



**COMITÉ DE EDUCACIÓN CONTINUA Y CONTINUADA**

**COORDINADORA: DRA CELINA MONTEMAYOR**

**PROGRAMA CONSULTA AL EXPERTO**

**COORDINADORA: DRA GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ**

**ALELOS RESPONSABLES DE LAS EXPRESIONES DÉBILES DEL ANTÍGENO D.  
DISTRIBUCIÓN EN ARGENTINA**

**PROFESOR INVITADO: CARLOS MIGUEL COTORRUELO**

Bioquímico egresado de la Universidad Nacional de Rosario, especialista en Inmunohematología y Doctor en Ciencias Biológicas.

Profesor Asociado de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario(Argentina) y Director del Laboratorio de Inmunohematología y Biología Molecular de los Grupos Sanguíneos que presta servicios al Hospital Provincial del Centenario.

[ccotorru@fbioyf.unr.edu.ar](mailto:ccotorru@fbioyf.unr.edu.ar)

## Fenotipo D variante

Los individuos portadores de variantes D poseen una expresión heterogénea del antígeno D en la membrana eritrocitaria. Estas variaciones pueden ser cualitativas o cuantitativas. Los individuos portadores de variantes cualitativas son susceptibles de desarrollar una aloinmunización hacia los epitopes ausentes del antígeno D cuando son expuestos a eritrocitos D positivo. Sin embargo, los portadores de variantes cuantitativas no se encuentran en riesgo de aloinmunización anti-D.<sup>1,2</sup>

Las expresiones aberrantes del antígeno D reciben, en conjunto, el nombre de “variantes D” ya que su discriminación serológica tiene límites confusos y depende principalmente de la sensibilidad y avidéz de los reactivos utilizados. Los estudios de biología molecular han sido fundamentales para el conocimiento de la complejidad genética responsable de la generación de las distintas variantes D. En caucásicos, aproximadamente el 1% de los individuos son portadores de alelos *RHD* que codifican para un fenotipo D variante, mientras que en poblaciones africanas esta incidencia es mayor.<sup>1,2,3,4,5</sup>

Las diferencias entre las variantes que tenían una expresión anómala del antígeno D fueron establecidas considerando el concepto de epitopes D desarrollado a partir de la producción de anticuerpos monoclonales en la década de 1980.<sup>1</sup>

Las variantes cualitativas, caracterizadas por la ausencia de uno o más epitopes del antígeno D, son denominadas “D parcial”. Estos fenotipos D parcial, fueron clasificados originalmente en categorías -II a VII- y éstas a su vez, en subcategorías en función de las intensidades de hemaglutinación observadas. Posteriormente surgieron nuevos fenotipos D parcial que han sido denominados con diferentes siglas como DBT, DFR, entre otras. Los eritrocitos portadores de estas variantes muestran patrones de aglutinación con diferente fuerza de reactividad cuando son analizados por serología con reactivos anti-D monoclonales. Algunos de estos fenotipos presentan reacciones de aglutinación similares a los glóbulos rojos D positivo (Ej: DIIIa, DBT), mientras que otros generan patrones de aglutinación con menor (Ej: DVII) o incluso mayor (Ej: DIVa) fuerza de reactividad que los glóbulos rojos D positivo normal. El fenotipo DVI, es el de mayor importancia clínica dentro de las variantes D con fenotipo D parcial: su incidencia es del 0,02% en ingleses y estadounidenses, 0,03% en australianos y 0,05% en holandeses. El fenotipo DVI es producto de alelos híbridos que se originan por un evento de conversión génica entre los genes *RH*. Los glóbulos rojos portadores de esta variante carecen de la mayoría de los epitopes D (epD1, 2, 5-8, según el modelo de los 9 epitopes), entre ellos el epD6/7, el cual se caracteriza por ser altamente inmunogénico. Los aloanticuerpos producidos por individuos DVI pueden provocar

Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal grave e incluso la muerte neonatal. La identificación de este fenotipo en receptores es importante porque deben recibir sangre D negativo para evitar la formación de aloanticuerpos anti-D. Por esta misma razón, las embarazadas con fenotipo DVI deben recibir la profilaxis con inmunoglobulina anti-D.<sup>1,6,7</sup>

En cambio, las variantes cuantitativas del antígeno D poseen un número menor de sitios antigénicos por eritrocito comparado a un fenotipo D positivo normal y reciben el nombre de “D débil”. Los glóbulos rojos con este fenotipo presentan generalmente una reacción de aglutinación débil con los anticuerpos monoclonales anti-D de clase IgM en medio salino que se potencia en fase antiglobulina utilizando reactivos anti-D de clase IgG. La clasificación de los distintos alelos en diferentes “tipos” se realizó en base a la mutación responsable de la expresión disminuida del antígeno D. Se han descrito más de 140 alelos responsables del fenotipo D débil, algunos de los cuales se dividen, a su vez, en varios subtipos. A pesar de estar asociados a diferentes grados de debilidad estos tipos de D débil no pueden ser distinguidos serológicamente. Los fenotipos D débil tipo 1, 2 y 3 representan las variantes más frecuentes en poblaciones europeas, superando en conjunto el 80% de todos los D débil. Se ha reportado que individuos portadores de estos fenotipos no son susceptibles de aloinmunización anti-D ante un desafío con glóbulos rojos D positivo.<sup>1,2,4,5,6,8</sup>

Las variantes D son originadas principalmente por algunos los siguientes eventos moleculares<sup>1,2,8</sup>:

- Cambios en uno o pocos nucleótidos en el gen *RHD*, con las consecuentes sustituciones de aminoácidos (AAs) en la proteína RhD.
- Conversión génica, mediante la cual se producen genes híbridos donde un segmento del gen *RHD* se sustituye por el mismo segmento correspondiente al gen *RHCE*. La sección recombinada puede consistir en una parte de un exón, todo un exón, o varios exones del gen *RHCE*.
- Duplicaciones de regiones exónicas e intrónicas del gen *RHD*, que puede incluir exones completos y/o parte de éstos, e intrones y/o segmentos intrónicos.

Entre los mecanismos moleculares que conducen al fenotipo D parcial podemos mencionar a los intercambios de segmentos de ADN entre los genes *RHD* y *RHCE* que originan alelos híbridos *RHD-CE-D*, sustituciones múltiples de nucleótidos que no involucran grandes fragmentos de ADN y mutaciones de cambio de sentido. Estos eventos genéticos producen tanto la pérdida o sustitución de aminoácidos localizados en dominios extracelulares de la proteína RhD, modificando la estructura tridimensional del antígeno D y, por lo tanto, algunos epitopes antigénicos como así también la formación de nuevos epitopes. En la Tabla I se

muestran algunos ejemplos de fenotipos D parcial indicando el polimorfismo en el gen *RHD* que los originan.<sup>1,2,8</sup>

**Tabla I. Bases moleculares de algunos fenotipos D parcial**

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

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

Flegel *y col.* han reportado que los alelos *D débil* presentan mutaciones puntuales en algunos exones responsables de sustituciones aminoacídicas en los dominios intracelulares o transmembrana de la proteína RhD. Estos cambios modificarían la estructura secundaria y terciaria del polipéptido RhD o alterarían su integración a la membrana eritrocitaria, al afectar la unión a los residuos de ácido palmítico acetilados o al alterar la interacción con la glicoproteína RhAG. Estas modificaciones provocarían una disminución en la expresión de los epitopes D en la membrana celular de los glóbulos rojos reduciendo la afinidad de los anticuerpos específicos. Estos hallazgos han permitido establecer una clasificación molecular del fenotipo D débil basada en la mutación responsable de la expresión disminuida del antígeno D.<sup>9</sup> En la Tabla II se detallan las mutaciones puntuales de los cuatro fenotipos D débil más frecuentes y su localización en la membrana eritrocitaria.

**Tabla II. Fenotipos D débiles más frecuentes**

Fenotipo	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Exón	Localización
D débil tipo 1	c.809T>G	p.Val270Gly	6	transmembrana
D débil tipo 2	c.1154G>C	p.Gly385Ala	9	transmembrana
D débil tipo 3	c.8C>G	p.Ser3Cys	1	intracelular
D débil tipo 4.0	c.602C>G	p.Thr201Arg	4	intracelular
	c.667T>G	p.Phe223Val	5	transmembrana
	c.819G>A	sin cambio	6	--

## Fenotipo DEL

Una expresión mínima del antígeno D en la membrana eritrocitaria caracteriza a los glóbulos rojos de los individuos con fenotipo variante DEL. El número de epitopes D que expresan los eritrocitos portadores de un fenotipo DEL varía entre 20 y 40 sitios antigénicos por célula. En los estudios inmunohematológicos de rutina los donantes DEL son tipificados erróneamente como D negativo debido a su escasa densidad antigénica. Solamente una pequeña cantidad de anti-D puede ser recuperada de glóbulos rojos DEL utilizando pruebas especializadas de adsorción-elución. La densidad de antígeno a veces está en el límite entre un fenotipo con expresión débil del antígeno D (pero detectada por métodos serológicos) y un fenotipo DEL porque se observa una reacción muy débil en solución salina con algunos clones IgM anti-D. Este patrón de reactividad dificulta, en ocasiones, la clasificación de un fenotipo variante como DEL.<sup>1</sup>

Mutaciones puntuales de cambio de sentido, cambios en los sitios de corte y empalme del ARNm, recombinaciones homólogas, inserciones y deleciones de nucleótidos en la secuencia codificante del gen *RHD* han sido reportados como los eventos genéticos responsables de los fenotipos DEL. La identificación de los polimorfismos que generan a estas variantes es de fundamental importancia para la medicina transfusional, ya que se han descrito algunos casos de inmunización anti-D en individuos D negativo transfundidos con unidades DEL. Por otro lado, se ha reportado el desarrollo de aloanticuerpos anti-D después de una transfusión o embarazo en pacientes DEL.<sup>1,3,4,10,11</sup>

Aproximadamente 50 alelos *RHD* son responsables de fenotipos DEL y casi todos están asociados a *RHCE\*Ce* o *RHCE\*cE*. Las variantes DEL son muy frecuentes en poblaciones asiáticas -prevalencia 10-30% en donantes con fenotipo D negativo- donde más del 95% de los portadores de un fenotipo DEL poseen el alelo *RHD\*DEL1* (*RHD(1227G>A)*). En cambio, en individuos caucásicos la detección de alelos DEL es excepcional -0,1%-, siendo *RHD\*11* (*RHD\*885T*) y *RHD\*DEL8* (*RHD\*IVS3+1G>A*) las variantes más frecuentes. En un estudio previo realizado en nuestro país, hemos detectado una prevalencia relativamente alta -4,39%- del alelo *RHD\*DEL43* (*RHD\*46C*), muy poco frecuente en otras poblaciones.<sup>8,10,11,12,13</sup>

## Distribución de alelos D débiles y D parciales en Argentina

Como se mencionó anteriormente, el fenotipo D variante se caracteriza por una expresión débil del antígeno D y es reconocido serológicamente a través de reacciones de hemaglutinación con antisueros anti-D que presentan intensidades menores a 3+. Algunos fenotipos D variante son detectados sólo en fase antiglobulina y otros por discrepancias en la

tipificación RhD. Los estudios serológicos, en la mayoría de los casos, no permiten diferenciar las variaciones cualitativas (fenotipo D parcial) de las cuantitativas (fenotipo D débil) de la proteína RhD, siendo necesario recurrir a métodos de biología molecular. Actualmente, se considera que los individuos portadores de una expresión débil del antígeno D originada por los alelos *RHD\*D débil tipo 1, 2 3, 4.0 y 4.1* no producen anticuerpos anti-D.<sup>14,15,16,17,18</sup>

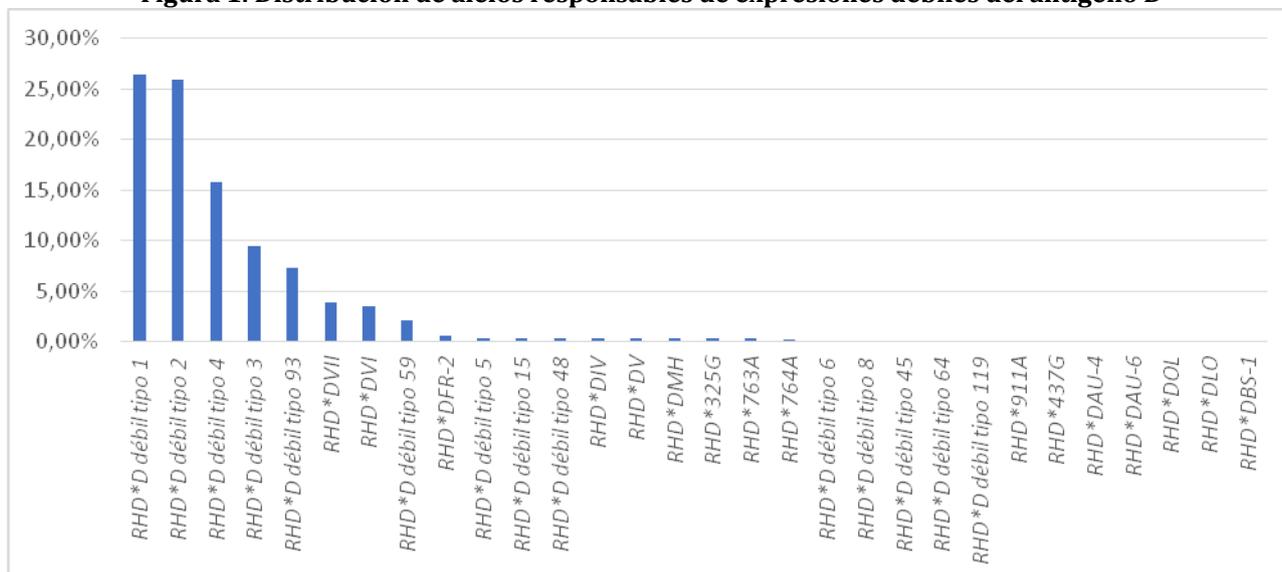
En nuestro laboratorio hemos investigado las bases moleculares responsables del fenotipo D variante en muestras de pacientes de nuestro país. Se estudiaron 788 muestras de sangre de pacientes o donantes portadores de una expresión débil del antígeno D utilizando diferentes estrategias de biología molecular. Se identificaron las siguientes variantes alélicas:

**Tabla III. Alelos responsables de expresiones débiles del antígeno D**

<b>Alelo RHD</b>	<b>n=788</b>	<b>Frecuencia</b>
<i>RHD*D débil tipo 1</i>	208	26,39%
<i>RHD*D débil tipo 2</i>	204	25,88%
<i>RHD*D débil tipo 3</i>	75	9,51%
<i>RHD*D débil tipo 4</i>	124	15,74%
<i>RHD*D débil tipo 5</i>	3	0,38%
<i>RHD*D débil tipo 6</i>	1	0,13%
<i>RHD*D débil tipo 8</i>	1	0,13%
<i>RHD*D débil tipo 15</i>	3	0,38%
<i>RHD*D débil tipo 45</i>	1	0,13%
<i>RHD*D débil tipo 48</i>	3	0,38%
<i>RHD*D débil tipo 59</i>	17	2,16%
<i>RHD*D débil tipo 64</i>	1	0,13%
<i>RHD*D débil tipo 93</i>	58	7,36%
<i>RHD*D débil tipo 119</i>	1	0,13%
<i>RHD*DVII</i>	31	3,93%
<i>RHD*DIV</i>	3	0,38%
<i>RHD*DV</i>	3	0,38%
<i>RHD*DVI</i>	28	3,55%
<i>RHD*DMH</i>	3	0,38%
<i>RHD*DFR-2</i>	5	0,63%
<i>RHD*325G</i>	3	0,38%
<i>RHD*763A</i>	3	0,38%
<i>RHD*764A</i>	2	0,25%
<i>RHD*911A</i>	1	0,13%
<i>RHD*437G</i>	1	0,13%
<i>RHD*DAU-4</i>	1	0,13%
<i>RHD*DAU-6</i>	1	0,13%

<i>RHD</i> *DOL	1	0,13%
<i>RHD</i> *DLO	1	0,13%
<i>RHD</i> *DBS-1	1	0,13%

**Figura 1. Distribución de alelos responsables de expresiones débiles del antígeno D**



Los estudios moleculares permitieron determinar que más del 60% de las muestras con fenotipo D variante analizadas son portadoras de alelos *D débiles tipo 1*, *tipo 2* y *tipo 3*. El predominio de estos alelos, característicos de caucásicos europeos, indica el aporte de esta etnia al acervo genético de los individuos de nuestro país. La caracterización molecular del fenotipo D variante permite un mejor manejo de las unidades D negativo y un uso racional de la profilaxis con IgG anti-D.

### Distribución de alelos DEL en Argentina

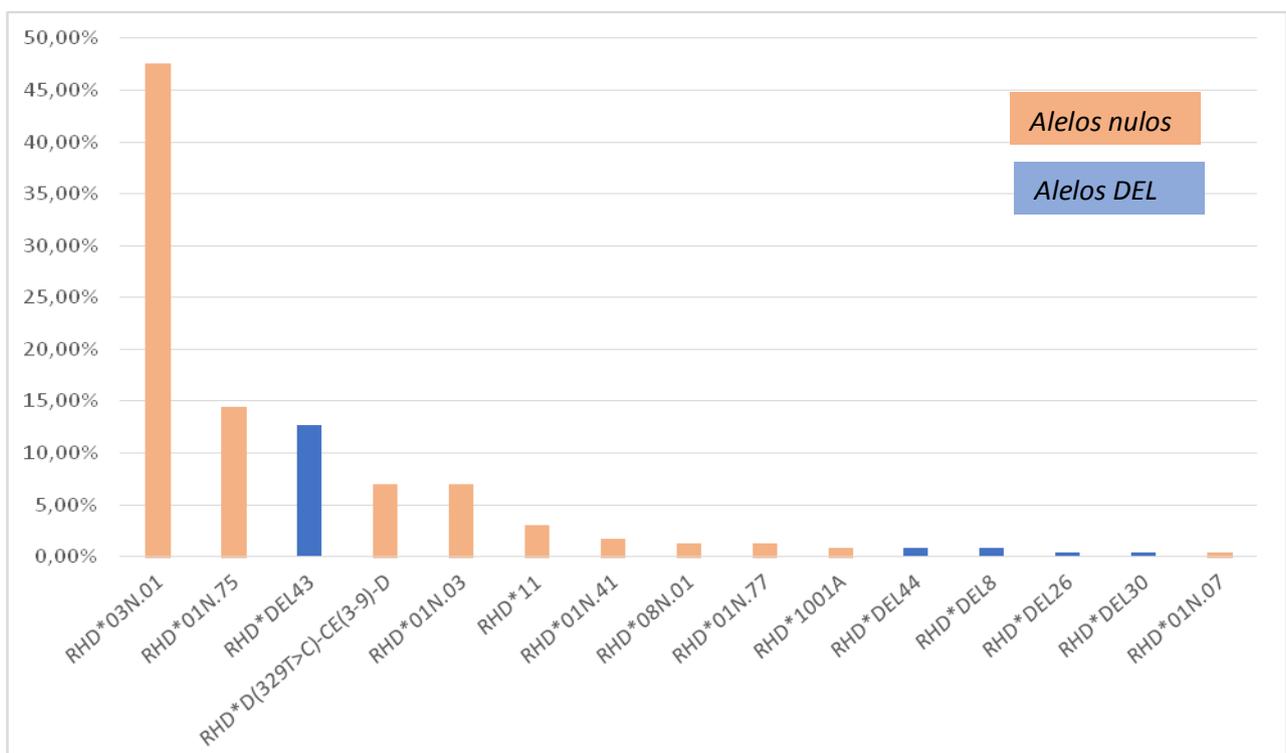
Los individuos con fenotipo D negativo resultan, principalmente, de la ausencia del gen *RHD* debido a un evento de delección, siendo las personas D negativo homocigotas para esta delección. Sin embargo, existen numerosas variantes alélicas responsables de un fenotipo D negativo. Los alelos *RHD* nulos originan polipéptidos que no expresan epitopes D o no se integran en la membrana eritrocitaria mientras que los alelos *DEL* codifican proteínas que expresan una escasa cantidad de epitopes D que solo es detectada por técnicas serológicas especializadas. Estos fenotipos están fuertemente asociados a la expresión concomitante del antígeno C o E en la proteína RhCE. Debido a la dificultad para identificar los fenotipos DEL, los donantes portadores de variantes *DEL* son tipificados erróneamente como D negativo, con el riesgo de inducir una aloinmunización en receptores D negativo.<sup>19,20,21,22,23</sup>

En nuestro laboratorio hemos caracterizado a nivel molecular las variantes alélicas responsables de fenotipos D negativo. Se analizaron 1354 muestras D negativo portadoras de los antígenos C y/o E utilizando diferentes estrategias de biología molecular. Los estudios realizados permitieron identificar 229 (16,91%) muestras D negativas portadoras de secuencias génicas *RHD* específicas (D-/*RHD*+). En este grupo de muestras los estudios moleculares permitieron caracterizar los siguientes alelos:

**Tabla IV. Alelos presentes en muestras D-/*RHD*+, portadoras de C y/o E**

	Alelo <i>RHD</i>	n=229	Frecuencia
Nulo	<i>RHD</i> *03N.01	109	47,60%
	<i>RHD</i> *01N.75	33	14,41%
	<i>RHD</i> *D(329T>C)-CE(3-9)-D	16	6,99%
	<i>RHD</i> *01N.03	16	6,99%
	<i>RHD</i> *01N.41	4	1,75%
	<i>RHD</i> *08N.01	3	1,31%
	<i>RHD</i> *1001A	2	0,87%
	<i>RHD</i> *01N.07	3	0,44%
	<i>RHD</i> *01N.77	1	1,31%
DEL	<i>RHD</i> *DEL43	29	12,66%
	<i>RHD</i> *11	7	3,05%
	<i>RHD</i> *DEL44	2	0,87%
	<i>RHD</i> *DEL8	2	0,87%
	<i>RHD</i> *DEL26	1	0,44%
	<i>RHD</i> *DEL30	1	0,44%

**Figura 1. Distribución de alelos presentes en muestras D-/*RHD*+, portadoras de C y/o E**



Se encontró que el 3,18% de individuos D negativo que expresan los antígenos C y/o E son portadores de alelos *DEL*. El conocimiento de las bases moleculares de estos alelos *DEL* resulta fundamental para desarrollar estrategias de genotipificación en individuos D negativo. Esto evitará la transfusión de unidades DEL a pacientes con riesgo de aloinmunización.

## Bibliografía

1. Daniels GL. Human blood groups. 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013.
2. Muñoz-Díaz E, Cotorruelo C, Nogués N. Capítulo 5: Sistema Rh. Inmunohematología básica y aplicada. Primera edición. GCIAMT, 2014.
3. Daniels G. (2013). Variants of RhD--current testing and clinical consequences. *Br J Haematol*, 161(4):461-470.
4. Wagner F, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher N, Lonicer C, Müller T, Siegel M, Flegel W. (2000). Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*, 96: 2699-2708.
5. Müller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, et al. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion* 2001; 41(1):45-52.
6. Judd W, Moulds M, Schlanser G. (2005). Reactivity of FDA-approved anti-D reagents with partial D red blood cells. *Immunohematology*, 21(4): 146.
7. Esteban, R., Montero, R., Flegel, Willy A., Wagner, Franz F., Subirana, L., Parra, R., Ribera, A. and Nogués, N. (2006). The D category VI type 4 allele is prevalent in the Spanish population. *Transfusion*, 46: 616-623.
8. International Society of Blood Transfusion (ISBT). Red cell immunogenetics and blood group terminology. 2020. <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cellimmunogenetics-and-blood-group-terminology/>.
9. Flegel W, Wagner F. (2002). Molecular biology of Partial D and weak D. Implications for blood bank practice. *Clin Lab*, 48: 53-59.
10. Körmöczi G, Gassner C, Shao C, Uchikawa M, Legler T. (2005). A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion*; 45: 1561-1567.
11. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. (2005). Secondary anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*, 45: 1581-1584.
12. Flegel WA, Wagner FF. (2020). DEL. *Blood Transfus*, 18(3):159-162.
13. Trucco Boggione C, Luján Brajovich M, Tarragó M, Mattaloni S, Biondi C, Muñoz-Díaz E, Nogués N, Cotorruelo C. (2014). Molecular structures identified in serologically D- samples of an admixed population. *Transfusion*, 54: 2456-2462.
14. Roback J. Technical Manual, 18th edition. American Association of Blood Banks. United States. 2019.
15. Denomme G, Dake L, Vilensky D, Ramyar L, Judd W. (2008). Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion*, 48: 473-478.
16. Denomme G, Wagner F, Fernandes B, Li W, Flegel W. (2005). Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion*, 45: 1554-60.
17. Flegel W. (2006). How I manage donors and patients with a weak D phenotype? *Current Opinion in Hematology*, 13: 476-483.
18. Sandler S, Flegel W, Westhoff C, Denomme G, Delaney M, Keller M, Johnson S, Katz L, Queenan J, Vassallo R, Simon C. (2015). It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. *Transfusion*, 55: 680-689.
19. Sun C, Liu J, Chen D, Wang W, Yang T. (2008). Use of real time PCR for rapid detection of Del phenotype in Taiwan. *Ann Clin Lab Sci*, 38: 258-263.
20. Kim J, Kim S, Kim C, Yon G, Park S. (2005). Molecular characterization of D-Korean persons: development of a diagnostic strategy. *Transfusion*, 45: 345-52.
21. Yang HS, Lee MY, Park TS, et al. Primary anti-D alloimmunization induced by "Asian type" RHD (C.1227G>A) DEL red cell transfusion. (2015) *Ann Lab Med.*;35:554-6.
22. Gardener G, Legler T, Hyett J, et al. Anti-D in pregnant women with the RHD(IVS3+1G>A)-associated DEL phenotype. (2012) *Transfusion*,52(9):2016-9.
23. Gassner C, Doescher A, Drnovsek T, Rozman P, Eicher N, Legler T, Lukin S, Garritsen H, Kleinrath T, Egger B, Ehling R, Körmöczi G, Kilga-Nogler S, Schoenitzer D, Petershofen E. (2005). Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion*, 45: 527-538.