



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTICACION



---

# **DETERMINACION DE LOS ALELOS PRINCIPALES DE LOS GRUPOS SANGUINEOS DUFFY Y DIEGO**

## **T E S I S**

**Que como parte uno de los requisitos para obtener el grado de  
Maestría en Ciencias Quimicobiológicas**

**Presenta**

**QFB. MARCELO ARREYGUE AVILA**

**Directores de Tesis**

DRA. FANY ROSENFELD MANN

DRA. ELBA REYES MALDONADO



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D. F., siendo las 13:00 horas del día 27 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

**Determinación de los alelos principales de los grupos sanguíneos Duffy y Diego**

Presentada por el alumno:

<u>Arreygue</u> Apellido paterno	<u>Avila</u> Apellido materno	<u>Marcelo</u> Nombre(s)
Con registro:		
B	0	9 1 0 1 1

aspirante de:

**Maestría en Ciencias Quimicobiológicas**

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Erba Reyes Maldonado

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Fany Rosenfeld Mann


  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ethel Awilda García Latorre


  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ruth Angélica Lezama Palacios

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Héctor Alfredo Baptista González

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Martha Cecilia Moreno Lafont

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Manuel Jesús Piñón López






**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**


*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de **México, D.F.**, el día **28** del mes **Junio** del año **2011**, el que suscribe **Marcelo Arreygue Avila** alumno del Programa de **Maestría en Ciencias Quimicobiológicas** con número de registro **B091011**, adscrito a la **Escuela Nacional de Ciencias Biológicas**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Elba Reyes Maldonado y la Dra. Fany Rosenfeld Mann** y ceden los derechos del trabajo intitulado **Determinación de los alelos principales de los grupos sanguíneos Duffy y Diego**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **relba@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Nombre y firma del alumno

  
Nombre y firma del director

  
Nombre y firma del director

Este trabajo fue realizado en el servicio de Hematología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología de la secretaria de Salud, el Banco de Sangre del Hospital Médica Sur, y en el laboratorio de Hematopatología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, bajo la dirección de la Dra. Fany Rosenfeld Mann y la Dra. Elba Reyes Maldonado, con recursos federales del Instituto Nacional de Perinatología de la Secretaria de Salud y del Banco de Sangre del Hospital Medica Sur.

Deriva del protocolo de investigación con registro 212250 07241 del propio instituto siendo el investigador principal el Dr. Héctor A. Baptista González.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca durante 24 meses para la realización de este proyecto con número de becario 231862.

Mi agradecimiento especial para:

Dr. Héctor A. Baptista González

Dra. Fany Rosenfeld Mann

Dra. Elba Reyes Maldonado

QBP. Rocío Trueba Gómez

Biol. Georgina Coeto Barona

QFB. Carmen Santamaría Hernández

Por compartirme sus experiencias, enseñanzas y brindarme su apoyo para la realización de este proyecto.

Al Instituto Nacional de Perinatología de la secretaria de salud

Al Servicio de Medicina transfusional y Banco de Sangre del Hospital Medica Sur.

A la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional

## INDICE

Índice de figuras	ii
Índice de tablas	lv
Abreviaturas	v
Resumen	vi
Abstract	vii
Introducción	1
Grupos sanguíneos	1
Clasificación bioquímica y funcional de los antígenos de grupo sanguíneo	4
Clasificación de los sistemas de grupos sanguíneos según la sociedad internacional de la transfusión sanguínea	4
Mecanismos de variabilidad genética	5
Sistema de grupo sanguíneo Duffy	7
Anticuerpos anti-Fy	10
Sistema de grupo sanguíneo Diego	11
Anticuerpos anti-Di	14
Aloimmunización por grupos sanguíneos Duffy y Diego	15
Aplicación de la genotipificación de los antígenos eritrocitarios en la práctica transfusional	16
Justificación	18
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
II. Material y métodos	20
Extracción y purificación de DNA	21
Pureza e integridad del DNA	21
PCR en tiempo real	22
PCR alelo específica (PCR-SSP)	25
III. Resultados	28
IV. Discusión	33
V. Conclusiones	38
VI. Bibliografía	39

## Índice de figuras

<b>No. Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>No. Página</b>
1	Unión antígeno anticuerpo	1
2	Organización de las proteínas de los grupos sanguíneos en la membrana eritrocitaria	3
3	Clasificación bioquímica y funcional de los grupos sanguíneos	4
4	Mecanismos de variabilidad genética	6
5	Polimorfismos de una solo nucleótido del gen DARC	8
6	Esquema estructural de la proteína Duffy	10
7	Polimorfismos de un solo nucleótido del gen SLC4A1	11
8	Esquema de la banda 3	13
9	Esquema estructural de la banda 3	14
10	Diagrama que muestra los pasos a seguir en la elección de un hemoderivado	16
11	Sistema automatizado para la determinación de grupos sanguíneos	20
12	Gel de agarosa al 1% donde se muestra la integridad del DNA	22
13	Sondas de hibridación	23
14	Curvas de disociación (melting)	24
15	Diagrama de flujo del procedimiento	27
16	Imagen representativa de la identificación de los genotipos FY*A y FY*B	28
17	Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de PCR alelo específico para el gen Duffy	29
18	Imagen representativa de la identificación de los genotipos DI*A y DI*B	31

19 Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de PCR alelo  
especifico para el gen Diego

31



## Índice de tablas

<b>No. Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>No. Página</b>
<b>1</b>	Clasificación de las proteínas según su localización en la membrana	<b>5</b>
<b>2</b>	Clasificación de los grupos sanguíneos de la ISBT	<b>6</b>
<b>3</b>	Polimorfismos de un solo nucleótido de los grupos sanguíneos Duffy y Diego	<b>7</b>
<b>4</b>	Resumen de la información del gen DARC y sus productos	<b>12</b>
<b>5</b>	Resumen de la información del gen SLC4A1 y sus productos	<b>17</b>
<b>6</b>	Utilidad de la genotipificación de los grupos sanguíneos en la práctica transfusional	<b>26</b>
<b>7</b>	Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real	<b>27</b>
<b>8</b>	Condiciones para la PCR específica para los alelos Duffy	<b>27</b>
<b>9</b>	Condiciones para la PCR específica para los alelos Diego	<b>31</b>
<b>10</b>	Resultados de la fenotipificación y genotipificación del sistema Duffy	<b>33</b>
<b>11</b>	Resultados de la fenotipificación y genotipificación del sistema Diego	<b>35</b>
<b>12</b>	Concordancia fenotipo serológico y genotipo del sistema Duffy	<b>36</b>
<b>13</b>	Resultados obtenidos de los fenotipo y genotipo por otros autores para el sistema Duffy	<b>37</b>
<b>14</b>	Resultados obtenidos de fenotipo y genotipo por otros autores para el sistema Duffy	<b>38</b>
<b>15</b>	Concordancia fenotipo serológico y genotipo del sistema Diego	<b>38</b>
<b>16</b>	Comparación de concordancias con lo reportado en la literatura	<b>37</b>

## Abreviaturas

GPI	Glicosilfosfatidilinositol
Yt	Sistema de grupo sanguíneo Cartwright
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
Dia/Dib	Antígeno Diego a y Diego b del sistema Diego
Fya/Fyb	Antígeno Duffy a y Duffy b del sistema Duffy
Kpa/Kpb	Antígeno Penny y Rautemberg del sistema Kell
K/K	Antígeno Kell y Kell cellano del sistema Kell
Fy	Grupo sanguíneo Duffy
1q23.2	Cromosoma 1 brazo largo banda 23 subbanda 2
GRO	Quimiocina del oncogen relacionado con el conocimiento del inglés Growth Related Oncogene
RANTES	Quimiocina expresada y secretada por células T normales reguladas o en activación del inglés Regulated Activate Normal T-cell Expressed and secretad
IL-8	Interleucina 8
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MGSA	Interleucina con actividad estimulada del mieloma
TARG	Quimiocina de activación por regulación química
DARC	Antígeno DUFFY/Readaptado de quimiocinas
HIV-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1
ERHN	Enfermedad Hemofílica del Recién Nacido
SLC4A1	Gen de la Familia de Transportadores de soluto 4 intercambior de amonio miembro 1
ACII	Anhidrasa Carbónica II
PCR-TR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
AGH	Antiglobulina Humana
PCR-SSP	Reacción en cadena de la polimerasa alelo especifico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

## **Resumen**

En el campo de la medicina transfusional, es importante el estudio y la determinación de los grupos sanguíneos Duffy y Diego en los donadores y en los pacientes que se someten a transfusiones o trasplantes. En el ámbito antropológico son considerados como marcadores de identidad poblacional o genética. Se han realizado algunos estudios en relación al fenotipo de los sistemas Duffy y Diego en población mexicana, sin embargo, a la fecha no se han caracterizado los genotipos con el fin de determinar la correlación existente entre ambos estudios y poder usarlos como herramienta en estudios clínicos y de poblaciones.

**Objetivo:** Determinar los alelos principales de los grupos sanguíneos Duffy y Diego en una muestra de la población residente de la Ciudad de México y área conurbada.

**Material y métodos:** Las muestras de ADN se obtuvieron de donadores del Hospital Médica Sur y del Instituto Nacional de Perinatología, SS.. Se usó la PCR en tiempo real utilizando el LightCycler®. con las sondas de hibridación LightCycler FastStart DNA Master HybProbe y la PCR alelo específica Red Cell EZ Type® para caracterizar los alelos FY\*A, FY\*B, FY\*X, FY\*NULL, DI\*A Y DI\*B.

**Resultados:** Se estudiaron 403 individuos para el grupo sanguíneo Duffy, la frecuencia fenotípica encontrada para Fya+b-, Fya+b+, Fya-b+ y Fya-b- fue de 36.7, 43.5, 17.1 y 2.7 %, respectivamente, mientras que para los alelos FY\*A, FY\*B, FY\*0 y FY\*X las frecuencias fueron 0.543, 0.419, 0.026 y 0.012, respectivamente. La concordancia global entre el genotipo y fenotipo para el sistema Duffy, donde esta fue de 0.959; para los fenotipos Fya+b+ y Fya-b+ fue de 0.971 en ambos casos, Fya+b- 0.912 y para el fenotipo nulo (Fya-b-) fue de 0.546, que fue en el grupo que se encontró la mayoría de discrepancias. La fenotipificación y genotipificación del sistema Diego se realizó en 247 sujetos, detectándose los fenotipos Dia+b+ y Dia-b+ en 17.8 y 82.2% respectivamente, no se identificaron individuos con fenotipo Dia+b-. La frecuencia para el alelo DI\*A fue de 0.085 y para DI\*B de 0.915, no se encontró el alelo DI\*A en forma homocigota en ningún donador. Siendo la concordancia global para este sistema de 0.972 y por fenotipo de 0.909 para Dia+b+ y de 0.990 para Dia-b+. La concordancia global entre el genotipo y fenotipo para el sistema Duffy, donde esta fue de 0.959; para los fenotipos Fya+b+ y Fya-b+ fue de 0.971 en ambos casos, Fya+b- 0.912 y para el fenotipo nulo (Fya-b-) fue de 0.546, que fue en el grupo que se encontró la mayoría de discrepancias.

Siendo la concordancia global para este sistema Diego de 0.972 y por fenotipo de 0.909 para Dia+b+ y de 0.990 para Dia-b+.

**Conclusiones:** Para el sistema Duffy la población estudiada es más parecida a los caucásicos que a los individuos de origen negroafricano, por la mayor frecuencia del alelo FY\*A. El mecanismo predominante para el fenotipo Duffy nulo en nuestra población, es el filipino (FY\*0 sobre el alelo FY\*A). El antígeno Dia del sistema Diego, se encuentra en muy pocos individuos por lo que se considera un marcador poblacional y peligroso en términos transfusionales.

## **Abstract**

In the field of transfusion medicine, it is important to study and determination of the Duffy blood group and Diego in donors and in patients who undergo transfusions or transplants. In the anthropological field are considered as markers of population or genetic identity. There have been some studies regarding the phenotype of the Duffy and Diego systems in the Mexican population, however, to date have not been characterized genotypes to determine the correlation between the two studies and use them as a tool in clinical studies and populations.

**Objective:** To determine the major alleles of the Duffy and Diego blood groups in a sample of the resident population of the Mexico City metropolitan area.

**Methods:** DNA samples were obtained from donors at Medica Sur Hospital and INPer. We used real-time PCR and allele specific to characterize the alleles FY \* A, FY \* B, FY \* X, FY \* NULL, DI \* DI \* B AY using the LightCycler®. Hybridization probes were used LightCycler FastStart DNA Master HybProbe and EZ Type® Red Cell for the determinations.

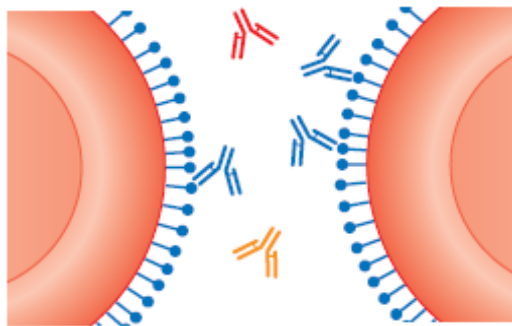
**Results:** We studied 403 individuals for the Duffy blood group, frequency phenotypic found to Fya + b-, Fya + b + Fya-b + and Fya-b-was 36.7, 43.5, 17.1 and 2.7% respectively, while for alleles FY \* A, FY \* B, FY \* 0 and FY \* X frequencies were 0.543, 0.419, 0.026 and 0.012, respectively. concordance between genotype and phenotype for the Duffy system, where this was 0959, for phenotypes Fya + b + and Fya-b + was 0.971 in both cases, Fya + b-0912 and the null phenotype (Fya-b-) was 0.546, which was in the group that found the majority of discrepancies. The system fenotipicaci3n Diego and genotyping was performed in 247 subjects, detected phenotypes and Day + b + a-b + Di in 17.8 and 82.2% respectively, did not identify individuals with phenotype Day + b-. The allele frequency for the DI \* A was 0.085 and 0.915 DI \* B, not found DI \* A allele in homozygous form in any donor. As the overall agreement for this system of 0972 and 0909 phenotype for Day + b + and 0990 for Dia-b +.

**Conclusions:** For the population studied Duffy system is more like whites than blacks by the higher frequency of allele FY \* A. The predominant mechanism for Duffy null phenotype in our population, the Philippines (FY \* 0 on FY \* A allele). The Dia antigen of the Diego system, is found in very few individuals at a marker that is considered dangerous in terms of population and transfusion.

## I. INTRODUCCIÓN.

### Grupos sanguíneos.

Las células portan en su superficie numerosas proteínas polimórficas que pueden ser reconocidas como antígenos por el sistema inmune de sujetos que carezcan de ellas. La caracterización de dichos antígenos y anticuerpos es la base de las pruebas de compatibilidad que se realizan antes de una transfusión <sup>(Beutler 2007)</sup>. Los antígenos de grupo sanguíneo son polimórficos e inmunogénicos y sus epítomos están localizados en proteínas, glicoproteínas o glicolípidos en la superficie celular <sup>(Cotorruelo, 2009)</sup>. El término grupo sanguíneo suele estar restringido a los antígenos de superficie de las células sanguíneas y particularmente a los antígenos de los eritrocitos <sup>(Daniels y cols, 2007)</sup>. Los grupos sanguíneos se definen como “determinantes antigénicos (epítomos) heredados, presentes en la superficie de los eritrocitos y otros tejidos, detectados por el uso de anticuerpos específicos”; aunque actualmente las herramientas de la biología molecular permiten identificar los mecanismos de expresión (Figura 1).



**Figura 1. Unión antígeno anticuerpo.** A pesar de tener un gran número de anticuerpos circulantes en sangre, estos sólo se unen a su antígeno específico contra el cual fueron creados. (Tomado de Daniels 2002).

Landsteiner, en 1901, demostró experimentalmente por pruebas cruzadas utilizando eritrocitos y suero de él y sus colegas, los distintos patrones de aglutinación originados a los que llamo ABO. Hasta entonces se pensaba que las reacciones entre la sangre de distintas personas era resultado de la enfermedad del paciente <sup>(Daniels y cols. 2009)</sup>.

Los individuos presentan anticuerpos antitéticos contra el sistema ABO de manera "natural", como resultado de la inmunización por antígenos A, B, o ambos, presentes en microorganismos y alimentos del medio ambiente.

Los anticuerpos contra la mayoría de los antígenos de los grupos sanguíneos fueron identificados como consecuencia de eventos clínicos, por ejemplo:

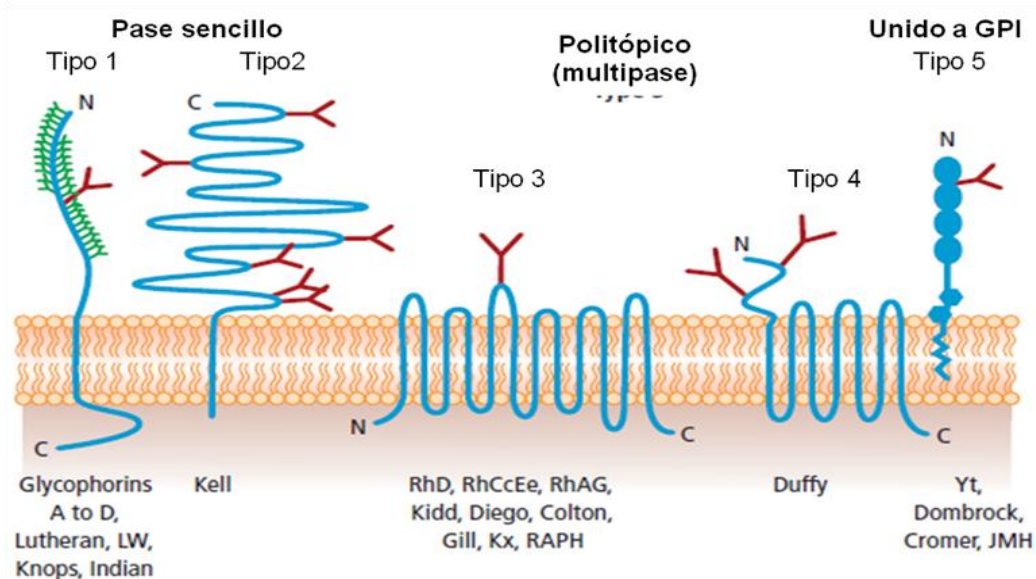
- + Anti-D, anti-K, anti-Jka y anti-Dia se encontraron causando la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido.
- + Anti-c, anti-e y anti-Fya se encontraron en respuesta a la transfusión. (Daniels y cols. 2009)

Los antígenos de los grupos sanguíneos, como otras constituyentes de la membrana citoplásmica, son estructuras químicas (proteínas, glicolípidos y glicoproteínas), expuestas en la superficie de la membrana eritrocitaria, así como en otros tejidos y líquidos del organismo. Aquellos de origen proteico se pueden clasificar en base a su incorporación a la membrana en :

Tabla 1. Clasificación de las proteínas según su localización en la membrana.

Mono pase	<b>Tipo 1</b>	Dominio N-terminal extracelular y C-terminal citoplasmático.
	<b>Tipo 2</b>	Dominio C-terminal externo y N-terminal interno.
Multipase	<b>Tipo 3</b>	Cruzan la membrana varias veces. Usualmente ambos dominios terminales son citoplasmáticos.
	<b>Tipo 4</b>	Dominio N-terminal extracelular y C-terminal citoplasmático.
Ancla GPI	<b>Tipo 5</b>	No tienen dominio que atraviese la membrana, se anclan a ella a través de un enlace tipo glicosilfosfatidilinositol o ancla GPI, que se une al dominio C-terminal de la proteína a través de la fracción de carbohidratos.

Una representación esquemática de estas proteínas se muestra en la figura 2. (Daniels y cols, 2007; Denomme, 2004)



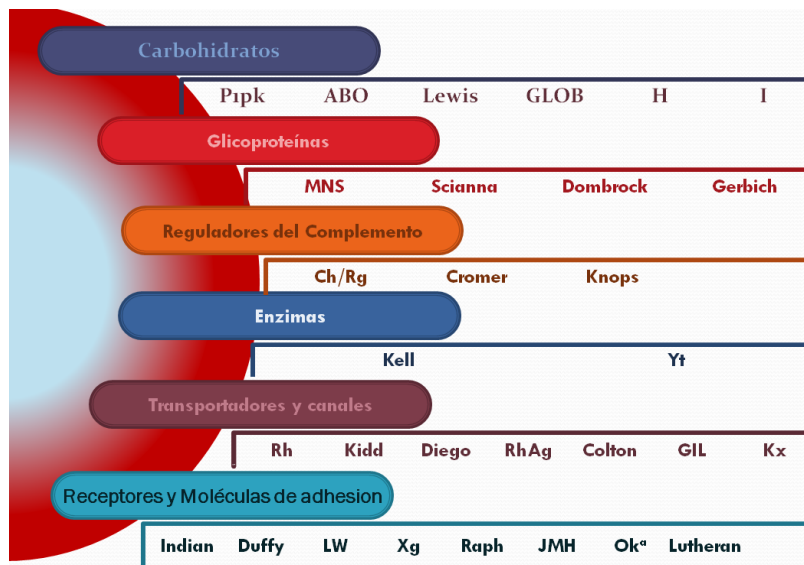
**Figura 2. Organización de las proteínas de los grupos sanguíneos en la membrana eritrocitaria.** Se esquematizan las diferentes proteínas con base en su integración en la superficie de los eritrocitos, enlistadas con ejemplos de antígenos de cada tipo. (Tomado de Daniels 2002).

Los antígenos que comparten características en común como su estructura química, localización en la membrana, son codificados por un solo gen o por un complejo de dos o más genes homólogos estrechamente ligados y tan próximos entre sí, que la recombinación entre ambos es remotamente posible, estos constituyen un Sistema de Grupo Sanguíneo (ABO, Rh, Duffy, MNS, etc). Las Colecciones incluyen aquellos grupos de antígenos relacionados entre sí, bioquímica y serológicamente, que no cumplen con los requisitos exigidos para un sistema genético, entre ellos el antígeno i, Lewis c y Lewis d. Las Series son antígenos que no pueden englobarse en un sistema ni en una colección: la serie 700 engloba antígenos de baja incidencia (<1%), por ejemplo los grupos Batty, Christiansen y Biles y la serie 900 engloba antígenos de alta frecuencia (>90%) tales como Langereis, August y Antón. (Daniels y cols, 2004)

Los anticuerpos antieritrocitarios son de importancia clínica porque causan reacciones transfusionales, enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), anemias hemolíticas autoinmunes. Ciertos antígenos de grupos sanguíneos se han asociado con diversas enfermedades como algunos defectos de membrana (fenotipos Rh nulo, McLeod y Leach). (Mohandas y Narla, 2005)

### Clasificación bioquímica y funcional de los antígenos de grupos sanguíneos

Por su naturaleza bioquímica, los antígenos de grupo sanguíneo pueden ser: proteínas (Rh, Kx); glicoproteínas (P, MN, Globosido) o glicolípidos (ABO en eritrocitos). Los antígenos tienen una función en la membrana del eritrocito, algunos más de una función, otros son redundantes y en otros se desconoce su función. Funcionalmente, los grupos sanguíneos se clasifican en enzimas entre las que se encuentran la acetilcolinesterasa que corresponde al sistema Cartwright (Yt), la endotelina 3 convertasa (Sistema Kell), proteínas reguladoras de complemento (Cromer), moléculas de adhesión (Duffy), formadoras de canales y transportadores (Diego); así como moléculas con carbohidratos (ABO), por mencionar algunos ejemplos (Figura 3) (Storry, 2004).



**Figura 3. Clasificación bioquímica y funcional de los grupos sanguíneos.** Se enlistan los diferentes sistemas de grupos sanguíneos de acuerdo a su naturaleza (Modificado de Storry 2004).

### Clasificación de los sistemas de grupos sanguíneos según la Sociedad Internacional de la Transfusión Sanguínea (ISBT)

La Sociedad Internacional de la Transfusión Sanguínea, organismo rector a nivel internacional de la terminología de los grupos sanguíneos, para el último informe (Berlín 2010), reconoció un total de 308 antígenos, 270 de ellos agrupados en 30



sistemas de grupos sanguíneos (Tabla 2) y el resto forman parte de colecciones y series. (Daniels y cols, 2009)

**Tabla 2. Clasificación de los grupos sanguíneos de la ISBT.**

No	Nombre	Símbolo	N° de Ags	Nombre del gen	Cromosoma
001	ABO	ABO	4	ABO	9q34.2
002	MNS	MNS	43	GYPA, GYPB, GYPE	4q31.21
003	P1Pk	P1	1	P1	22q11.2-qter
004	Rh	RH	52	RHD, RHDE	1p36.11, 1p34.2
005	Lutheran	LU	20	LU	19q13.32
006	Kell	KEL	25	KEL	7q34
007	Lewis	LE	6	FUT3	19p13.3
008	Duffy	FY	5	FY	1q23.2
009	Kidd	JK	3	SLC14A1	18q12.3
010	Diego	DI	21	SLC4AE1	17q21.31
011	Yt	YT	2	ACHE	7q22.1
012	Xg	XG	2	XG, MIC2	Xp22.33
013	Scianna	SC	5	ERMAP	1p34.2
014	Dombrock	DO	5	DO	12p12.3
015	Colton	CO	3	AQPI	7p14.3
016	Landsteiner-Wiener	LW	3	LW	19p13.2
017	Chido/Rodgers	CH/GR	9	C4A, C4B	6p21.32
018	H	H	1	FUTI	19q13.33
019	Kx	XK	1	XK	Xp21.1
020	Gerbich	GE	8	GYPE	2q14.3
021	Cromer	CROM	12	DAF	1q32.2
022	Knops	KN	8	CRI	1q32.2
023	Indian	IN	2	CD44	11p13
024	Ok	OK	1	CD147	19p13.3
025	Raph	RAPH	1	CD151	11p15.5
026	John Milton Hagen	JMN	1	SEMA74	15q24.1
027	I	I	1	GCNT2	6p24.2
028	Globosido	GLOB	1	B3GALT3	3q26.1
029	Gill	GIL	1	AQP3	9p13.3
030	RhAG	RHAG	3	RHAG	6p11-21.1

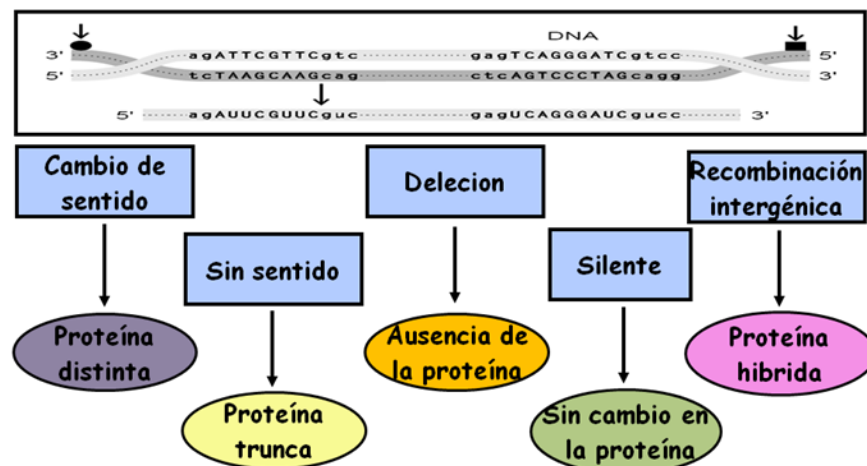
Se reconocen 30 sistemas que contienen desde 1 a más de 50 antígenos con sus respectivos genes y localización cromosómica. Consulta libre en <http://www.blood.co.uk/ibgri>.

### Mecanismos de variabilidad genética.

Los grupos sanguíneos son polimórficos ya que existen mínimo dos variantes alélicas del gen. Los alelos son versiones alternativas de un gen que difieren entre sí por mutaciones en una secuencia nucleotídica original. Para efectos prácticos, se considera como polimorfismo a un alelo que se encuentra con una frecuencia >1% en la población. (Storry & Olsson, 2004; Lewin, 2004) En términos generales, se han identificado los

diversos eventos moleculares que dan lugar a la expresión de los diferentes antígenos eritrocitarios, como son: (Daniels, 2005; Reid, 2003).

- Conversión o recombinación de genes: MNS, Rh, Chido/Rodgers.
- Duplicación de un exón: Gerbich.
- Delección de un gen, exón o nucleótido: ABO, MNS, Rh, Kell, Duffy, Dombrock, Gerbich.
- Inserción de uno o más nucleótidos: Rh, Colton.
- Substitución de un nucleótido (SNP): la mayoría de los grupos sanguíneos: RhC/c, RhE/e, Kell/cellano (K/k), Penny/Rautenberg (Kpa/Kpb), Duffy<sup>a</sup>/Duffy<sup>b</sup> (Fya/Fyb), Diego<sup>a</sup>/Diego<sup>b</sup> (Dia/Dib) (Figura 4)



**Figura 4. Mecanismos de variabilidad genética.** Se ejemplifican algunos de los mecanismos de variabilidad genética que generan los polimorfismos en los grupos sanguíneos.

La mayoría de los polimorfismos de los grupos sanguíneos son el resultado de cambios en un solo nucleótido, que ocasionan un fenotipo distinto, definidos por anticuerpos específicos como los principales antígenos de los sistemas Diego (010) y Duffy (008) (Tabla 3) y otros como Kell, Kidd, Lutheran, etc.

**Tabla 3. Polimorfismo de un solo nucleótido de los grupos sanguíneos Duffy y Diego.**

Símbolo ISBT	Antígeno 1	SNP	Cambio de AA	Antígeno 2
<b>FY</b>	Fy <sup>a</sup>	G125A	Gly42Asp	Fy <sup>b</sup>
<b>DI</b>	Di <sup>a</sup>	C2561T	Leu854Pro	Di <sup>b</sup>

Se observa la posición crítica en la que se produce el cambio entre los nucleótidos y aminoácidos que determinan el fenotipo de los grupos sanguíneos Duffy y Diego.

### Sistema de grupo sanguíneo Duffy

El grupo sanguíneo Duffy (Fy) fue descrito en 1950 por Cutbush y cols., al demostrar la reactividad del suero de un paciente hemofílico politransfundido, cuyo apellido era Duffy. Al primer antígeno descubierto se le llamó Fya. El antígeno Fyb fue encontrado un año más tarde por Ikin y cols. En 1975, se identificó al antígeno Duffy como el receptor de los parásitos *Plasmodium vivax* y *Plasmodium knowlesi*. Este descubrimiento dio explicación a la alta frecuencia del fenotipo Fy(a-b-) en negros del oeste de África, como un mecanismo de resistencia al paludismo.

El gen DARC se ubica en el brazo largo del cromosoma 1, banda 23 sub-banda 2 (1q23.2), posee 2 exones que codifican para la glicoproteína Duffy receptor de quimiocinas, que porta los 5 antígenos del sistema sanguíneo Duffy (Tabla 4), el exón 1 codifica para los primeros 7 aminoácidos de la glicoproteína y el resto de los residuos están codificados en el exón 2.

**Tabla 4. Resumen de la información del gen DARC y sus productos.**

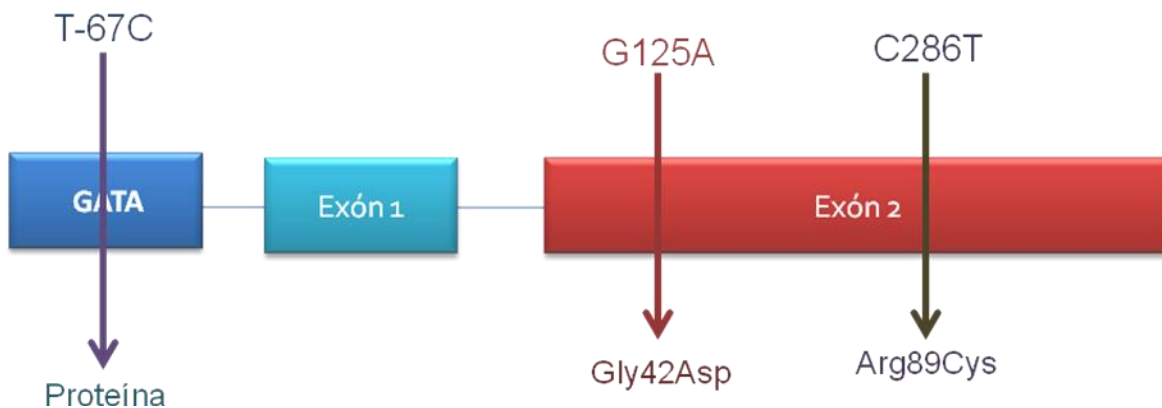
Nombre y número	Símbolo ISBT	Símbolo del gen	Localización cromosomal	Producto del gen
Duffy (008)	FY	DARC	1q23.2	Antígeno Duffy receptor de quimiocinas
Registro de Genbank	Número CD	Tipo de proteína	Número de aminoácidos	Masa aparente (kDa)
NM_002036	CD234	M-7	338	35-45

Los antígenos Fya y Fyb son codificados por el gen bialélico, *FY\*A* y *FY\*B* que dan lugar a los cuatro fenotipos sanguíneos más frecuentes: Fy (a+b-), Fy (a-b+), Fy (a+b+) y Fy(a-b-). (Race y Sanger, 1975) Estos antígenos se consideran también como antígenos menores de histocompatibilidad y queda la posibilidad de su participación en el rechazo del trasplante. (Eder, 2006) En el feto, los antígenos Fy pueden ser detectados a partir de la

7<sup>a</sup> semana de gestación y están bien expresados al nacimiento. Sin embargo, la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad de grupo sanguíneo Duffy no es usual y puede no ser detectada rutinariamente. Esto se debe a la inmunogenicidad moderada de los antígenos Fy. (Marsh & Ehrich, 1975)

El mecanismo principal del fenotipo Fy(a-b-) es resultado de una mutación en la caja GATA-1 del promotor del gen T-67C, en el alelo FY\*B en población de origen negro-africana y en el alelo FY\*A en individuos de Nueva Guinea, lo cual produce la ausencia de la proteína en los eritrocitos. La base molecular de la variación entre los alelos FY\*A y FY\*B es el cambio de una sola base en la posición 125; guanina en FY\*A y adenina en FY\*B (G125A). (Daniels y cols, 2007)

El alelo FY\*X, provoca la detección débil del antígeno Fyb, producido por el cambio C286T que resulta en el cambio de una arginina por una cisteína en el aminoácido 89 de la proteína (Figura 5). (Ansary cols. 2007)



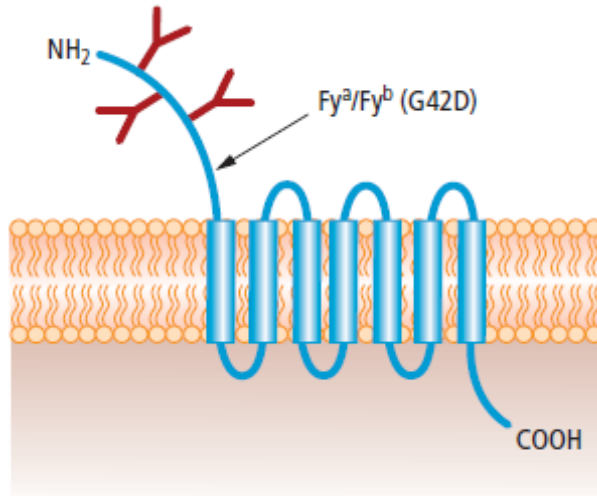
**Figura 5. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) del gen DARC.** Se esquematizan los sitios donde ocurren los cambios que originan los distintos fenotipos del grupo sanguíneo Duffy.

La glicoproteína Duffy, con un número aproximado de  $10$  a  $12 \times 10^3$  copias por célula, (Anstee, 2011) también conocida como antígeno Duffy/receptor de quimiocinas (DARC). Es una proteína politópica compuesta de 336 aminoácidos (transcrito mayor) y 338 (transcrito menor). El transcrito mayor deriva del exón 1 y el exón 2 del gen, el menor es

un producto de la transcripción que inicia en el exón 2, atraviesa la membrana siete veces (Figura 6), tiene su extremo amino extracelular glicosilado y carboxilo terminal citoplásmico, un peso molecular de 36 kDa, pertenece a la superfamilia de proteínas G, receptores que unen diferentes ligandos, especialmente quimiocinas (Denomme, 2004; Daniels, 2007), tales como la interleucina 8 (IL-8), quimiocina del oncogén relacionado con el crecimiento (GRO), quimiocina expresada y secretada por células T normales reguladas o en activación (RANTES), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), interleucina con actividad estimulante del crecimiento de melanoma (MGSA) y la quimiocina de activación y regulación tímica (TARC). (Rot & Horuk, 2009, Iwamoto y cols, 1995)

Su expresión permite a los eritrocitos regular los niveles de quimiocinas intravasculares y con ello, disminuir citocinas proinflamatorias del medio. Se ha demostrado recientemente que el antígeno Duffy desempeña un papel importante en las células endoteliales, facilitando la quimiotaxis. También es el receptor de los parásitos que producen la malaria en humanos *Plasmodium vivax* y *Plasmodium knowlesi* y de algunos virus como el HIV-1. (Rot & Horuk, 2009, Iwamoto y cols, 1995)

La glicoproteína Duffy tiene una distribución eritroide y no eritroide, pues está presente en el endotelio de vénulas capilares y postcapilares, epitelio de los túbulos colectores renales, alvéolos pulmonares y células del cerebro (células de Purkinje). Los africanos con el fenotipo Fy(a-b-) carecen de la glicoproteína en sus hematíes, pero no en otros tejidos, lo cual explica por qué no producen el anti-Fyb cuando son transfundidos con concentrado eritrocitario Fy(a-b+). (Daniels, 2002)



**Figura 6. Esquema estructural de la proteína Duffy.** La glicoproteína Duffy (DARC), consta de un dominio exterior N-terminal glicosilado, siete dominios que atraviesan la membrana, y dominio C-terminal citoplasmático. (Tomado de Daniels, 2002)

### Anticuerpos anti-Duffy

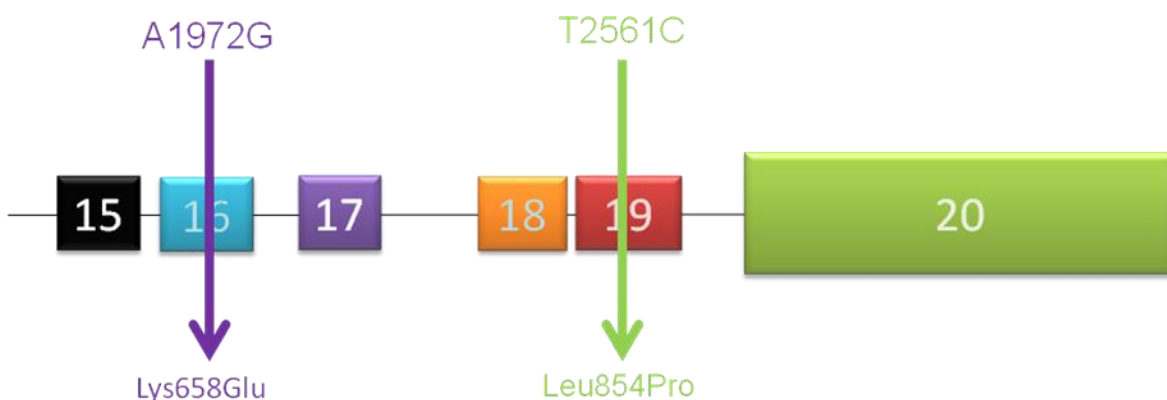
Los anticuerpos anti-Fya y anti-Fyb de presentación natural son extremadamente raros, se adquieren principalmente por transfusión y en menor grado por embarazo. La importancia radica en que estos anticuerpos desaparecen de la circulación aproximadamente a los 12 meses, y pueden ocasionar reacción hemolítica postransfusional inmediata o tardía al no ser detectados en las pruebas de compatibilidad. (Daniels, 2007) Estos anticuerpos generalmente son de clase IgG1, ocasionalmente IgG2, raramente se han detectado IgM, así mismo se pueden detectar con la prueba de la antiglobulina humana.

El anti-Fya del isotipo IgG fija complemento hasta C3 y provoca hemólisis extravascular (Daniels, 2007), se recomienda el uso de sangre antígeno negativo cuando los anticuerpos están presentes. El anti-Fyb, es poco frecuente ya que el antígeno es más común y menos inmunogénico que el Fya. Ambos anticuerpos se han observado en EHRN, que va desde leve a grave. (Lerut y Van Damme, 2007; Daniels y cols. 2002)

## Sistema de grupo sanguíneo Diego

En 1953, Layrisse, Arends y Domínguez, estudiaron el suero de un recién nacido que al nacimiento fue clínica y hematológicamente normal al que no se le hizo la determinación de bilirrubinas, 12 horas después comenzó con ictericia que se fue agravando, el niño murió a los 3 días. Los eritrocitos del niño estaban intensamente sensibilizados con anticuerpos, no se demostraron anticuerpos anti Diego A en el suero de la madre. Los eritrocitos del padre produjeron una fuerte aglutinación cuando se enfrentaron con el suero de la madre. El Anti-Dia descrito se incluyó como uno de seis anticuerpos llamados “Privados”. En 1955 se concluyó que el antígeno Dia era de alta frecuencia en Venezuela y probablemente en Sur America. Diez años más tarde, en 1967, Thompson, Childers y Hatcher identificaron el anticuerpo contra el segundo antígeno, Dib, en dos indígenas mexicanas multíparas, una de ellas con una reacción hemolítica postransfusional y la otra con pruebas cruzadas incompatibles.

El gen SLC4A1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 en la banda 21 sub-banda 31, consta de 20 exones y se extiende a lo largo de 18.43 kpb, codifica para la proteína de la banda 3, de 95-105 kDa (Tabla 5), que porta los antígenos del sistema Diego. Las bases moleculares de los principales alelos de este sistema son Dia y Dib, es una sola variación en la posición 2561, guanina corresponde a Dia y timina a Dib (G2561T) y adenina 1972 por guanina que producen el cambio de Wra y Wrb el otro par de alelos importante del sistema Diego (Figura 7). (Daniels, 2002)



**Figura 7. Polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) del gen SLC4A1.** Se esquematizan los sitios donde ocurren los cambios que originan los principales antígenos del grupo sanguíneo Diego.

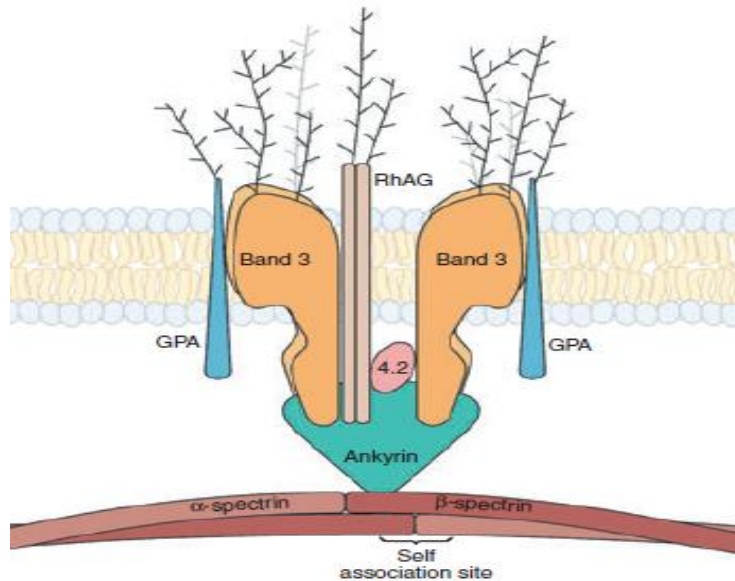
**Tabla 5. Resumen de la información del gen SLC4A1 y sus productos.**

<b>Nombre y número</b>	<b>Símbolo ISBT</b>	<b>Símbolo del gen</b>	<b>Localización cromosomal</b>	<b>Producto del gen</b>
<b>Diego (010)</b>	DI	SLC4A1	17q21.31	Canal de intercambio de aniones asociado a Banda 3
<b>Registro de Genbank</b>	<b>Número CD</b>	<b>Tipo de proteína</b>	<b>Número de aminoácidos</b>	<b>Masa aparente (kDa)</b>
<b>NM_000342</b>	CD233	M-14	911	90

Las mutaciones en este gen pueden dar lugar a la desestabilización de la membrana eritrocitaria en la patogénesis de la ovalocitosis del sur de Asia (banda 3sa), acantocitosis congénita (banda 3ht), acidosis renal tubular distal (banda 3dRTA) y esferocitosis hereditaria. (GENBANK: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02730>)

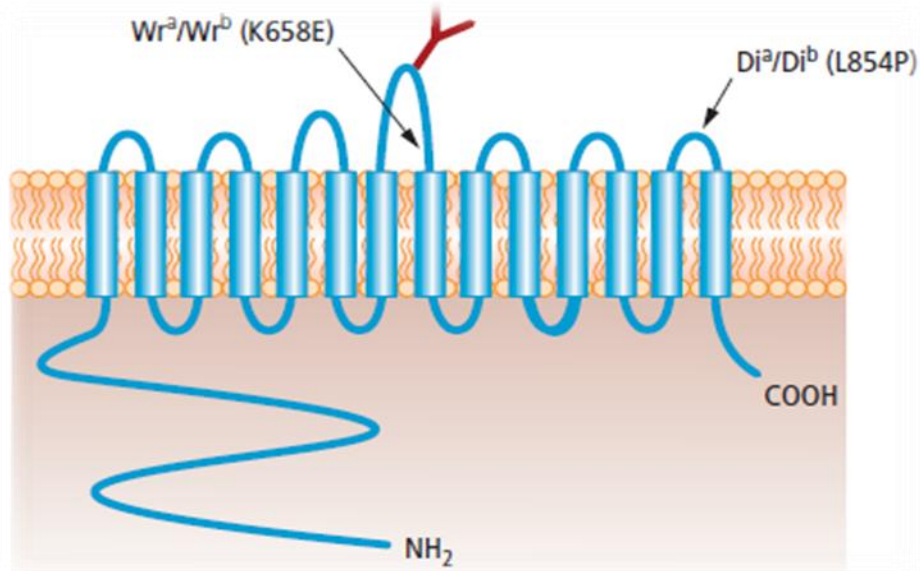
Los 22 antígenos que integran el sistema Diego están distribuidos en la proteína Banda 3. La Banda 3 consta de tres dominios funcionales, su dominio C-terminal porta a la anhidrasa carbónica II (ACII) que media el intercambio rápido 1:1 de los aniones inorgánicos cloruro y bicarbonato a través de la membrana, importante en el transporte de dióxido de carbono, una larga cadena transmembrana que realiza 14 pases y su dominio N-terminal citoplasmático que ofrece sitios de anclaje para las proteínas del citoesqueleto, enzimas glicolíticas y la hemoglobina (Figuras 8 y 9), los 22 antígenos del sistema Diego son resultado de cambios de los aminoácidos en las asas externas de la banda 3, que es la mayor glicoproteína integrante de la membrana de los eritrocitos con un número de copias mayor a un millón. (Daniels, 2002; Daniels 2007)





**Figura 8. Esquema de la Banda 3.** Se observa la interacción de la proteína de Banda 3 con otras proteínas integrales y del citoesqueleto. (Tomado de An y Mohandas 2008).

La Banda 3 juega un papel muy importante en el transporte de gases de la respiración en sangre. En presencia de agua la ACII de los eritrocitos, hidrata al dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en ion bicarbonato y un protón ( $\text{HCO}_3^-$ ;  $\text{H}^+$ ). La Banda 3 es un transportador antipuerto, transfiere el ion bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) hacia afuera de la célula internalizando al ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ). El protón interactúa con la hemoglobina promoviendo la liberación de oxígeno ( $\text{O}_2$ ). Como el bicarbonato es más soluble que el dióxido de carbono, este proceso sustenta el transporte de  $\text{CO}_2$  y la liberación de  $\text{O}_2$  tisular, el proceso inverso ocurre en los pulmones.



**Figura 9. Esquema estructural de la Banda 3.** Se aprecian los principales antígenos del sistema Diego. La proteína tiene los dominios N y C-terminales citoplasmicos, un dominio transmembranal de 14 pases y un N-glicano en la cuarta asa extracelular. (Tomado de Daniels, 2002).

### Anticuerpos anti-Dia y anti-Dib

Los anticuerpos anti-Dia pueden causar reacción hemolítica inmediata y EHRN. Por el contrario, la presencia de los anti-Dib usualmente se asocian con una reacción transfusional mucho menor o tardía (Daniels, 1995; Thompson, 1967). El antígeno Dia se considera como marcador antropológico útil porque casi es exclusivo de poblaciones mongólicas, incluyendo orientales, indígenas suramericanos y la población indígena Chippewa; mientras que el antígeno Dib se encuentra en el 100% de los caucásicos. (Guo-Guang y cols, 2002)

Los anticuerpos anti-Dia y anti-Dib, generalmente son de la clase IgG1 e IgG3 aunque los anti-Dia también pueden ser IgM. Son detectados con la prueba de antiglobulina humana (AGH). Ocasionalmente el anti-Dia puede llegar a fijar complemento y completar la lisis de los eritrocitos; en Brasil, están presentes o se detectan en el 3.6% de los pacientes multitransfundidos. Pueden causar EHRN de moderada a grave. (Daniels, 2007)

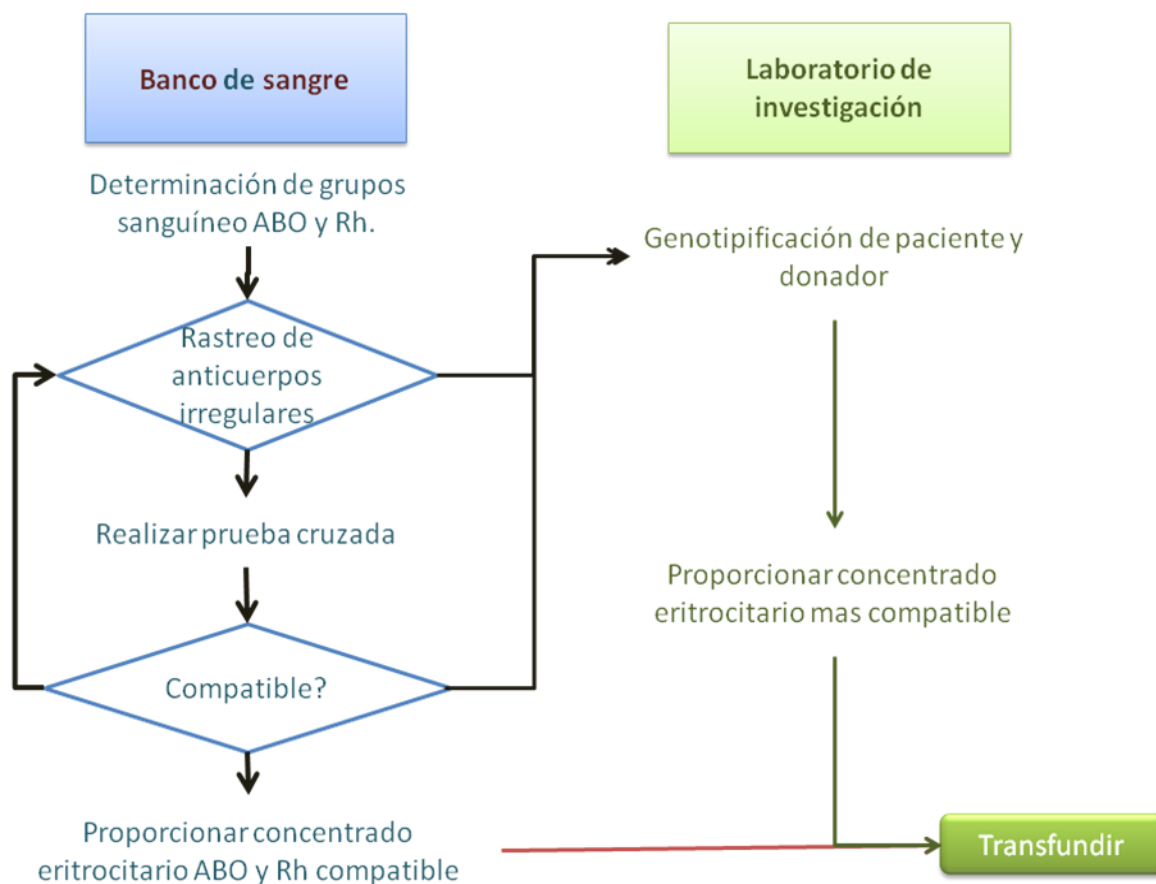
El anti-Dib es un anticuerpo raro pues el antígeno que detecta tiene una alta frecuencia en las poblaciones, pero se ha visto como responsable de EHRN grave. (Daniels, 2007; Daniels y cols, 2002)

### **Aloinmunización por los grupos sanguíneos Duffy y Diego.**

La práctica de la transfusión actual sólo exige unidades ABO / RhD compatibles con el grupo sanguíneo del paciente. Otros antígenos como los del sistema Rh (C, c, E y e), así como los antígenos de los sistemas Duffy y Diego y muchos otros, no se determinan a menos que el paciente desarrolle los aloanticuerpos respectivos debido a transfusiones previas o embarazos (Vengelen-Tyler, 1996). Los aloanticuerpos pueden causar hemólisis de grado variable en los eritrocitos transfundidos, los cuales persisten en el organismo del receptor por semanas, la diferenciación del fenotipo del grupo sanguíneo original del paciente y del donador se vuelve difícil debido a la mezcla de poblaciones celulares sanguíneas, especialmente si no se dispone de muestras pretransfusionales. (Vengelen-Tyler, 1996; Huckenbeck & Rand, 1994) Aunque los eritrocitos del paciente pueden ser separados de los transfundidos por diversos métodos para poder ser clasificados serológicamente, los resultados no han sido satisfactorios (Issitt & Anstee, 1998). Por lo tanto, la genotipificación de los sistemas Rh, Duffy, Diego, entre muchos más, ofrecen una vía alternativa para la determinación del grupo sanguíneo original y con ello la elección de la sangre adecuada (Mallinson y cols. 1995). La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) es útil para este propósito, ya que es una prueba rápida, segura, sensible, reproducible, utiliza poca cantidad de DNA (desde 10 ng), y además permite desde la genotipificación hasta la cuantificación relativa y absoluta.

## Aplicaciones de la genotipificación de los antígenos eritrocitarios en la práctica transfusional.

La genotipificación del DNA fetal se ha utilizado ampliamente durante más de una década y es de probada utilidad en el estudio prenatal de la EHRN. Otras aplicaciones incluyen determinación del genotipo eritrocitario de los pacientes politransfundidos o con anemia hemolítica autoinmune, con la prueba de antiglobulina humana (AGH) positiva, por lo que la serología convencional no es un método fiable para determinar el grupo sanguíneo de los pacientes (Figura 10). (Westhoff, 2006; Hillyer y cols, 2008)



**Figura 10. Diagrama que muestra los pasos a seguir en la elección de un hemoderivado.** Se muestra el escenario con las posibilidades para la incorporación de la genotipificación en la determinación de los grupos sanguíneos en la práctica transfusional.

Además es de utilidad para identificar donantes con grupos sanguíneos raros o para establecer la frecuencia de los polimorfismos de los grupos sanguíneos en una

población determinada, todos ellos son aplicaciones que pueden lograrse con un sistema automatizado de alto rendimiento (Tabla 6).

**Tabla 6. Utilidad de la genotificación de grupos sanguíneos en la práctica transfusional**

---

Tipificación del DNA fetal.

Tipificación del grupo sanguíneo de los donantes para los pacientes aloimmunizados.

Determinar el grupo sanguíneo de pacientes recientemente transfundidos.

Tamizaje de donantes de sangre para determinar los fenotipos raros de grupos sanguíneos.

Determinar la frecuencia de polimorfismos de grupos sanguíneos en una población.

Determinar la cigosidad RHD para los padres de fetos con riesgo de EHRN.

Tipificación de grupos sanguíneos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune.

---

## JUSTIFICACIÓN

La aloinmunización por los grupos sanguíneos Duffy y Diego con sus consecuentes reacciones transfusionales son más frecuentes de lo que se piensa, ya que en la mayoría de los bancos de Sangre no se determinan dichos grupos sanguíneos, a menos que se haya identificado por rastreo de anticuerpos irregulares o que en la prueba cruzada inicial se encuentre algún tipo de incompatibilidad.

La frecuencia del antígeno Dia es muy baja, se puede encontrar en poblaciones muy definidas: indígenas sudamericanos y orientales (Mongolia, China, Japón y Corea), y a través de las migraciones y mezcla étnica se ha incorporado en la población mexicana.

El anticuerpo anti-Fya ocupa el 3er lugar, siguiendo al anti-D, en la producción de reacción hemolítica transfusional en México. Clínicamente es importante ya que es un anticuerpo que desaparece de circulación aproximadamente a los 12 meses, por lo que puede no ser detectado en las pruebas de compatibilidad en pacientes que requieran de una transfusión.

La genotipificación de los grupos sanguíneos Duffy y Diego es importante para evitar la aloinmunización de pacientes politransfundidos y vigilar la incompatibilidad materno-fetal.

Se desconoce la concordancia entre el fenotipo y el genotipo de los principales antígenos de estos dos sistemas en individuos residentes de la Ciudad de México y área conurbada.

### **Objetivo general**

- Determinar los alelos principales de los grupos sanguíneos Duffy y Diego en una muestra de la población residente de la Ciudad de México y área conurbada.

### **Objetivos particulares**

- Establecer la estrategia molecular para la determinar los principales alelos de los sistemas sanguíneos Duffy y Diego así como la frecuencia de los mismos.
- Establecer la concordancia entre la genotipificación y la fenotipificación de dichos sistemas sanguíneos.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño: Estudio transversal, observacional y descriptivo de donadores de sangre consecutivos elegidos al azar. Los participantes del estudio bajo consentimiento informado del protocolo de investigación, fueron identificados y obtenidas las muestras sanguíneas (dos tubos de 2.7 mL con EDTA) por punción venosa de la vena antecubital del antebrazo.

Se efectuó el estudio fenotípico de los antígenos Duffy (a y b), y Diego (a) mediante el método de aglutinación en tubo y sistema en gel DIANA empleando reactivos hemoclasificadores comerciales para Diego a, Duffy a y Duffy b, que contienen una mezcla de anticuerpos monoclonales específicos (Immunocor Gamma, Houston, Texas), a partir de sangre anticoagulada con EDTA (Figura 11). En el método en gel se utiliza una matriz de microesferas de dextranos polimerizados en medio tamponado que actúan como filtro, dichos dextranos se encuentran mezclados con un reactivo que contiene antiglobulina humana. Los microtubos que contienen antiglobulina humana actúan aglutinando los hematíes sensibilizados con anticuerpos IgG o fracciones del complemento. Durante la centrifugación, los aglutinados de hematíes son atrapados según su tamaño en la superficie o a lo largo de la columna de gel. Los hematíes no aglutinados descienden hasta el fondo del microtubo. Se observaron, interpretaron y registraron los resultados en una base de datos para ser analizados posteriormente.





**Figura 11.** Sistema automatizado para la determinación de grupos sanguíneos en gel WaDiana Griffols®.

### **Extracción y purificación de DNA**

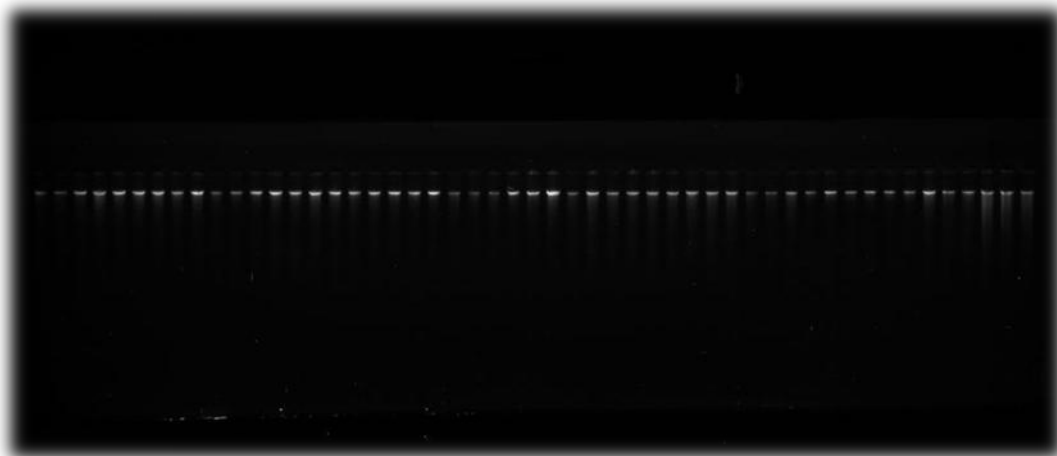
Se extrajo el DNA genómico de los individuos a partir de los leucocitos obtenidos de sangre total anticoagulada con EDTA (tres alícuotas), identificadas numéricamente y almacenadas en los ultracongeladores (-70°C) del Banco de DNA del Servicio de Hematología Perinatal del Instituto Nacional de Perinatología. Se utilizó el kit comercial “High Pure PCR Template Preparation Kit”® (Roche, Mannheim, Alemania), que permite el aislamiento de DNA genómico de doble cadena a partir de diferentes tipos de muestras biológicas. Este método de extracción aporta diversas ventajas frente a las técnicas clásicas: aislamiento de forma rápida, obtención de DNA de buena calidad, libre de inhibidores de DNA polimerasa, sin emplear pasos laboriosos de extracción con solventes orgánicos y con menor manipulación de la muestra. Las células son lisadas mediante una incubación corta con proteinasa K en presencia de un agente caotrópico (guanidina-HCl 6M), urea 10mM, Tris-HCl 10 mM y triton X100 20%, el cual inactiva todas las nucleasas. Los ácidos nucleicos se unen selectivamente a un filtro de fibra de vidrio especial. El DNA unido se purifica con una serie de pasos de lavado y centrifugación que eliminan componentes celulares contaminantes. Se ha incluido un amortiguador de remoción de inhibidores de heparina que permite su aplicación en muestras con hasta 100 U/mL de heparina. Finalmente el DNA se eluye de la columna con 200 mL de una solución salina de baja concentración a pH 8.0 (Tris EDTA) obteniendo DNA genómico de alto peso molecular. Todos los pasos de la extracción se realizan a temperatura ambiente.

### **Pureza e integridad del DNA**

La calidad del DNA extraído se verificó por separación y visualización de los ácidos nucleicos por electroforesis horizontal utilizando geles de agarosa (Life Technologies) al

1.5% con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ), que se intercala en el DNA y emite fluorescencia al iluminarlo con luz UV, (Sambrook y cols, 1989) permite que los fragmentos de DNA migren a lo largo del gel, con una velocidad que depende de su tamaño y carga eléctrica, separándose en bandas características. El corrimiento electroforético se llevó a cabo en la cámara Horizon 58 (Life Technologies, Paisley, Escocia) a 70 volts durante 50 minutos con amortiguador TBE 0.5X [(500 mM de Tris-HCl, (Life Technologies), ácido bórico 60 mM (Sigma) y EDTA- $\text{Na}_2$  83 mM (Life Technologies), pH 8.0. Una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de DNA se mezcló con 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga (50% glicerol (Sigma), 5 mM EDTA- $\text{Na}_2$  (Life Technologies) pH 8.0, azul de bromofenol y xylene cyanol al 0.01% (Sigma)], y se colocó en el pozo correspondiente. Como control negativo se usaron todos los reactivos, pero sin DNA, para determinar una posible fuente de contaminación del material obtenido. Finalmente, los geles fueron fotografiados con el sistema de captura AlphaImager utilizando el software AlphaView versión 1.0.1.10 (Alpha Innotech, California, EUA).

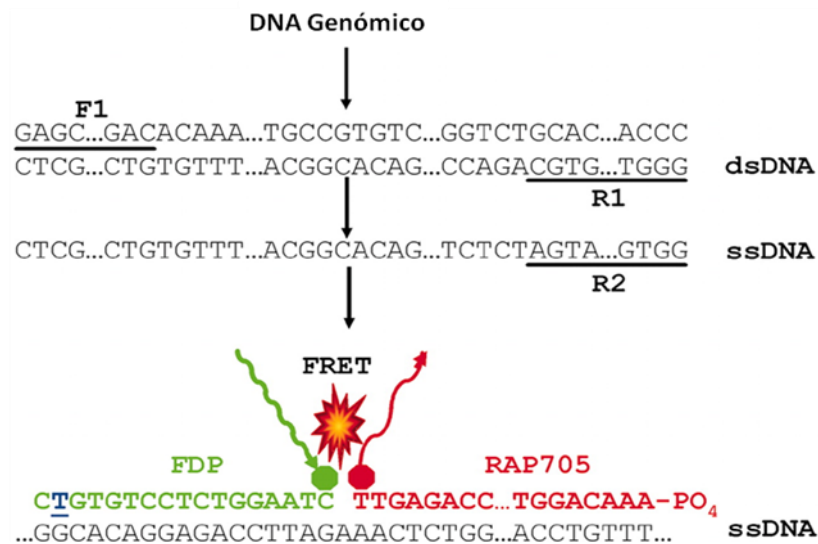
La pureza (relación 260/280nm) y concentración del DNA (260nm) se valoró utilizando un espectrofotómetro ACTGene, EUA. La razón de las lecturas de cada muestra, debe encontrarse en el intervalo 1.8-2.0 para un DNA libre de impurezas, una razón inferior a <1.8 indica contaminación con proteínas y si es >2.0 indica presencia de RNA. (Figura 12) (Sambrook y cols, 1989).



**Figura 12. Gel de agarosa al 1 % donde se muestra la integridad del DNA.**

## PCR en tiempo real

La genotipificación de los alelos se efectuó mediante PCR-TR bajo el formato de detección con sondas de hibridación. Las sondas de hibridación (HybProbe) contienen dos sondas, la F1 con el fluorocromo donador (fluoresceína) que se une por la parte 5', y la sonda F2 que porta el fluorocromo aceptor (rojo 640 NHS éster ó 705), que se une a la parte 3' y bajo el principio de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), el fluorocromo donador es excitado por una fuente de luz del instrumento. Se transfiere la energía al fluorocromo aceptor emitiendo fluorescencia que es medida por el equipo y se detecta en la fase de hibridación (figura 13).



**Figura 13. Sondas de hibridación.** La emisión de fluorescencia por parte del receptor solo se produce al estar cerca del donador.

Se realizaron las amplificaciones por PCR en tiempo real utilizando el LightCycler II TM (Roche Molecular Systems, Somerville, NY.); sistema que consiste en la integración de un fluorómetro y un termociclador que combina ciclos rápidos de PCR, con un monitoreo de la fluorescencia en tiempo real que va aumentando conforme aumenta el número de copias de la secuencia de DNA amplificado, valorándose gráficamente el producto de amplificación y a través de un análisis de temperatura de disociación (T<sub>m</sub>) se podrán diferenciar los alelos (Figura 14).

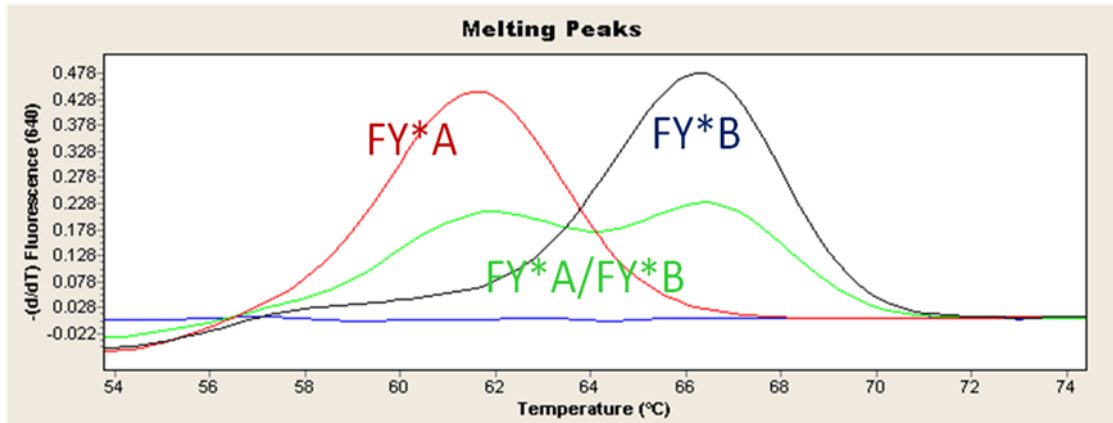


Figura 14. Curvas de disociación (melting). Gráfico representativo de las curvas de disociación melting de la identificación de alelos.

La reacción se lleva a cabo en capilares de borosilicato, el equipo es calentado por aire, y distribuido por un ventilador, permitiendo una alta velocidad de reacción y con ello, la especificidad.

La validación de las técnicas se realizó utilizando muestras con fenotipo Diego y Duffy conocidos, por método de aglutinación en tubo o en gel (Diana gel, Licon). En la tabla 7 se muestran las condiciones de la reacción de PCR en tiempo real utilizadas en las determinaciones

Tabla 7. Condiciones de reacción PCR en tiempo real

		Pre	Amplificación			Curva Melting			[Sonda]	iniciador	[MgCl]
		T°	Desn	Aline	Ext	Desn	Aline	Melt			
DIA/DIB	T°	95	95	53	72	95	45	80	10 mM	10 mM	3 mM
	T'	10 min	10 seg	10 seg	10 seg	20 seg	20 seg	0 seg			
FYA/FYB	T°	95	95	53	72	95	45	80	10 mM	10 mM	3 mM
	T'	10 min	10 seg	10 seg	10 seg	20 seg	20 seg	0 seg			
FYX	T°	95	95	53	72	95	45	80	10 mM	10 mM	3 mM
	T'	10 min	10 seg	10 seg	10 seg	20 seg	20 seg	0 seg			
FYO	T°	95	95	53	72	95	45	80	10 mM	10 mM	3 mM
	T'	10 min	10 seg	10 seg	10 seg	20 seg	20 seg	0 seg			

T°= temperatura en grados Celcius; T' = tiempo

### **PCR alelo específica (PCR-SSP)**

La determinación de los alelos de los grupos en estudio se realizó utilizando un reactivo comercial de GTi DIAGNOSTICS® (Waukesha, USA) Red Cell EZ Type ®. El ensayo se basa en la técnica de la PCR de punto final que permite la amplificación de secuencias blanco definidas dentro del DNA genómico. Después de la amplificación, la muestra contiene la secuencia blanco de DNA en cantidades suficientes para la detección. El término alelo específico se refiere a que la amplificación ocurre sólo si el alelo está presente, aquellas muestras que no lo tengan no producen un producto de PCR.

Este estuche comercial utiliza como control de amplificación el gen de la hormona de crecimiento humano que valida las condiciones de PCR para cada reacción. Las condiciones utilizadas para determinar los alelos Diego y Duffy y se presentan en las tablas 8 y 9 respectivamente.

Tabla 8. Condiciones PCR alelo específica para los alelos Duffy

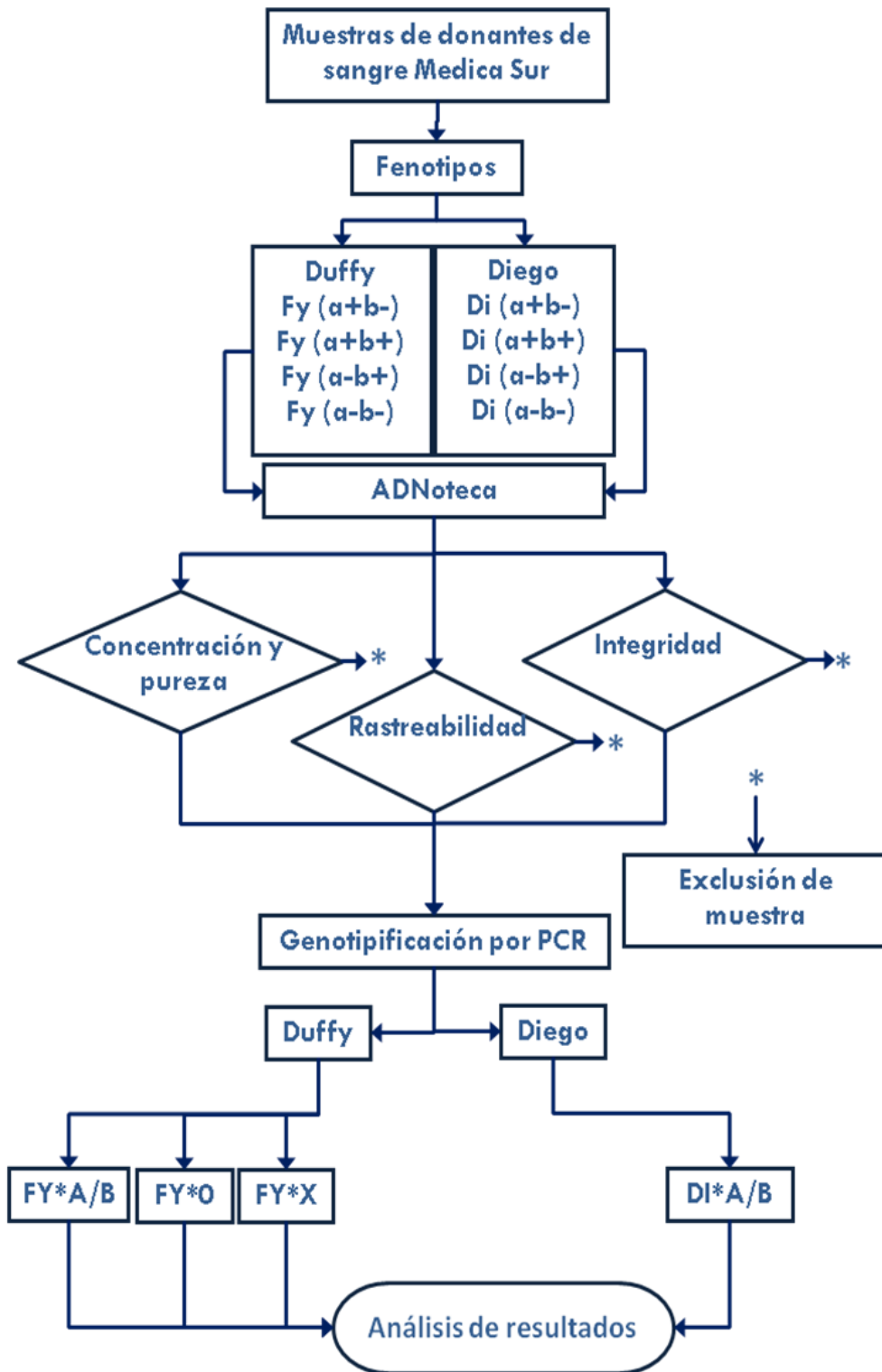
<b>Inicial</b>	<b>5 ciclos</b>	<b>10 ciclos</b>	<b>20 ciclos</b>	<b>Estab 72°C</b>	<b>Fin</b>
94° 2 min	94° 20 seg	94° 20 seg	94° 20 seg	72° 5min	10° mantener
	70° 60 seg	65° 60 seg	61° 50 seg		
		72° 45 seg	72° 45 seg		

Tabla 9. Condiciones de PCR alelo específico para los alelos Diego

<b>Inicial</b>	<b>10 ciclos</b>	<b>20 ciclos</b>	<b>Estab 72°C</b>	<b>Fin</b>
94° 2 min	94° 20 seg	94° 20 seg	72° 5 min	10° mantener
	65° 60 seg	61° 60 seg		
		72° 30 seg		

Después de la amplificación, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando geles precargados E-Gels®, durante la electroforesis las bandas de DNA se identifican con bromuro de etidio. Después fueron visualizados en un analizador de imágenes.

Se determinó la frecuencia fenotípica y alélica de estos sistemas de grupos sanguíneos en la población en estudio, así como si dicha población está en equilibrio genético de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg que establece que bajo ciertas condiciones, tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular. También especifica que esas frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus. En el caso más sencillo, con un locus con dos alelos A y a, con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, predice que la frecuencia genotípica para el homocigoto dominante AA es  $p^2$ , la del heterocigoto Aa es  $2pq$  y la del homocigoto recesivo aa, es  $q^2$ .

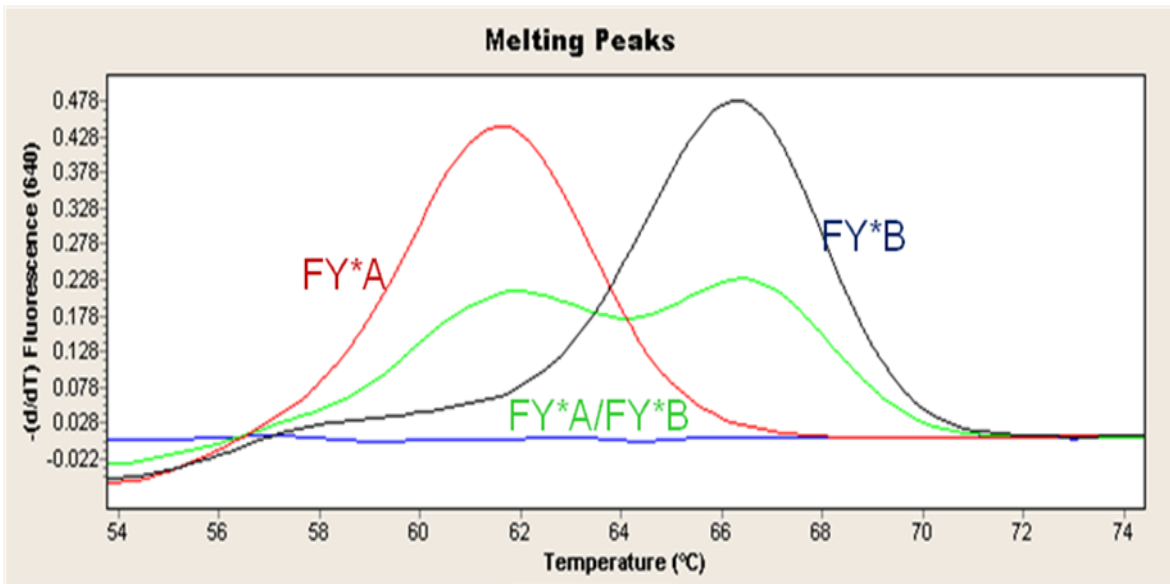


**Figura 15. Diagrama de flujo del procedimiento.** Se identificó el fenotipo, se extrajo el DNA y se realizaron las reacciones de PCR para la identificación de los alelos, mismos que fueron comparados con el fenotipo.

### III. RESULTADOS

La identificación de los alelos se realizó por comparación de las bandas en el gel y siguiendo las instrucciones del fabricante de acuerdo al peso molecular esperado.

En la figura 16 observamos el análisis de las curvas de disociación (melting) para la determinación de los alelos del sistema Duffy donde la diferencia de temperaturas nos define dos picos melting: uno para el alelo FY\*A (color rojo) y otro para el alelo FY\*B (color azul) aquellos individuos homocigotos para cualquiera de estos alelos solo presentaran un pico correspondiente al alelo repetido, mientras que aquellos heterocigotos presentaran un pico doble (color verde) que coincide con los picos homocigotos con menor o igual intensidad de la fluorescencia, a mayor temperatura mayor afinidad de la sonda por el amplicon.

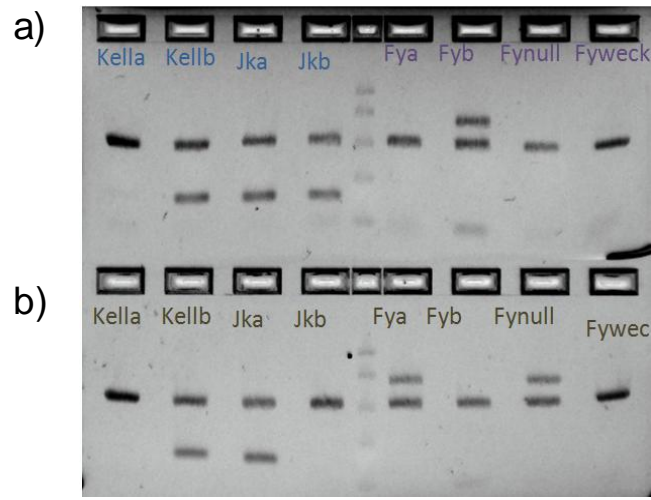


**Figura 16.** Imagen representativa de la identificación de los genotipos FY\*A y FY\*B.

En el caso del PCR-SSP (alelo específico) en el gel que se corre al final de la PCR se observó el patrón de bandeo del marcador de peso molecular (carril central) y cada uno de los pozos contiene la misma muestra de DNA, solo que con diferentes juegos de primer específicos para cada alelo que se va a determinar. Se observó el control de amplificación (hormona de crecimiento humano) que genera un producto de PCR de



434 pares de bases (pb), para los alelos FY\*A, FY\*B y FY\*0 (nulo) se observa un producto de PCR de 720 pb y para el alelo FY\*X se observa un producto de 187 pb. En azul el blanco de reacción (Figura 17).



**Figura 17. Gel de agarosa al 2 % representativo obtenido de las reacciones de PCR alelo específico de Duffy.** En el cuadrante superior derecho se observa la banda de 720 pb para el alelo FY\*B, en el cuadrante inferior derecho, las bandas de los alelos FY\*A y FY\*null también de 720 pb. El control de amplificación de 434 pb se aprecia en todos los carriles de las diferentes reacciones aleloespecíficas realizadas. Exactamente en medio en las partes superior e inferior se observa el marcador de tamaño molecular.

Se estudiaron 403 individuos para el grupo sanguíneo Duffy, la frecuencia fenotípica encontrada para Fya+b-, Fya+b+, Fya-b+ y Fya-b- fue de 36.7, 43.5, 17.1 y 2.7 %, respectivamente, mientras que para los alelos FY\*A, FY\*B, FY\*0 y FY\*X las frecuencias fueron 0.543, 0.419, 0.026 y 0.012, respectivamente (Tabla 10).

La concordancia global entre el genotipo y fenotipo para el sistema Duffy, donde esta fue de 0.959; para los fenotipos Fya+b+ y Fya-b+ fue de 0.971 en ambos casos, Fya+b- 0.912 y para el fenotipo nulo (Fya-b-) fue de 0.546, que fue en el grupo que se encontró la mayoría de discrepancias (Tabla 10).

La fenotipificación y genotipificación del sistema Diego se realizó en 247 sujetos, detectándose los fenotipos Dia+b+ y Di a-b+ en 17.8 y 82.2% respectivamente, no se identificaron individuos con fenotipo Dia+b-. La frecuencia para el alelo DI\*A fue de

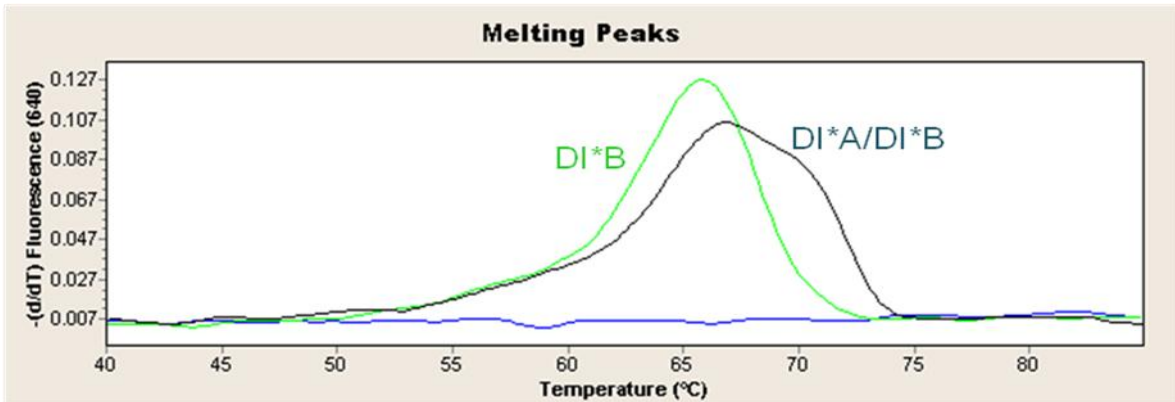
0.085 y para DI\*B de 0.915, no se encontró el alelo DI\*A en forma homocigota en ningún donador. Siendo la concordancia global para este sistema de 0.972 y por fenotipo de 0.909 para Dia+b+ y de 0.990 para Dia-b+ (Tabla 10).

**Tabla 10.** Resultados de la fenotipificación y genotipificación del sistema Duffy

Fenotipo (n 403)	Frecuencia fenotípica (%)	Genotipo	n	Concordancia	
<b>Fy a+b-</b>	148	36.7	FY*A/FY*A	114	<b>0.912</b>
			FY*A/FY*A0	18	
			FY*A/FY*B0	1	
			FY*A/FY*X	2	
			<b>FY*B/FY*B<sup>†</sup></b>	<b>1</b>	
			<b>FY*A/FY*B<sup>†</sup></b>	<b>12</b>	
<b>Fy a+b+</b>	175	43.5	FY*A/FY*B	170	<b>0.971</b>
			<b>FY*B/FY*B<sup>†</sup></b>	<b>3</b>	
			<b>FY*A/FY*A<sup>†</sup></b>	<b>2</b>	
<b>Fy a-b+</b>	69	17.1	FY*B/FY*B	67	<b>0.971</b>
			<b>FY*A/FY*B<sup>†</sup></b>	<b>2</b>	
<b>Fy a-b-</b>	11	2.7	FY*A0/FY*A0	1	<b>0.546</b>
			FY*B0/FY*B0	2	
			FY*B/FY*X	2	
			FY*0/FY*0	1	
			<b>FY*B/FY*B<sup>†</sup></b>	<b>4</b>	
			<b>FY*A/FY*B<sup>†</sup></b>	<b>1</b>	
	<b>FY*A</b>	<b>FY*B</b>	<b>FY*X</b>	<b>FY*0</b>	<b>X<sup>2</sup></b>
<b>Frecuencia alélica</b>	0.543	0.419	0.012	0.026	<b>41.0083</b>

**†No concordante**

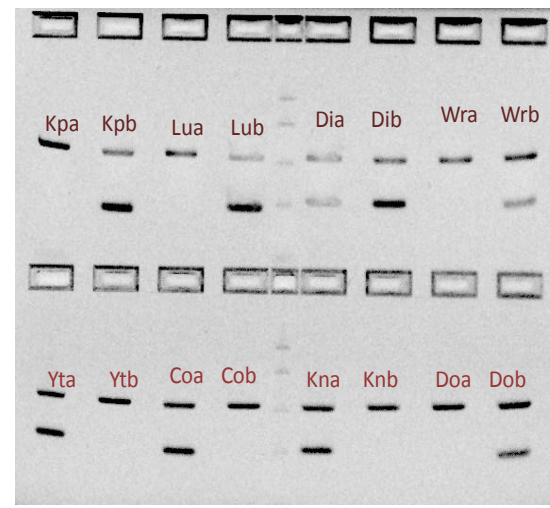
Para el sistema Duffy se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg para un sistema tetralélico con 6 grados de libertad y un error alfa de 0.05, para el cual el valor de X<sup>2</sup> esperado es de 12.592, obteniendo un valor de 41.0083.



**Figura 18.** Imagen representativa de la identificación de los genotipos DI\*A y DI\*B.

La figura 18 muestra el análisis de disociación (melting ) para la determinación del alelo DI\*B (color verde), no se encontró un donador de sangre que fuese homocigoto para el alelo DI\*A por lo cual no se muestra un pico de disociación para este alelo. Se observa el heterocigoto DI\*A/DI\*B (color negro) como un pico levemente ensanchado que nos deja apreciar una doble caída, lo cual nos dice que existen dos temperaturas de disociación o sea los dos alelos, en azul el blanco de reacción.

En el caso de la PCR-SSP observamos en el carril central nuestro marcador de peso molecular y cada pozo del gel con nuestra muestra de DNA y un juego de primers específico para cada alelo a determinar (figura 19). Se observó el patrón de bandeo para los alelos DI\*A y DI\*B (carriles 5 y 6) con un producto de PCR de 207 pb.



**Figura 19.** Gel de agarosa al 2 % representativo obtenido de las PCR alelo específico de Diego. Se observan en el cuadrante superior derecho las bandas para los alelos DI\*A y DI\*B de 207 pb. El control

de amplificación de 434 pb se aprecia en todos los carriles de las diferentes reacciones aleloespecíficas realizadas. Exactamente en medio en las partes superior e inferior se observa el marcador de tamaño molecular.

**Tabla 11.** Resultados de la fenotipificación y genotipificación del sistema Diego

Fenotipo (n 247)	Frecuencia fenotípica (%)		Genotipo	n	Concordancia
<b>Di a+b+</b>	44	17.8	DI*A/DI*B	40	<b>0.909</b>
			DI*B/DI*B†	4	
<b>Di a-b+</b>	203	82.2	DI*B/DI*B	201	<b>0.990</b>
			DI*A/DI*B†	2	
	<b>DI*A</b>	<b>DI*B</b>	<b>X<sup>2</sup></b>		
<b>Frecuencia alélica</b>	0.085	0.915	2.1326		

†No concordante

Para el sistema Diego se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg para un sistema bialélico con 1 grado de libertad y un error alfa de 0.05, el valor de X<sup>2</sup> esperado debería estar por debajo de 3.841, obteniendo el valor de 2.1326.

## IV.DISCUSIÓN

El estudio de los grupos sanguíneos ABO y Rh es de suma importancia en la medicina transfusional, ya que los antígenos de estos sistemas son altamente inmunogénicos, por lo que son de considerar en todas las actividades relacionadas con el empleo terapéutico de la sangre y sus componentes, así mismo existen otros sistemas de grupo sanguíneo que deben ser considerados al momento de transfundir a un paciente para prevenir la aloinmunización. Los sistemas Duffy y Diego poseen antígenos de suma importancia pues se han visto causando reacción postransfusional y enfermedad hemolítica del recién nacido; en el ámbito antropológico, son considerados como marcadores de identidad poblacional o genética.

La genotipificación es una herramienta que complementa a la fenotipificación, en la elección de un producto sanguíneo compatible para el paciente, evitando el riesgo de aloinmunización.

La precisión de la genotipificación evalúa los principales antígenos de los sistemas Duffy y Diego, tiene una concordancia suficiente con la serología como método de referencia.

En general la frecuencia fenotípica obtenida para los grupos sanguíneos y en particular del sistema Duffy, varía de acuerdo con el tipo de población y las condiciones del estudio; como se observa en reportes anteriores: Castilho 2007, estudió 85 pacientes con drepanocitosis en Brasil, Lopes 2009 estudió 497 pacientes enfermos de paludismo en Brasil, Cotorruelo 2009 estudió 275 donadores blancos de la ciudad de Rosario, Argentina, descendientes de Italianos y españoles, Ansart 2007 estudió 119 individuos entre donadores de sangre blancos y pacientes blancos y negros, en Paris, Francia,

Yazbandakhsh 2000 estudió 93 individuos entre donadores y pacientes blancos y negros en Nueva York y Tanaka 354 donadores Japoneses (Tabla 12).

Para el fenotipo Fya+b+ la frecuencia varía desde 4.2% hasta 45.9 % para el fenotipo Fya+b- varia del 23.66% al 74.78%, para el fenotipo Fya-b+ varia del 9.24% al 34.74% y para el Fy nulo varia del 0% al 32.94%, notándose la gran dispersión por las poblaciones en estudio.

Se observa que para el fenotipo Fya+b+ el genotipo dominante es FY\*A/FY\*B en las poblaciones estudiadas. Para el fenotipo Fya+b- el genotipo más común en las distintas poblaciones es el FY\*A/FY\*A. Para el fenotipo Fya-b+ en general se observa que el genotipo FY\*B/FY\*B es el más prevalente, Castilho 2007, reporta para este fenotipo una discreta variación del genotipo FY\*B/FY\*B y FY\*B/FY\*0 debida a la población estudiada que son enfermos con drepanocitosis, la cual se asocia con inmunidad a la malaria. Para el caso del fenotipo Fya-b- el genotipo más visto es FY\*0/FY\*0, mecanismo silente que afecta al alelo FY\*B en población de origen negroafricano y para el alelo FY\*A en personas de origen filipino (Papúa, Nueva Guinea).

En general, el fenotipo Fya-b- es el menos común en las poblaciones estudiadas. La no concordancia para este sistema tiene diferentes explicaciones: primero, por la presencia de los alelos FY\*0 que produce el silenciamiento del gen DARC y por ello, la no expresión de la proteína Duffy y FY\*X que produce una disminución en su capacidad de ser detectado por el anticuerpo; y la no expresión de los alelos debido a otros mecanismos de baja frecuencia no evaluados en este estudio.

**Tabla 12.** Concordancia fenotipo serológico y genotipo para el sistema Duffy

Concordancia fenotipo/genotipo Duffy				
Serológico	Molecular	n	Genotipo	% concordancia
Fya-	FY*A+	4	1 FY*A/FY*0 3 FY*A/FY*B	Fya = 98.1 Fyb= 94.3
Fya+	FY*A-	4	4 FY*B/FY*B	
Fyb-	FY*B+	21	2 FY*B/FY*X 2 FY*B/FY*0	

---

			5 FY*B/FY*B
			12 FY*A/FY*B
Fyb+	FY*B-	2	2 FY*A/FY*A

---

**Tabla 13.** Resultados obtenidos de fenotipo y genotipo por otros autores para el sistema Duffy.

Fenotipo	Genotipo	Castilho 2007 n 85 (%)	Lopes 2009 n 497 (%)	Cotorruelo 2009 n 275 (%)	Ansart 2007 n 119 (%)	Tanaka 2010 n 354 (%)	Yazdanbakhsh 2000 n 93 (%)	El presente estudio n 403 (%)
<b>Fy (a+b+)</b>	FY*A/FY*B	16.47	40.44	38.55	4.20	49.44	20.43	45.90
<b>Sub-total</b>		<b>16.47</b>	<b>40.44</b>	<b>38.55</b>	<b>4.20</b>	<b>49.44</b>	<b>20.43</b>	<b>45.90</b>
<b>Fy (a+b-)</b>	FY*A/FY*A	1.18	27.97	29.45	61.34	28.53	9.67	28.78
	FY*A/FY*X	0	0.20	4.73	8.40	0	0	0.49
	FY*A/FY*0	27.06	7.24	0	5.04	0	13.99	4.71
<b>Sub-total</b>		<b>28.24</b>	<b>35.41</b>	<b>34.18</b>	<b>74.78</b>	<b>28.53</b>	<b>23.66</b>	<b>33.98</b>
<b>Fy (a-b+)</b>	FY*B/FY*B	10.59	16.10	24.36	4.20	21.46	21.51	18.61
	FY*B/FY*X	0	1.61	2.91	0.84	0	0	0.49
	FY*B/FY*0	11.76	6.44	0	4.20	0	4.3	0
<b>Sub-total</b>		<b>22.35</b>	<b>24.15</b>	<b>27.27</b>	<b>9.24</b>	<b>21.46</b>	<b>25.81</b>	<b>19.1</b>
<b>Fy (a-b-)</b>	FY*0/FY*0	32.94	0	0	4.20	0.56	30.1	0.99
	FY*X/FY*X	0	0	0	1.68	0	0	0
	FY*X/FY*0	0	0	0	5.88	0	0	0
<b>Sub-total</b>		<b>32.94</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>11.76</b>	<b>0.56</b>	<b>30.1</b>	<b>0.99</b>



Para el caso del sistema Diego la frecuencia fenotípica observada fue concordante con otros reportes, se observó la elevada frecuencia del alelo DI\*B con su consecuente expresión del antígeno Dib; así como la baja o nula existencia del alelo DI\*A en forma homocigota.

Estudios anteriores arrojaron los siguientes resultados:

Novaretti en el 2010 estudio 4326 donadores de sangre en Brasil obteniendo un 3.6% para Dia+b+ y un 96.4% para Dia-b+, ninguno fue Dia+b-.

Xu en el 2010 en un total de 1053 individuos Chinos encontró un 4.75 para el fenotipo Dia+b+, un 0.09% de Dia+b- y un 95.15% de Dia-b+.

Por otro lado, Tanaka en su estudio del 2011 reporta un 32.6% para Dia+b+, 29.1% de Dia+b- y un 38.29% para Dia-b+ en un estudio que abarcó 457 donadores de sangre japoneses.

En nuestro estudio observamos un 17.8% de Dia+b+ y un 82.2 Dia-b+. no se encontró el fenotipo Dia+b- (Tabla 14).

**Tabla 14.** Resultados obtenidos de genotipo y fenotipo por otros autores para el sistema Diego

Fenotipo	Genotipo	Novaretti 2010 n 4326 (%)	Xu 2010 n 1053 (%)	Tanaka 2011 n 457 (%)	El presente estudio n 243 (%)
<b>Di (a+b+)</b>	DI*A/DI*B	3.6	4.75	32.60	17.8
<b>Di (a+b-)</b>	DI*A/DI*A	0	0.09	29.10	0
<b>Di (a-b+)</b>	DI*B/DI*B	96.4	95.16	38.29	82.2

Se observa que el fenotipo más común en las diferentes poblaciones es el Dia-b+ con el genotipo homocigoto para el alelo DI\*B, seguido del fenotipo Dia+b+ con el genotipo heterocigoto. El fenotipo Dia+b- homocigoto para DI\*A es el menos común.

Por la elevada ocurrencia de la no concordancia entre fenotipo y genotipo es posible que nos encontremos ante variantes no descritas que deberán resolverse mediante técnicas como la secuenciación.

**Tabla 15.** Concordancia fenotipo serológico y genotipo del sistema Diego

Concordancia fenotipo/genotipo Diego				
Serológico	Molecular	n	Genotipo	% concordancia
Dia-	DI*A+	2	2 DI*A/DI*B	Dia = 97.6
Dia+	DI*A-	4	4 DI*B/DI*B	
Dib-	DI*B+	0		Dib= 100
Dib+	DI*B-	0		

**Tabla 16.** Comparación de concordancias con lo reportado en la literatura

Comparación de concordancias sistema Duffy					
	Montpetit 2006 n 618	Polin 2008 n 200	Perreault 2009 n 10555	Tanaka 2010 n 457	El presente estudio
Fya+	99.2%	100%	99.7%	100%	98.1%
Fyb+	97.3%	100%	97.8%	100%	94.3%

Comparación de concordancias sistema Diego			
	Novaretti 2010 n 160	Tanaka 2010 n 457	El presente estudio
Dia+	20.6%	100%	97.6%
Dib+	100%	100%	100%

En comparación con otros trabajos se observa una variación considerable para en caso del Fyb, esto se puede explicar por la presencia de los alelos FY\*X y FY\*0 en nuestra población que no son detectados en el fenotipo serológico, dichos alelos afectan la expresión del alelo FY\*B directamente.

## **V. CONCLUSIONES**

- ❖ La concordancia entre fenotipo y genotipo del sistema Duffy es similar a otras poblaciones estudiadas.
  
- ❖ De acuerdo a los resultados, se observa que para el sistema Duffy la población estudiada es más parecida a los caucásicos que a los individuos de origen negroafricano, por la mayor frecuencia del alelo FY\*A.
  
- ❖ El mecanismo predominante para el fenotipo Duffy nulo en nuestra población, es el filipino (FY\*0 sobre el alelo FY\*A).
  
- ❖ La concordancia entre fenotipo y genotipo del sistema Diego es menor que a otras poblaciones evaluadas, cabe la necesidad de realizar secuenciación para eliminar discrepancias. El antígeno Dia del sistema Diego, se encuentra en muy pocos individuos por lo que se considera un marcador poblacional y peligroso en términos transfusionales.

**HAY QUE PLATICAR CON EL DR. BAPTISTA PARA ESTA DIAPOSITIVA EN EL EXAMEN DE GRADO.**

## Referencias

- An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol* 2008; 141, 367-375.
- Ansart-Pirenne H, Martin-Blanc S, Le Pennec PY, Rouger P, Cartron JP, Tournamille C. FY\*X real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis associated with a complete one-step real-time FY genotyping. *Vox Sang* 2007; 92:142-7.
- Anstee DJ. The functional importance of blood group-active molecules in human red blood cells. *Vox Sang* 2011; 100:140-9.
- Beutler E, Litchman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematologia*. 6<sup>a</sup> edición 2007.
- Bruce L. Mutations in Band 3 and cation leaky red cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2006; 36: 331-336.
- Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, Moretti LJ, Bonini-Domingos CR, Rossit AR, Castilho L, Machado RL. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J* 2007;19:167.
- Cotorruelo C, Biondi C, Racca L, Borrás SG, Racca A. Duffy genotyping facilitates transfusion therapy. *Clin Exp Med* 2009; 9:249-51.
- Cutbush M, Mollison PI, Parkin DM. A new human blood group. *Nature*. 1950; 165:188.
- Daniels G, Castilho L, et al. International Society of Blood Transfusion committee on terminology of red cell surface antigens: Macao report. *Vox sang* 2009; 96: 153-56
- Daniels G, Castilho L, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, Lomas-Francis C, Moulds JM, Moulds JJ, Olsson ML, Overbeeke M, Poole J, Reid ME, Rouger P, Van der Schoot E, Scott M, Sistonen P, Smart E, Storry JR, Tani Y, Yu LC, Wendel S, Westhoff C, Yahalom V & Zelinski T. International Society of Blood Transfusion committee on terminology of red cell surface antigens: Cape Town report. *Vox sang* 2007; 92:250-53

- Daniels G, Poole J, de Silva M, Callaghan T, MacLennan y Smith N. The clinical significance of blood group antibodies. *Transfus Med* 2002; 12: 287-95.
- Daniels G, Reid ME. Blood groups: the past 50 years. *Transfusion*. 2009.
- Daniels G. and Bromilow I. *Essential Guide to Blood Groups*, Blackwell Publishing Ltd; 2007.
- Daniels G. Funcions of cell surface proteins. *Vox Sang* 2007; 93:331-340.
- Daniels G. *Human Blood Groups*, 2nd edition, Blackwell Science Ltd; 2002
- Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl Immunol*. 2005; 143-53
- Daniels GL, Fletcher A, Garratty G, Henry S, Jorgensen J, Judd WJ y cols. ISBT. 2004. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion Committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang*. 87: 304-16.
- Denomme GA. The structure and function of the molecules that carry Human red blood cell and platelet antigens. *Transfus Med Rev* 2004; 18: 203-231.
- Eder AF. Update on HDFN: new information on long-standing controversies. *Immunohematology* 2006; 22:188-95.
- Glaucia Andreia Soares Guelsin, Ana Maria Sell, Lilian Castilho, Viviane Lika Masaki, Fabiano Cavalcante Melo, Margareth Naomi Hashimoto, Tatiana Takahashi Higa, Loide Souza Hirle, and Jeane Eliete Laguila Visentainer. Benefits of Blood Group Genotyping in Multi-Transfused Patients from the South of Brazil. *J Clin Lab Anal* 24 : 311–316 (2010).
- Guo-Guang W, Yu-quiring S, Qiong S, Shi-Zheng J, Tong-Maloo Z. Development of a DNA-based genotyping method for the Diego blood group system. *Inmunoematology*. 2002; 1553-1556.
- H. Ansart-Pirenne, S. Martin-Blanc, P.-Y. Le Pennec, P. Rouger, J.-P. Cartron & C. Tournamille. *FY\*X* real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis associated with a complete one-step real-time *FY* genotyping. *Vox Sang* 2007; 92:142–147.

- Hillyer CD, Shaz BH, Winkler AM, Reid ME. Integrating molecular technologies for red blood cell typing and compatibility testing into Blood Centers and Transfusion Services. *Transfus Med Rev.* 2008; 22:117-132.
- Huckenbeck W, Rand S. Serological findings and efficiency of DNA profiling in transfused patients and their significance for identity and paternity tests. *Int J Legal Med* 1994; 106:178-82.
- Ikin EW, Mourant AE, Pettenkofer HJ, Blumenthal G. Discovery of the expected haemagglutinin anti-Fyb. *Nature.* 1951; 168:1077-8.
- Issitt PD, Anstee DJ. *Applied blood group serology.* 4th ed. Durham, NC: Montgomery Scientific Publications, 1998.
- Iwamoto S, Omi T, Kajii E, Ikemoto S. Genomic organization of the glycoporphin D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue. *Blood* 1995; 85:622-6.
- Izaguirre AR. y de Micheli A. Entorno a la historia de las transfusiones sanguíneas. *Revista de Investigacion clínica* 2002; 54(6): 552-558.
- Junqueira PC, Castilho L. The history of the Diego blood group. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2002; 24(1): 15-23.
- Lerut E, Van Damme B, Noizat-Pirenne F, Emonds MP, Rouger P, Vanrenterghem Y, Pirenne J, Ansart-Pirenne H. Duffy and Kidd blood group antigens: minor histocompatibility antigens involved in renal allograft rejection? *Transfusion.* 2007; 47:28-40.
- Lewin B, 2004, *Genes VIII*, Pearson Prentice Hall, Pearson Education, Inc.
- Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Br J Haematol* 1995;90:823-9.
- Marsh WL, Ehrich CC. The Duffy blood group system: a review of recent developments. *Infusionsther Klin Ernahr* 1975;2:280-9.
- Mitsunobu Tanaka, Junko Takahahi, Fumiya Hirayama, Yoshihiko Tani. High-resolution melting analysis for genotyping Duffy, Kidd and Diego blood group antigens. *Legal Medicine* 2011; 13:1–6.

- Mohandas N y Narla A 2005. Blood Group antigens in health and disease. *Curr Op in Hematol*, 12:135-40.
- Montpetit A, Phillips MS, Mongrain I, Lemieux R, and St-Louis M. High-throughput molecular profiling of blood donors for minor red blood cell and platelet antigens. *Transfusion* 2006; 46:841-848.
- Novaretti MCZ, Ruiz AS, Dorlhiac-Llacer PE y Chamone DAF. Application of real-time PCR and melting curve analysis in rapid Diego blood group genotyping. *Immunohematology*. Vol. 26 (2):66-70. 2010.
- Perreault J, Lavoie J, Painchaud P, Côté M, Constanzo-Yanez J, Côté R, Delage G, Gendron F, Dubuc S, Caron B, Lemieux R & St-Louis M. Set-up and routine use of a database of 10 555 genotyped blood donors to facilitate the screening of compatible blood components for alloimmunized patients. *Vox Sang* 2009; 97:61–68
- Race RR & Sanger R. *Los grupos sanguíneos humanos* 2ª. Edición. 1975
- Reid ME y Mohadas N. 2004. Red Blood Cell Blood Group Antigens: Structure and Function. *Sem Hematol* 41(2):93-117.
- Reid ME. 2003. Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. *Transfusion*;43:1748-57.
- Rot A, Horuk R. Chapter 9 the duffy antigen receptor for chemokines. *Methods Enzymol* 2009;461:191-206.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989 Quantitation of DNA and RNA. En *Molecular Cloning, Laboratory Manual*, 2a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA, pp5-7.
- Smith CA & Word EJ. *Biología molecular y Biotecnología* 1998. ED. AWL de México.
- Storry JR & Olsson ML. Genetic basis of blood group diversity. *Br J Haematol* 2004; 126: 759-771.
- Storry JR Clasificación bioquímica y funcional de los grupos sanguíneos. *Immunohematology*. 2004; 20:206-16v

- Storry JR y Olsson ML. Genetics basis of blood group diversity. *Br J Haematol* 2004; 126:759-71.
- Tanner MJA. Band 3 anion exchanger and its involvement in erythrocyte and kidney disorders. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 133-139.
- Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/Fyb blood group polymorphism. *Hum Genet* 1995; 95:407-10.
- Vengelen-Tyler V, ed. Technical manual. 12th ed. Bethesda: AABB 1996.
- Westhoff CM and Reid ME. Review: the Kell, Duffy, and Kidd blood group systems. *Immunohematology*. 2004; 20:37-49.
- Westhoff CM. Molecular testing for transfusion medicine. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(6):471-475
- Xu XG, He J, He YM, Tao SD, Ying YL, Zhu FM, Lv HJ y Yan LX. Distribution of Diego blood group alleles and identification of four novel mutations on exon 19 of SLC4A1 gene in the Chinese Han population by polymerase chain reaction sequence-based typing. *Vox Sang* 2010, pp 1-5.
- Polin H, Danzer M, Pröll J, Hofer K, Heilinger U, Zopf A & Gabriel C. Introduction of a real-time based blood group genotyping approach. *Vox Sang* (2008) 95, 125–130.
- <http://www.blood.co.uk/ibgrl>.
- <http://www.uniprot.org/uniprot/P02730>
- <http://www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetik/applets/kitest.htm>