14,29%), la mutación en el exón 8 c.1148T>C en 4 muestras (11,43%) y la mutación 1154G>C se identificó en sólo 1 muestra (2,86%).

Dentro de las regiones intrónicas se identificaron 6 sustituciones y una deleción, de las cuales las más frecuentes fueron la mutación en la región 5' c.-368A>G (identificada en 32 muestras) y la sustitución del intrón 8 c.1154-31T>C (identificada en 22 muestras). Ambas corresponden a polimorfismos frecuentes en la población y se encuentran reportados en la base de datos de NCBI dbSNP. Estos dos polimorfismos y adicionalmente la mutación del exón 1 c.46T>C fueron identificados en conjunto en 17 de las 35 muestras analizadas (48,57%), siendo este haplotipo el más frecuentemente identificado (tabla 2).

Cuando se analizó el electroferograma del exón 6 en la muestra 17-43366 se observó que había una secuencia clara seguida de una mezcla de secuencias, sugiriendo la existencia de inserción o deleción heterocigota. Para separar las secuencias de ambos alelos los productos PCR fueron clonados, y como resultado se logró obtener dos secuencias diferentes. En uno de los alelos había una deleción de una secuencia de 4 nucleótidos en el intrón 5 a 42 bases de distancia del exón 6 (c.802-42delCTCT), lo que provocaba que en el electroferograma se observara una mezcla de señal al sobreponerse la secuencia de ambos alelos. Esta deleción corresponde la deleción de una secuencia de 4 nucleótidos repetida donde el alelo normal tiene la secuencia TTCTCTCTCT y alelo delecionado la secuencia TTCTCT.

Esta deleción intrónica presente en 1 de las muestras fue la única mutación heterocigota identificada. En la figura 8 se muestran los electroferogramas obtenidos antes y después de clonar los productos PCR.

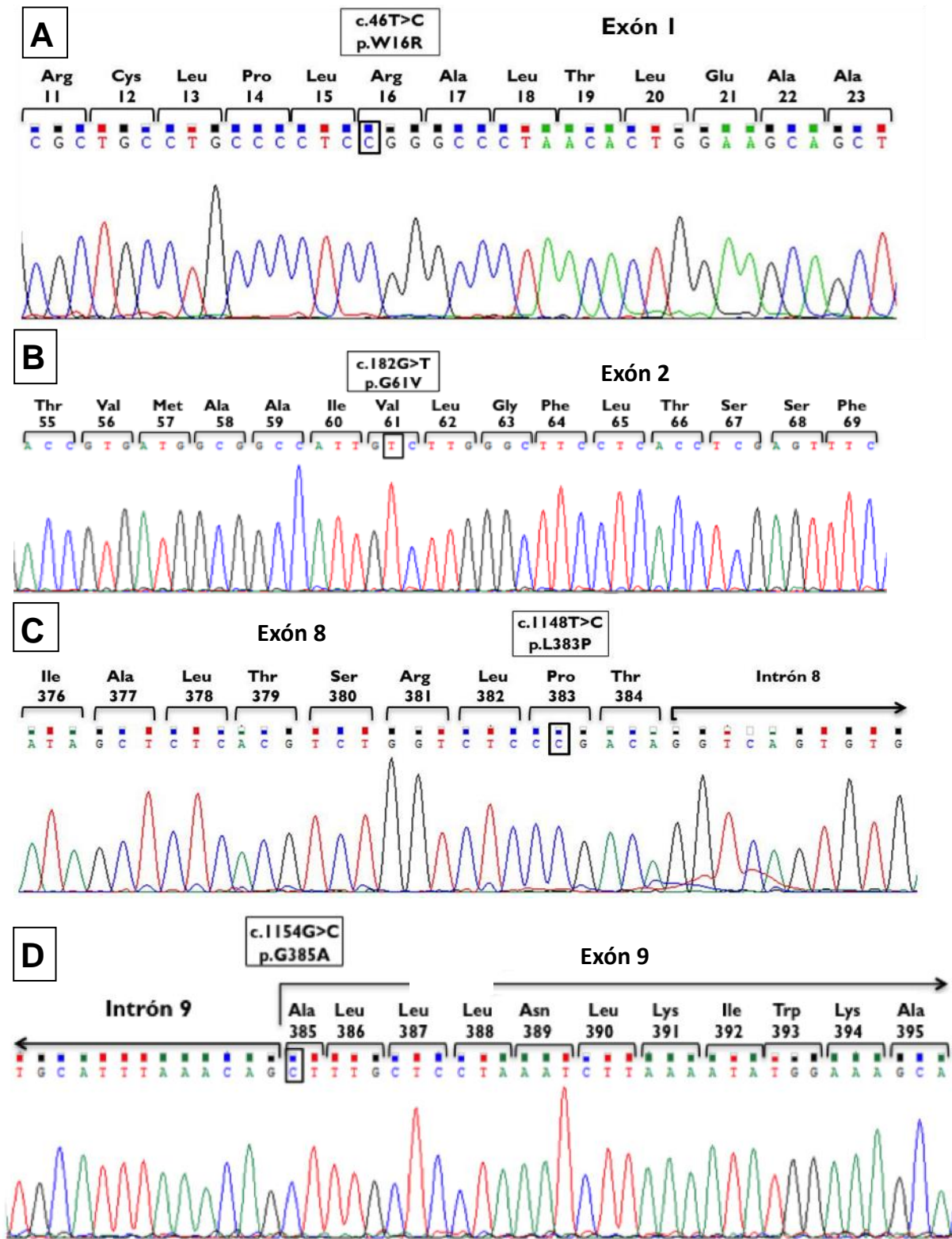


Figura 7. Electroferogramas representativos de las cuatro mutaciones exónicas identificadas. A: mutación c.46T>C en exón 1. **B:** c.182G>T en exón 2. **C:** c.1148T>C en exón 8. **D:** c.1154G>C en exón 9.

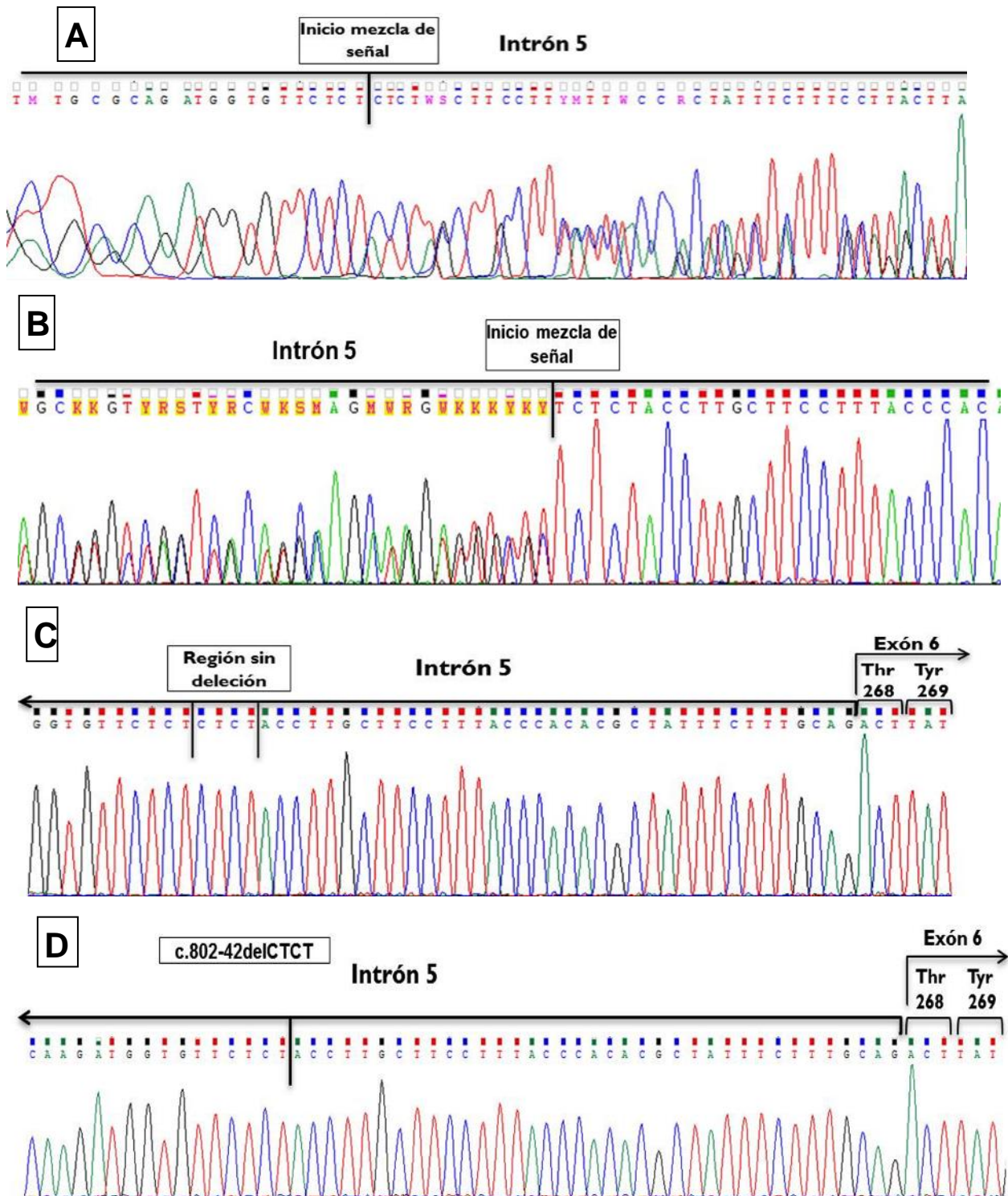


Figura 8. Electroferogramas correspondientes al borde intrón 5 - exón 6 de muestra 17-43366. **A:** secuencia obtenida al secuenciar con partidor forward. Se encuentra marcada la región de inicio de mezcla de señal. **B:** secuencia obtenida con partidor reverse. **C:** secuencia obtenida luego de haber clonado el fragmento de PCR, se muestra alelo sin delección. **D:** secuencia obtenida después de haber clonado el fragmento de PCR, se muestra alelo con delección c.802-41delCTCT

En la Tabla 2 se detallan todas las mutaciones identificadas en cada una de las 35 muestras analizadas.

Tabla 2. Mutaciones identificadas.

N° de muestra	Mutaciones exónicas		Mutaciones intrónicas	
	N° exón	Nomenclatura	N° intrón	Nomenclatura
115-20	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
117-87	8	c.1148T>C p.L383P	Extremo 5´ Intrón 1 Intrón 5	c.-368A>G c.149-29G>C c.801+219T>G
314-10	9	c.1154G>C p.G385A	Extremo 5´ Intrón 7 Intrón 8	c.-368A>G c.1073+170G>A c.1154-31T>C
316-64	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
316-66	8	c.1148T>C p.L383P	Extremo 5´ Intrón 1 Intrón 5	c.-368A>G c.149-29G>C c.801+219T>G
316-67	2	c.182G>T p.G61V	Intrón 1 Intrón 5	c.149-29G>C c.801+219T>G
316-68	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
316-69	8	c.1148T>C p.L383P	Extremo 5´ Intrón 1	c.-368A>G c.149-29G>C
316-72	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
415-22	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
416-73	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
515-25	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
515-26		Ninguna	Extremo 5´ Intrón 1 Intrón 5	c.-368A>G c.149-29G>C c.801+219T>G
516-78	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 7 Intrón 8	c.-368A>G c.1073+170G>A c.1154-31T>C
517-93	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 5 Intrón 8	c.-368A>G c.801+101G>A c.1154-31T>C
613-6	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
614-11	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
614-12	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C

N° de muestra	Mutación exónica		Mutaciones intrónicas	
	N° exón	Nomenclatura	N° exón	Nomenclatura
615-27	2	c.182G>T p.G61V	Intrón 1 Intrón 5	c.149-29G>C c.801+219T>G
617-106	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 1 Intrón 8	c.-368A>G c.149-29G>C c.1154-31T>C
714-13	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
816-82	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
817-120	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 5 Intrón 8	c.-368A>G c.801+101G>A c.1154-31T>C
817-121	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
913-8	2	c.182G>T p.G61V	Extremo 5´ Intrón 1 Intrón 5 Intrón 7	c.-368A>G c.149-29G>C c.801+219T>G c.1073+170G>A
915-41	8	c.1148T>C p.L383P	Extremo 5´ Intrón 1 Intrón 5	c.-368A>G c.149-29G>C c.801+219T>G
917-124	Ninguna		Extremo 5´ Intrón 1 Intrón 5	c.-368A>G c.149-29G>C c.801+219T>G
1112-4	Ninguna		Extremo 5´ Intrón 1 Intrón 5	c.-368A>G c.149-29G>C c.801+219T>G
1114-18	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
1115-49	2	c.182G>T p.G61V	Extremo 5´ Intrón 1 Intrón 5	c.-368A>G c.149-29G>C c.801+219T>G
1115-50	2	c.182G>T p.G61V	Extremo 5´ Intrón 1 Intrón 5 Intrón 7	c.-368A>G c.149-29G>C c.801+219T>G c.1073+170G>A
1115-51	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
1212-5	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 7 Intrón 8	c.-368A>G c.1073+170G>A c.1154-31T>C
1214-19	1	c.46T>C p.W16R	Extremo 5´ Intrón 8	c.-368A>G c.1154-31T>C
17-43366	Ninguna		Intrón 1 Intrón 5 Intrón 5	c.149-29G>C c.801+219T>G c.802-42delCTCT

En la Tabla 3 se muestra un resumen de las mutaciones identificadas y el fenotipo al que han sido asociadas previamente. La mutación del exón 1 c.46T>C provoca el cambio de un triptófano por una arginina, en el exón 2 c.182G>T produce un cambio de Glicina por Valina, en el exón 8 c.1148T>C produce el cambio de leucina a prolina y finalmente la mutación c.1154G>C del exón 9 provoca el cambio de glicina por alanina.

Tabla 3. Resumen de mutaciones identificadas en 35 muestras de pacientes chilenos con fenotipo Rh débil o parcial. El fenotipo asociado se determinó de acuerdo a lo reportado en bibliografía y en la base de datos internacional RhesusBase.

Exón o intrón	Nomenclatura Nucleótido	Nomenclatura Proteína	Localización en membrana	Fenotipo	Prevalencia	N° de muestras
1	c.46T>C	p.W16R	Transmembrana	DEL	58,33%	21
2	c.182G>T	p.G61V	Transmembrana	Débil, tipo 48	13,89%	5
8	c.1148T>C	p.L383P	Transmembrana	Débil, tipo 59	11,11%	4
9	c.1154G>C	p.G385A	Transmembrana	Débil, tipo 2	2,78%	1
Extremo 5'	c.-368A>G	N/A*	N/A*	Sin fenotipo asociado	88,89%	32
1	c.149-29G>C	N/A*	N/A*	Sin fenotipo asociado	38,89%	14
5	c.802-42delCTCT	N/A*	N/A*	Sin fenotipo asociado	2,78%	1
5	c.801+219T>G	N/A*	N/A*	Sin fenotipo asociado	33,33%	12
5	c.801+101G>A	N/A*	N/A*	Sin fenotipo asociado	5,56%	2
7	c.1073+170G>A	N/A*	N/A*	Sin fenotipo asociado	13,89%	5
8	c.1154-31T>C	N/A*	N/A*	Sin fenotipo asociado	61,11%	22

*N/A= No aplica

En el presente trabajo no se estudió la heterocigocidad del gen *RHD*, sin embargo, debido a que un alelo sin mutaciones del gen es suficiente para generar el fenotipo positivo (26), se realizó el cálculo de las prevalencias considerando que las variantes débiles tenían uno de los alelos delecionado. Debido a que en 1 de los pacientes se obtuvo una mutación heterocigota, se consideró que sólo ese paciente tenían ambos alelos del gen *RHD* y que los 34 pacientes restantes tenían solamente uno de los alelos del gen *RHD*.

Predicción de efecto de mutaciones

Para predecir el efecto de las mutaciones exónicas a nivel de proteína se utilizó el software online PROVEAN. (herramienta “Human protein batch”) incluyendo como referencia la secuencia NCBI NP_057208.2. En los resultados obtenidos se incluyeron los algoritmos PROVEAN y SIFT (27, 28).

En las cuatro mutaciones analizadas se obtuvo como resultado un valor menor al punto de corte (PROVEAN: -2,5, SIFT: 0.05) obteniendo una predicción de “deleterious” o “damging” (perjudicial). Esto indica que dichas mutaciones probablemente tienen un efecto perjudicial para el funcionamiento normal de la proteína. En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos.

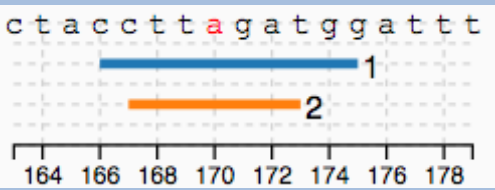
Tabla 4. Predicciones de efecto de mutaciones exónicas sobre la función de la proteína. El N° de secuencias corresponde a la cantidad de secuencias descargadas de las bases de datos UniprotKB/Swiss-Prot, dbSNP y RefSeq, las que fueron utilizadas comparativamente para realizar el cálculo de cada algoritmo.

Mutación	Predicción PROVEAN			Predicción SIFT		
	Puntaje	Predicción (puntaje de corte -2,5)	N° de secuencias	Puntaje	Predicción (puntaje de corte 0.05)	N° de secuencias
c.46T>C	-5,57	Deleterious	281	0,007	Damaging	128
c.182G>T	-8,09	Deleterious	281	0,001	Damaging	134
c.1148T>C	-5,02	Deleterious	281	0,001	Damaging	124
c.1154G>C	-4,86	Deleterious	281	0,001	Damaging	124

Las mutaciones intrónicas que habían sido reportadas previamente fueron asociadas a polimorfismos de la población según la base de datos de NCBI dbSNP. Sin embargo, una de las mutaciones intrónicas identificadas no había sido reportada

previamente (intrón 7, c.1073+170G>A), por lo que se utilizó el software Human Splicing Finder (HSF) para obtener una predicción del impacto de la mutación en el *splicing* de la proteína. El software HSF utiliza 12 algoritmos diferentes que permiten predecir el efecto de las mutaciones en los sitios dador y aceptor de *splicing*, sitio de ramificación y secuencias auxiliares como enhancers de *splicing* exónicos (ESE) o silenciadores de *splicing* exónicos (ESS) (25). El análisis de la mutación con el software HSF demostró que no existiría impacto en el *splicing* de la proteína (Tabla 5).

Tabla 5. Predicción de efecto de mutación intrónica c.1073+170G>A en *splicing*. Resultados obtenidos con software Human *splicing* finder. En la posición cDNA se muestra en la línea 1 (azul) la secuencia identificada como silenciador de *splicing* según lo descrito por Zhang et al.(29), mientras que en la línea 2 (naranja) se muestra la secuencia silenciadora de *splicing* descrita por Goren et al. (30). ESS: Silenciadores de *splicing* exónico. IIE: Elementos de identidad intrónica. ESR: Secuencias regulatorias de *splicing* exónico.

Tipo de alteración	Algoritmos de predicción	Posición cDNA	Interpretación
Quiebre de sitio ESS	1.- IIEs from Zhang et al.		Alteración de un sitio ESS intrónico. Probablemente no hay impacto en <i>splicing</i>.
	2.- ESR Sequences from Goren et al.		

Discusión

El análisis genético mediante secuenciación del gen *RHD* es útil como estrategia de determinación del grupo sanguíneo en el sistema Rh, lo que es especialmente importante en casos de pacientes clasificados como D débil o parcial.

En esta tesis, se amplificó mediante PCR los 10 exones incluyendo bordes exón intrón de muestras de los 35 pacientes. Estos segmentos de ADN se secuenciaron por el método de Sanger.

Análisis de mutaciones identificadas.

Los resultados de las secuencias obtenidas nos permitieron identificar cuatro mutaciones exónicas, seis sustituciones y una deleción en las regiones intrónicas. Todas las mutaciones exónicas habían sido reportadas previamente y se encontraban registradas en la base de datos Rhesusbase. Dentro de las mutaciones intrónicas identificadas, sólo la mutación del intrón 7 c.1073+170G>A no ha sido reportada previamente. Esta mutación se encuentra alejada del sitio dador de splicing y no tendría implicancia en el procesamiento de la proteína RhD.

Se realizó una búsqueda bibliográfica de cada una de las mutaciones exónicas identificadas en esta tesis, construyendo con esa información la tabla 6, donde se realizó el cálculo de las prevalencias reportadas entre los pacientes analizados en cada una de las publicaciones. En ninguno de los estudios utilizados para determinar las prevalencias de la tabla 6 se realizaron pruebas para determinar la pérdida de heterocigocidad del gen *RHD* (26, 31-48), sin embargo, se ha reportado que el fenotipo *RHD* negativo se produce principalmente mediante la deleción del gen *RHD*

(26). Debido a que la presencia de un alelo *RHD* sin mutaciones es suficiente para tener el fenotipo Rh utilizando pruebas de aglutinación, se realizó el cálculo de las prevalencias en la Tabla 6 considerando las variantes débiles como hemicigotas, es decir, considerando que el otro alelo RH se encuentra deletado, como en la mayoría de los pacientes con el fenotipo Rh negativo.

Tabla 6. Estudios realizados en diferentes poblaciones en donde se reportan las mutaciones asociadas a los fenotipos DEL y débil identificadas en este estudio

Mutación	País de origen de las muestras	Año	Total de muestras analizadas	Muestras RH débiles, DEL o parciales	Muestras con mutación	Prevalencia de mutación entre fenotipos DEL, débiles o parcial
c.46T>C	Suiza	2012	20.015	37	1	2,7%
	Argentina	2014	1.314	6	5	83,33% ¥
	Argentina	2017	133	117	12	10,26%
c.182G>T	Austria	2013	804	17	7	41,18%
	Argentina	2017	324	324	1	0,309 %
c.1148T>C	Francia	2007	333	289	1	0,346%
	Argentina	2012	18.379	88	2	2,27%
	Francia	2013	748	459	1	0,218%
c.1154G>C	Alemania	1999	161	161	43	26,71
	Australia	2000	147	99	46	46,46%
	Francia	2004	168	137	21	15,33%
	Portugal	2006	99	99	63	63,64%
	Argentina	2010	59	59	4	6,78%
	Brasil	2011	306	306	75	24,51%
	Argentina	2012	18.379	88	9	10,23%
	Polonia	2013	31.200	27	3	11,11%
España	2014	25	25	1	4%	

¥ En este estudio se analizaron 1.314 muestras de pacientes no emparentados y que habían sido clasificadas previamente como RH negativo; por lo que era esperable identificar un número reducido de muestras RH débiles o parciales (6 pacientes).

Un resumen de las mutaciones identificadas en este estudio se muestra en la Tabla 3. Se observa que la mutación del exón 1 c.46T>C fue predominante ya que fue identificada en 21 (60%) de los 35 muestras analizadas. Esta mutación de

sentido erróneo (missense) codifica para el aminoácido Arginina en lugar de Triptófano. La mutación fue reportada por primera vez en Argentina en 2010 (49), sin embargo la secuencia aminoacídica fue depositada a la base de datos GenBank con el número de acceso HE999546.1 en el año 2012 como parte de un estudio de screening en muestras que habían sido clasificadas como negativas inicialmente en Suiza (32). En ese estudio la mutación fue asociada al fenotipo DEL y fue identificada en 1 de 35 pacientes (2,7%) que presentaban los fenotipos DEL, débil o parcial (Tabla 6).

En 2014 Trucco Boggione C, et al. reportó la identificación de la mutación c.46T>C en cinco pacientes en Rosario, Argentina (Tabla 6) (31). En ese estudio se analizaron 1.314 muestras de pacientes no emparentados entre ellos, identificando la mutación c.46T>C en pacientes que presentaban una reacción extremadamente débil del antígeno D, por lo que la variante fue clasificada como DEL. Las variantes DEL corresponden a una categoría de fenotipos que presentan una reacción aún más débil que las variantes “RH débil” (15), por lo que su detección en la práctica clínica se vuelve más importante ante el riesgo de que estos pacientes sean clasificados erróneamente como Rh negativo.

De acuerdo a los tres estudios donde se reporta la mutación c.46T>C (tabla 6), se observa que la mutación fue identificada con mayor frecuencia en Argentina que en Suiza, lo que indica que esta variante podría tener mayor prevalencia en Sudamérica que en Europa. Este hallazgo permitirá en un futuro recomendar la incorporación de esta mutación en el trabajo de rutina en los casos de pacientes con el fenotipo débil o parcial.

La mutación c.46T>C provoca un cambio del aminoácido 16 codificado por el exón 1, esto produce un cambio del aminoácido Triptófano apolar e hidrofóbico, a Arginina, un aminoácido básico, con carga positiva e hidrofílico. Ya que el aminoácido 16 se posiciona en el primer dominio transmembrana de la proteína, esto podría afectar la correcta inserción de la proteína en la membrana del eritrocito, lo que podría explicar la relación directa que ha sido descrita entre esta mutación y el fenotipo Rh débil.

La mutación c.46T>C puede explicar los fenotipos débiles en 21 de los pacientes en que fue detectada, ya que al verse afectada la integración de la proteína en la membrana de los glóbulos rojos la cantidad de antígeno D expresado en la superficie de los eritrocitos resulta cuantitativamente menor al fenotipo normal, y ya que esta mutación está situada en el primer dominio transmembrana se explica que estos pacientes presenten un fenotipo especialmente débil, catalogado como DEL.

La mutación c.182G>T (tipo 48) ubicada en el exón 2 fue identificada en 5 (14,29%) pacientes. Esta mutación fue reportada a la base de datos Rhesusbase en 2005 asociada a la secuencia aminoacídica publicada por Polin,H. et al. en la base de datos GenBank con el número de acceso AM072759.1. En 2013 Polin,H. et al. publicó en Austria un estudio donde la misma mutación fue identificada en 7 de 17 pacientes con el fenotipo Rh débil o parcial (33). Posteriormente, en 2017 la misma mutación fue reportada en Argentina por Trucco Boggione C. et al (48), siendo identificada en 1 de 324 pacientes (0,309%). El hecho de que la mutación c.182G>T haya sido reportada en Argentina puede indicar que la variante se encuentra presente en otros países de Sudamérica. Específicamente en el caso de

Chile, la mutación c.182G>T podría ser una variante que actualmente se encuentra sub reportada debido a que generalmente cuando se lleva a cabo la identificación de mutaciones en el gen *RHD*, el proceso se realiza con kits comerciales que no incluyen esta variante poco frecuente.

La mutación c.182G>T provoca un cambio en el aminoácido 61 pasando de codificar para Glicina a codificar para Valina. El aminoácido Glicina es apolar hidrofóbico, al igual que Valina, sin embargo, a pesar de que no hay cambio de carga o polaridad en esta mutación, el cambio en la estructura podría afectar el correcto plegamiento de la proteína, ya que por ejemplo, Valina tiende con mayor tendencia a formar hojas β mientras que Glicina tiene una mayor tendencia a estar presente en los giros y bucles (50). En estudios realizados en Austria y en Argentina esta mutación fue asociada al fenotipo débil, al igual que en los pacientes analizados en este trabajo. En los cinco pacientes chilenos que tienen esta mutación no se identificó ninguna otra mutación exónica.

En el presente estudio la mutación del exón 8 c.1148T>C (tipo 59) fue identificada en 4 pacientes (11,43%). Esta mutación se encuentra reportada en la base de datos Rhesusbase desde el año 2007, cuando se identificó por primera vez y la secuencia aminoacídica fue incluida en la base de datos GenBank con el número EF105446.1.

La mutación c.1148T>C provoca un cambio en el aminoácido 383, cambiando desde Leucina a una Prolina, siendo ambos aminoácidos no polares hidrofóbicos. La conformación de Leu y Pro es distinta, ya que Leucina tiene una cadena lateral extendida, mientras que el aminoácido Prolina tiene una cadena lateral cíclica, lo que puede dificultar la formación de estructuras secundarias de alfa-hélice o lámina-

beta, ya que se pueden producir curvaturas en la estructura (51). El aminoácido 383 se ubica en el duodécimo dominio transmembrana de la proteína RhD, y la asociación del fenotipo débil y una mutación en el codón que codifique para este aminoácido es concordante con el hecho de que la mayoría de las mutaciones que han sido descritas como asociadas al fenotipo débil se concentran en regiones transmembrana (4, 5, 18-20).

Los estudios realizados en el gen *RHD* en Argentina y Francia (tabla 6) muestran que la mutación c.1148T>C, ha sido reportada con mayor frecuencia en Argentina (2,27% de los pacientes), lo que hace suponer que al igual que en las otras mutaciones, a pesar de presentar una baja frecuencia en la población, esta mutación podría presentar una mayor prevalencia en Sudamérica que en Europa.

Debido a que la mutación c.1148T>C ha sido reportada como asociada al fenotipo débil y no a DEL, los pacientes con esta mutación presentan una aglutinación un poco más definida durante las pruebas de anticuerpos, sin embargo, en este caso el efecto de la sustitución del aminoácido 383 sigue provocando una cantidad reducida de antígeno D expuesto en la membrana de los glóbulos rojos, lo que se expresa como fenotipo débil.

Dentro de las mutaciones exónicas identificadas en el presente estudio, la sustitución del exón 9 c.1154G>C fue la menos frecuente, ya que se identificó sólo en una de los pacientes (2,7%). Esta mutación ha sido reportada en múltiples ocasiones con una alta frecuencia en diferentes continentes y es considerada una de las variantes más importantes del sistema Rh debido a su alta frecuencia (47) (Tabla 6). Esta mutación provoca un cambio en el aminoácido 385 donde ocurre el cambio de una Glicina por una Alanina, ambas apolares e hidrofóbicas. Esta mutación

reportada frecuentemente como asociada al fenotipo Rh débil, generalmente se encuentra incluida en los kits de detección usados rutinariamente.

Las muestras seleccionadas en este trabajo, como fue descrito previamente, fueron aquellas que no pudieron ser identificadas mediante técnicas de aglutinación y el uso de kits comerciales de SSP-PCR, entre el que se encuentra el kit RH-Type (BAG Health care, 6645). Este kit que incluye el análisis de la variante débil tipo 2, correspondiente a la mutación c.1154G>C. Es por esto que era esperable que esta variante fuera identificada en muy baja frecuencia o en su defecto no fuera identificada en ninguna de las muestras analizadas, ya que las muestras con esta mutación deberían haber sido excluidas en el paso de selección previo. El hecho de que una muestra con esta variante haya sido identificada puede deberse a una falla en el protocolo utilizado ya sea por manipulación o porque la muestra haya estado fuera de los límites de detección del kit utilizado.

Las mutaciones exónicas identificadas en este estudio se ubicaron en nucleótidos codificantes para aminoácidos ubicados en dominios transmembrana, y según lo descrito en otros estudios, mutaciones en estas regiones suelen provocar una disminución en la expresión de antígenos en la superficie de los glóbulos rojos (17), lo que se expresa en el paciente como fenotipo débil o parcial.

Todas las variaciones genéticas exónicas identificadas en este estudio habían sido reportadas previamente en la base de datos internacional RhesusBase, donde habían sido relacionadas a los fenotipos DEL o débil (Tabla 3). Sin embargo, con el objetivo de verificar el impacto de las mutaciones en la función biológica de la proteína RhD, se utilizó el software online PROVEAN incluyendo los algoritmos PROVEAN y SIFT (27, 28).

Los algoritmos PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) y SIFT (Sorting Tolerant From Intolerant) tienen un fundamento similar, ya que ambos se basan en una comparación entre la secuencia analizada y las variantes del mismo gen reportadas en la misma u otras especies. De esta forma se mide la conservación evolutiva de los aminoácidos dentro de familias de proteínas, considerando las posiciones aminoacídicas con alto grado de conservación como intolerantes a las mutaciones (“deleterious” o “damaging”), mientras que las regiones aminoacídicas que presentan bajo grado de conservación son consideradas como tolerantes, ya que acumulan una mayor cantidad de mutaciones a lo largo del tiempo, lo que es reflejado como un resultado benigno.

Impacto funcional posible de las mutaciones

Específicamente, el algoritmo PROVEAN predice el impacto funcional para toda las posibles variaciones incluyendo inserciones, deleciones y múltiples sustituciones. El cálculo del puntaje se realiza mediante la alineación de secuencias en pares, usando puntuaciones de alineación como una medida de similitud entre secuencias, para así incluir en el cálculo la probabilidad de que las secuencias sean homólogas o se encuentren relacionadas. Posteriormente se incluye en el cálculo un diferencial en el valor de alineación que es determinado por las diferentes mutaciones presentes en las secuencias alineadas. De esta forma se está midiendo el efecto de las variaciones a nivel de proteína, considerando una mutación dañina si la secuencia analizada es muy diferente a lo reportado en proteínas homólogas en distintas bases de datos internacionales. Dentro del algoritmo se incluye la construcción de una matriz de sustitución que incluye información sobre la mutación,

frecuencia y propiedades químicas de 20 residuos de aminoácidos, zonas conservadas y zonas más polimórficas de la proteína analizada.

Por otra parte, el algoritmo SIFT también realiza múltiples alineamientos aminoacídicos, sin embargo, este cálculo también incluye métodos probabilísticos para calcular la probabilidad de sustitución para los 20 aminoácidos existentes.

Ambos algoritmos usan como alimentación para sus análisis los sitios web UniprotKB/Swiss-Prot, dbSNP y RefSeq.

Los resultados obtenidos con ambos algoritmos son mostrados en la Tabla 4, donde se observa que al utilizar ambos cálculos se obtuvo el mismo resultado para las cuatro mutaciones exónicas analizadas: “deleterious” o “damaging”, es decir, que cualquiera de estas mutaciones es perjudicial y tienen un impacto negativo en la función de la proteína RhD. Estos resultados reflejan la importancia de los dominios conservados dentro de la proteína, ya que mutaciones en esas regiones y específicamente en las posiciones aminoacídicas reportadas en este estudio explicarían una disminución de la correcta inserción de la proteína en la membrana de los glóbulos rojos y consecuentemente una disminución en la expresión de antígenos.

Además de las mutaciones exónicas, en el presente estudio se identificaron 6 sustituciones y 1 deleción en las regiones intrónicas. Todas las muestras presentaron cambios intrónicos, sin embargo ninguno de ellos fue asociado al fenotipo débil o parcial. Solamente la mutación c.1073+170G>A localizada en el intrón 7 no había sido reportada previamente, por lo que se utilizó el software HSF para analizar el efecto de la mutación en el *splicing* de la proteína RhD. El resto de las mutaciones

habían sido identificadas previamente como polimorfismos frecuentes en la población y sin efectos de significancia clínica.

El resultado del software HSF para el análisis de la mutación c.1073+170G>A es mostrado en la tabla 5 (29, 30), donde se observa que el cambio nucleotídico fue identificado como una alteración de un sitio silenciador de splicing exónico (ESS) ubicado en el intrón 7, sin embargo, debido a que no se identificaron modificaciones en el sitio dador de splicing ni de ramificación de splicing, el análisis en conjunto de los 12 algoritmos utilizados por el software HSF entregó como resultado que mutación c.1073+170G>A es identificada como “*Probably no impact on splicing*”, es decir, que no debiera afectar el splicing y correcto procesamiento de la proteína.

Entre las mutaciones intrónicas identificadas en este estudio, la más frecuente fue c.-368A>G localizada en la región 5' en 32 pacientes (91,43%) seguida de la mutación del intrón 8 c.1154-31T>C que fue identificada en 22 pacientes (62,86%). Estas dos mutaciones fueron identificadas en conjunto con la sustitución del exón 1 c.46T>C, siendo ese haplotipo el más frecuente al identificarse en 17 muestras (48,57%). El resto de las mutaciones presentaron mayor diversidad en su distribución y ningún otro haplotipo fue identificado en más de tres muestras, lo que demuestra la diversidad de los polimorfismos intrónicos identificados.

Entre las variaciones intrónicas identificadas la menos frecuente fue detectada en 1 muestra y correspondió a la delección del intrón 5 c.802-42delCTCT. Esta delección fue la única mutación heterocigota identificada en las 35 muestras analizadas y fue identificada en una muestra que no presentó ninguna mutación exónica, a pesar de tener el fenotipo débil o parcial.

Para verificar la presencia de dos alelos en la muestra con la delección c.802-42delCTCT se clonó el producto PCR de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, logrando identificar y separar las secuencias nucleotídicas con y sin delección.

Se identificaron cuatro muestras sin ninguna mutación exónica, sin embargo, todas presentaron al menos dos mutaciones intrónicas. La identificación de muestras que no presentan mutaciones exónicas a pesar de tener el fenotipo débil o parcial ya ha sido reportada. En el caso de la delección c.802-42delCTCT, se han descrito casos sin mutaciones asociadas a los fenotipos débiles o parcial en Austria en 2004 (Kormoczi GF. et al.) y 2005 (Wagner T. et al.) (52, 53) y en Alemania en 2007 (Von Zabern I. et al.) (54). Según lo reportado por Von Zabern I. et al. la delección c.802-42delCTCT fue identificada tanto en pacientes con el fenotipo positivo como negativo, incluyendo variantes heterocigotas y hemicigotas, denominadas así al identificarse en pacientes que tenían un alelo RH negativo, es decir, con el gen *RHD* delecionado. Debido a que según lo reportado por Von Zabern I. et al. la delección fue identificada tanto en pacientes Rh positivos como negativos, por lo que los autores concluyen que la delección c.802-42delCTCT no afecta la expresión del antígeno D y corresponde más bien a una variación intrónica común en la población.

Debido a que en el presente estudio no se logró identificar mutaciones que pudieran estar relacionadas directamente a los fenotipos débil o parcial en cuatro de los pacientes estudiados, se puede plantear la hipótesis de que en esos pacientes este fenotipo este causado por mutaciones en otras proteínas que intervienen en el proceso de la generación de antígeno D. El hecho de haber identificado dos muestras heterocigotas para la delección c.802-42delCTCT del intrón 5 indica que

esos pacientes portaban dos alelos del gen *RHD* sin mutaciones detectables asociadas a los fenotipos débil o parcial. Esto abre varias posibilidades que expliquen este fenotipo, por ejemplo podría haber mutaciones en regiones génicas no secuenciadas en este trabajo como en el promotor del gen o en secuencias intrónicas importantes para la regulación de la expresión génica no incluidas en este estudio. Sin embargo también existe la posibilidad que el fenotipo sea provocado por mecanismos diferentes a las mutaciones del gen *RHD*.

Previamente se ha descrito que no sólo mutaciones en el gen *RHD* pueden provocar el fenotipo débil, ya que la proteína RhD se une a un complejo que interactúa en la membrana del eritrocito (4), por lo que mutaciones en los genes codificantes para otras proteínas también pueden relacionarse a defectos de expresión del antígeno D. En otros estudios se han descrito mutaciones en el gen *RHAG* que pueden causar el fenotipo débil (55) o incluso nulo (56), es por esto que en el caso de los cuatro pacientes sin mutaciones relacionadas a los fenotipos débil o parcial es recomendable ampliar el análisis incluyendo otros genes que puedan presentar mutaciones que expliquen el fenotipo.

Diferencias poblacionales

La distribución de las distintas variantes tanto débiles como parciales es diferente en las poblaciones de cada continente, en la población europea y canadiense se ha descrito como más frecuente el genotipo D débil tipo 1, 2 y 3, al igual que lo descrito en Australia. Por otro lado, para el genotipo D parcial en Europa se ha descrito como predominante la variante DNB. En África se han reportado con mayor frecuencia los tipos D débil 4.0 y 4.1, mientras que los D débiles tipo 15 y 33

son predominantes en el este de Asia (17, 22, 23, 57). En Estados Unidos aproximadamente el 80% de los fenotipos serológicamente D débiles corresponden a los tipos 1, 2 y 3 (58).

La variante DEL está presente en un mayor porcentaje en la población asiática, donde ha sido identificada hasta en un 30% de los pacientes con fenotipo débil (15, 59). Sin embargo, esta variante no ha sido reportada frecuentemente en América latina, lo que hace interesante el hecho de que en el presente estudio se haya identificado en el 60% de los pacientes la mutación del exón 1 c.46T>C asociada al fenotipo DEL. Esto podría indicar que dicha variante está presente en mayor porcentaje en Chile del que se ha reportado hasta ahora en la población sudamericana.

Los resultados obtenidos muestran que es posible que variantes DEL, débiles o parciales que presentan bajos porcentajes de prevalencia en Europa, estén presentes en mayores porcentajes en Chile, pero debido a que no están incluidas en los kits comerciales disponibles para la identificación de Rh, estén siendo sub representadas, al permanecer sin ser identificadas ni reportadas en bases de datos internacionales.

Como fue descrito en materiales y métodos, las muestras obtenidas para este estudio fueron enviadas voluntariamente por distintos servicios de salud, ya que la determinación exacta del fenotipo Rh no es obligatorio en Chile, sino que se recomienda tomar medidas precautorias en los casos donde hay duda sobre el fenotipo (16). Sin embargo, la caracterización genética de la población Rh débil o parcial es importante a nivel de salud pública, ya que permite optimizar los sistemas de transfusiones sanguíneas y prevenir complicaciones clínicas en casos en los que

los pacientes han sido erróneamente clasificados. Si el personal del área de salud es capaz de identificar con exactitud el genotipo Rh de un paciente, será también capaz de explicar al paciente su propio fenotipo, las consecuencias médicas e inclusive la forma de herencia de su genotipo y las implicancias médicas asociadas.

Los resultados aquí obtenidos muestran que las variantes débiles o parciales que han sido descritas como predominantes o presentes en altos porcentajes en poblaciones blancas no son necesariamente las mismas en Chile, ya que la población Sudamericana podría presentar prevalencias importantes en variantes poco frecuentes en otros continentes.

La gran complejidad y variabilidad del sistema Rh hace imposible que exista una herramienta serológica que permita identificar todos los alelos posibles para el gen *RHD*, lo que hace aún más importante caracterizar genéticamente a la población chilena, para poder identificar variaciones que no están presentes actualmente en paneles comerciales y a la vez conocer en mayor profundidad la diversidad genética presente en la población chilena.

Conclusión

- El análisis genético del gen *RHD* permitió identificar mutaciones que explican el fenotipo débil en 31 de los 35 pacientes analizados (88,57%).
- Se identificaron 4 mutaciones exónicas diferentes, todas fueron *missense* y estaban ubicadas en nucleótidos que codifican para aminoácidos ubicados en dominios transmembrana de la proteína *RhD*, lo que provocaría que la proteína presentara una menor expresión de antígenos en la superficie de los glóbulos rojos (17), explicando así los fenotipos débil y DEL.
- La mutación del exón 1 c.46T>C fue la más frecuente entre las muestras analizadas ya que fue identificado en 21 de los 35 pacientes estudiados (60% de las muestras). Esta mutación codifica para un cambio aminoacídico de triptofano por arginina en el primer dominio transmembrana de la proteína. Esta mutación ha sido asociada al fenotipo DEL y ha sido reportada previamente con baja frecuencia en Suiza y Argentina.
- La mutación del exón 2 c.182G>T fue identificada en 2 de los 35 pacientes estudiados (5,71% de las muestras). Esta mutación codifica para un cambio aminoacídico de Glicina por Valina en el segundo dominio transmembrana de la proteína. Esta mutación ha sido asociada al fenotipo débil y ha sido reportada con baja frecuencia previamente en Austria y Argentina.
- La mutación del exón 8 c.1148T>C fue identificada en 4 de los 35 pacientes estudiados (11,43% de las muestras). Esta mutación codifica para un cambio aminoacídico de Leucina por Prolina en el duodécimo dominio transmembrana

de la proteína. Esta mutación ha sido asociada al fenotipo débil y ha sido reportada con baja frecuencia previamente en Francia y Argentina.

- La mutación del exón 9 c.1154G>C fue identificada en 1 de los 35 pacientes estudiados (2,86% de las muestras). Esta mutación codifica para un cambio aminoacídico de Glicina por Alanina en el duodécimo dominio transmembrana de la proteína. Esta mutación ha sido asociada al fenotipo débil y es una de las mutaciones identificadas con mayor frecuencia en varios países de Europa y América.
- En la predicción del efecto de las mutaciones (algoritmos PROVEAN y SIFT) identificadas, se encontró que las cuatro mutaciones exónicas serían “perjudiciales”, lo que concuerda con el fenotipo observado en estos pacientes.
- Se identificaron 7 mutaciones intrónicas diferentes en los pacientes estudiados, sin embargo sólo la mutación c.1073+170G>A no había sido reportada previamente. Esta mutación fue identificada en 5 pacientes que presentaron mutaciones asociadas a los fenotipos DEL o débiles en los exones 1, 2 o 9. Se realizó un análisis de la mutación c.1073+170G>A con el software HSF, el que predijo que la mutación probablemente no tiene efecto sobre el *splicing* de la proteína, ya que no se ve afectado el sitio de *splicing* o el sitio de ramificación de *splicing*.
- Todas las mutaciones intrónicas reportadas previamente correspondieron a polimorfismos de la población y no han sido relacionadas a los fenotipos débil o parcial.

- El haplotipo que incluye las mutaciones c.-368A>G (región 5'), c.1154-31T>C (intrón 8) y c.46T>C (exón 1) fue identificado en 17 de las 35 muestras estudiadas (48,57%). El resto de las mutaciones fueron identificadas en diferentes haplotipos, sin que ninguno fuera identificado en más de tres muestras.
- En cuatro de los pacientes estudiados no se identificó ninguna mutación relacionada a los fenotipos débil o parcial. Casos como éstos han sido reportados previamente en la literatura. Para estudiar en mayor profundidad estos cuatro pacientes, es recomendable secuenciar el gen *RHD* completo (incluyendo promotor e intrones completos) y ampliar el estudio a otros genes, tales como *RHCE* y *RHAG*.
- Los resultados obtenidos indican que algunas variantes débiles o parciales poco frecuentes podrían ser identificadas en la población chilena en porcentajes mayores a las reportadas en otros países de Europa.
- La correcta clasificación sanguínea de los pacientes con los fenotipos débil o parcial es de gran importancia clínica debido a que los antígenos del sistema RH son altamente inmunogénicos, es por esto que errores en la clasificación Rh pueden provocar graves complicaciones en el caso de mujeres embarazadas o al realizar transfusiones sanguíneas y trasplantes.

Bibliografía

1. Dean L. The ABO blood group. Blood Groups and Red Cell Antigens. 2005:Capítulo 5.
2. Mitra R, Mishra N, Rath GP. Blood groups systems. Indian J Anaesth. 582014. p. 524-8.
3. Baptista-Gonzalez HA. El sistema Rh, una mirada a fondo. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2017;43(Supl 1):3-8.
4. Westhoff CM. The Structure and Function of the Rh antigen Complex. Semin Hematol. 2007;44(1):42-50.
5. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. Blood. 2000;95(2):375-87.
6. Avent ND, Ridgwell K, Tanner MJ, Anstee DJ. cDNA cloning of a 30 kDa erythrocyte membrane protein associated with Rh (Rhesus)-blood-group-antigen expression. Biochem J. 1990;271(3):821-5.
7. Van Kim CL, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. Blood Rev. 2006;20(2):93-110.
8. Evers SA, Ridgwell K, Mawby WJ, Tanner MJ. Topology and organization of human Rh (rhesus) blood group-related polypeptides. J Biol Chem. 1994;269(9):6417-23.
9. Burton NM, Anstee DJ. Structure, function and significance of Rh proteins in red cells. Curr Opin Hematol. 2008;15(6):625-30.
10. Aude Deschuyteneer MB, Christelle De Mees, Pascale Van Vooren, René Wintjens, Anna Maria Marini. SNPs Altering Ammonium Transport Activity of Human

Rhesus Factors Characterized by a Yeast-Based Functional Assay. *PlosOne*. 2013;8(8): e71092.

11. Matassi G, Cherif-Zahar B, Pesole G, Raynal V, Cartron JP. The members of the RH gene family (RH50 and RH30) followed different evolutionary pathways. *J Mol Evol*. 1999;48(2):151-9.

12. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular Basis of Weak D Phenotypes. *Blood*. 1999;93(1):385-93.

13. Gutiérrez Martín A LSR, Cancino Ruiz A, López Suárez R, Dávalos Parra C. Estudiantes de Medicina de la Facultad de Medicina de la UAMex Pro Investigación A. C.: Hemólisis aguda como complicación postransfusional. *Revista de Medicina e Investigación*. 2013;1(2):108-12.

14. MINSAL. Política Nacional de Servicios de Sangre. Reglamento para los servicios de sangre. Ley Chile. 2008:16.

15. Nuchnoi P, Thongbus J, Srisarin A, Kerdpin U, Prachayasittikul V. Clinical and laboratory update on the DEL variant. *Lab Med*. 2014;45(4):285-90.

16. Almonacid. AA. Recomendaciones para la clasificación sanguínea RHD. Documentos técnicos para el laboratorio Clínico Instituto de Salud Pública. 2013;1:1-8.

17. McGowan EC, Lopez GH, Knauth CM, Liew YW, Condon JA, Ramadi L, et al. Diverse and novel RHD variants in Australian blood donors with a weak D phenotype: implication for transfusion management. *Vox Sang*. 2017:1-9.

18. Baptista-González HA. Actualidades en el sistema Rh-Hr. *Gaceta Médica de México*. 2004;140. Suplemento N° 3:37-40.

19. Legler TJ, Maas JH, Blaschke V, Malekan M, Ohto H, Lynen R, et al. RHD genotyping in weak D phenotypes by multiple polymerase chain reactions. *Transfusion*. 1998;38(5):434-40.
20. Chang J-G, Wang J-C, Yang T-Y, Tsan K-W, Shih M-C, Peng C-T, et al. Human RhDel Is Caused by a Deletion of 1,013 bp Between Introns 8 and 9 Including Exon 9 of RHD Gene. *Blood*. 1998;92:2602-4.
21. Wagner FF FW. The human RhesusBase 2014 [Available from: <http://www.rhesusbase.info/>].
22. Flegel WA. The genetics of the Rhesus blood group system*. *Blood Transfus*. 2007;5(2):50-7.
23. Daniels G. Variants of RhD--current testing and clinical consequences. *Br J Haematol*. 2013;161(4):461-70.
24. Legler TJ, Maas JH, Kohler M, Wagner T, Daniels GL, Perco P, et al. RHD sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. *Transfus Med*. 2001;11(5):383-8.
25. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(9):e67.
26. Orzińska A, Guz K, Polin H, Pelc-Kłopotowska M, Bednarz J, Gieleżyńska A, et al. RHD variants in Polish blood donors routinely typed as D-. *Transfusion*. 2013;53(11 Suppl 2):2945-53.
27. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. 2018.

28. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*. 2009;4(7):1073.
29. Zhang XH, Chasin LA. Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev*. 2004;18(11):1241-50.
30. Goren A, Ram O, Amit M, Keren H, Lev-Maor G, Vig I, et al. Comparative analysis identifies exonic splicing regulatory sequences--The complex definition of enhancers and silencers. *Mol Cell*. 2006;22(6):769-81.
31. Trucco Boggione C, Lujan Brajovich ME, Tarrago M, Mattaloni SM, Biondi CS, Muniz-Diaz E, et al. Molecular structures identified in serologically D- samples of an admixed population. *Transfusion*. 2014;54(10):2456-62.
32. Crottet SL, Henny C, Meyer S, Still F, Stolz M, Gottschalk J, et al. Implementation of a mandatory donor RHD screening in Switzerland. *Transfus Apher Sci*. 2014;50(2):169-74.
33. Polin H US, Lanzer G, Gabriel C, Gaszner W, Danzer M and Wagner T. RHD*Weak D Type 48 is prevalent in southern Austria. *Vox Sanguinis*. 2013;105(s1):65-299.
34. Brajovich ME, Boggione CT, Biondi CS, Racca AL, Tarrago M, Nogues N, et al. Comprehensive analysis of RHD alleles in Argentineans with variant D phenotypes. *Transfusion*. 2012;52(2):389-96.
35. Le Marechal C, Guerry C, Benech C, Burlot L, Cavelier B, Porra V, et al. Identification of 12 novel RHD alleles in western France by denaturing high-performance liquid chromatography analysis. *Transfusion*. 2007;47(5):858-63.

36. Pham BN, Roussel M, Gien D, Ripaux M, Carine C, Le Pennec PY, et al. Molecular analysis of patients with weak D and serologic analysis of those with anti-D (excluding type 1 and type 2). *Immunohematology*. 2013;29(2):55-62.
37. Granier T, Chiaroni J, Bailly P, Silvy M. First description of a D-CE-D hybrid gene on a weak D Type 2 molecular background. *Transfusion*. 2017;57(5):1248-53.
38. Luján TB, Racca, Nogues, Muñoz Diaz, Cotorruelo. DNA analysis of blood samples with weak D antigen expression. Congreso; XXXIst International Congress of the ISBT and 43rd Congress of the German DGTI; 2010; Berlín: International Society of Blood Transfusion; 2010.
39. Dogic P, Hundric-Haspl, Jurakovic-Loncar, Mratinovic-Mikulandra, Vuk, Balija, Jukic. Distribution of weak D types in the Croatian population. *Transfus Med*. 2011;21(4):278-9.
40. Garcia F, Spain CdTdMM, Rodriguez MA, Spain CdTdMM, Goldman M, Canada CBSOO, et al. New RHD variant alleles. *Transfusion*. 2014;55(2):427-9.
41. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. *Molecular Basis of Weak D Phenotypes*. 1999.
42. Cowley NM, Saul A, Hyland CA. RHD gene mutations and the weak D phenotype: an Australian blood donor study. *Vox Sang*. 2000;79(4):251-2.
43. Credidio DC, Pellegrino J, Castilho L. Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: impact for typing and transfusion strategy. *Immunohematology*. 2011;27(1):6-11.
44. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec PY, Roussel M, Patereau C, Noizat-Pirenne F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion*. 2004;44(9):1282-6.

45. Raud L, Le Marechal C, Ferec C, Fichou Y. Weak D type 1, 2 and 3 subtype alleles are rare in the Western French population. *Transfus Med.* 2017.
46. Araujo F, Rodrigues MJ, Monteiro F, Chabert T, Tavares G, Sousa G, et al. Weak D type 2 is the most prevalent weak D type in Portugal. *Transfus Med.* 2006;16(1):63-7.
47. Muller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schonitzer D, et al. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion.* 2001;41(1):45-52.
48. Trucco Boggione M, Luján Brajovich, Mattaloni, Dorgian de Macedo, Biondi, Castilho, Cotorruelo. Molecular study of D negative and D variant phenotypes in Argentina. Congreso; 27th Regional Congress International Society of Blood Transfusion; 2017; Copenague: International Society of Blood Transfusion; 2017.
49. Brajovich ML, Trucco Boggione C, Nogués N, Racca A, Muñiz-Díaz E, Cotorruelo C, et al. Alelos RHD nulos en pacientes RhD negativo de una población hospitalaria de la ciudad de Rosario. 2010.
50. Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL, Macarulla JM. *Bioquímica: Reverté*; 2007. 1026 p.
51. Morgan AA, Rubenstein E. Proline: the distribution, frequency, positioning, and common functional roles of proline and polyproline sequences in the human proteome. *PLoS One.* 2013;8(1):e53785.
52. Kormoczi GF, Gassner C, Shao CP, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion.* 2005;45(10):1561-7.

53. Wagner T, Kormoczi GF, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR, et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*. 2005;45(4):520-6.
54. von Zabern I, Flegel WA. IVS5-38del4 deletion in the RHD gene does not cause a DEL phenotype: relevance for RHD alleles including DFR-3. *Transfusion*. 2007;47(12):2477-81.
55. Polin H, Pelc-Klopotowska M, Danzer M, Suessner S, Gabriel C, Wilflingseder J, et al. Compound heterozygosity of two novel RHAG alleles leads to a considerable disruption of the Rh complex. *Transfusion*. 2016;56(4):950-5.
56. Hou L, Yan QD, Tian L. A novel nonsense mutation in RHAG gene responsible for Rhnull phenotype in a Chinese individual. *Transfus Apher Sci*. 2017;56(2):220-2.
57. Ouchari M, Romdhane H, Chakroun T, Abdelkefi S, Houissa B, Hmida S, et al. Weak D in the Tunisian population. *Blood Transfus*. 2015;13(2):295-301.
58. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA, Delaney M, Keller MA, et al. It's time to phase-in RHD genotyping for patients with a serological weak D phenotype. *Transfusion*. 2015;55(3):680-9.
59. Samir S, Jain A, Marwaha N. Frequency of DEL phenotype in RhD negative donor population of north India. *Transfus Apher Sci*. 2015;53(1):34-7.