

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**



Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Tipificación serológica y molecular de fenotipos del sistema Rh-Hr en donadores de sangre Rh negativos en Bancos de Sangre de Tijuana, B.C.”**

**México.**

**TESIS**

Que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias de la Salud

PRESENTA:

**QFB Keyla Lyzeth Armenta Rojas**

DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. Mirna del Carmen Brito Perea**

CO-DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. Bertha Landeros Sánchez**

Tijuana, B.C.

Agosto, 2018

Tijuana, B. C., 19 de Junio de 2018

DR. PAUL ADOLFO TABOADA GONZÁLEZ  
COORDINADOR DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA  
P R E S E N T E :

A través de este medio, me dirijo a usted para informarle que la primera etapa (correspondiente a la escritura del documento de tesis) del proceso de obtención de grado de la estudiante de Maestría en Ciencias de la Salud, Q.F.B. Keyla Lyzeth Armenta Rojas, ha concluido.

El documento titulado: "Tipificación serológica y molecular de fenotipos del sistema Rh-Hr en donadores de sangre Rh negativos en Bancos de Sangre de Tijuana, B.C", ha sido revisado por mi persona en calidad de director de tesis, y cumple con los requisitos normativos para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Salud dentro del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería.

Por tal motivo, y en cumplimiento de las normas operativas del programa, me permito sugerirle al siguiente Jurado de Tesis:


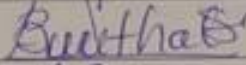
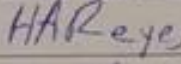
Dra Mirna del Carmen Brito Perea.  
Presidente

Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala  
Secretario

Dra. Bertha Landeros Sánchez  
Sinodal

Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes  
Sinodal

Dr. Esteban Hernández Guevara  
Suplente

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

Esperando una respuesta favorable, quedo de Usted.

Atentamente

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Mirna del Carmen Brito Perea  
Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Q.F.B. Keyla Lyzeth Armenta Rojas  
Alumno

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Bertha Landeros Sánchez  
Co-Directora de Tesis

## **DEDICATORIA**

A Juan José, por estar siempre, hasta el final. Por cuidar de Kenny con amor en las largas tardes de ausencia, por creer en mi y apoyarme. No tengo como agradecerte.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, quien da la vida y la sabiduría.

A mi hija, Kenny, por ser mi razón de ser y lo que me impulsa a superarme, todo es por ti, mi amor.

A mis padres, Efraín y Rebeca, por estar siempre a mi lado, aconsejarme y apoyarme siempre. Por ser los mejores abuelos para mi hija y el mejor ejemplo.

A mi hermano, Efraín, por convencerme de continuar con mis estudios, por ser mi compañero de maestría, por auxiliarme cada vez que tenía un problema informático, por acompañarme cada fin de semana, te quiero Fatty.

A la Dra. Mirna del Carmen Brito Perea, mi directora de tesis, quien me aceptó como su alumna y me apoyó para finalizar este gran proyecto, por su paciencia y sus regaños, por creer en mi y retarme.

A la Dra. Bertha Landeros Sánchez, por cobijarme en su laboratorio, por las pláticas, las risas, los regaños y los consejos, mil gracias.

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de UABC por el apoyo tanto económico como académico en cada etapa de este proyecto, en especial al Dr. Luis Enrique Palafox Maestre por su disposición.

Al Banco de Sangre del IMSS (clínica 7) por abrirme sus puertas una vez más y brindarme todo el apoyo, a la Dra. Angélica Ortiz y al equipo que ahí conocí, Diana, Celina, Gady, Eder, Eliazib, Gracias.

Al Instituto Nacional de Perinatología, por abrirme sus puertas y permitirme enriquecer este proyecto, al Dr. Héctor Baptista, Dra. Fanny Rosenfeld, en especial al Dr. Higinio Estrada y Química Rocío Trueba, quienes estuvieron siempre al pendiente de la alumna foránea, compartieron sus conocimientos y experiencias conmigo, mil gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

## Contenido

Contenido .....	5
Índice de Abreviaturas .....	7
Índice de Figuras.....	8
Índice de cuadros .....	9
RESUMEN .....	10
I. INTRODUCCIÓN .....	11
II. ANTECEDENTES .....	12
III. JUSTIFICACIÓN.....	14
IV. GENERALIDADES .....	16
4.1 Grupo sanguíneo .....	16
4.2 Antígenos de grupo sanguíneo.....	17
4.3 Genes RH. ....	17
4.4 Variantes de D .....	19
4.4.1 Variante D débil.....	19
4.4.2 D parcial.....	19
4.4.3 Del .....	19
4.5 RHD negativo.....	20
4.6 Pruebas tradicionales de clasificación.....	20
4.7 Pruebas moleculares .....	22
V. OBJETIVO GENERAL.....	23
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	23
6.1 METODOLOGÍA.....	23
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.2.1 Recolección de muestras de paquetes globulares.....	25
6.2.2 Fenotipificación por aglutinación en tubo. ....	25
6.2.3 Extracción de ADN.....	26
6.2.4 Evaluación de la presencia e integridad del ADN.....	26
6.2.5 Cuantificación del ADN.....	26
6.2.6 PCR .....	26
6.2.7 Digestión con enzimas de restricción (RFLP).....	27

VII. RESULTADOS .....	27
7.1 Fenotipificación por aglutinación en tubo. ....	27
7.2 Evaluación de la presencia e integridad del ADN.....	32
7.3 Cuantificación del ADN.....	33
7.4 PCR y digestión con EcoRV .....	33
7.5 Controles. ....	38
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	39
IX. CONCLUSIONES .....	41
X. BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXOS. ....	45

## Índice de Abreviaturas

®: Marca Registrada

°C: Grados Celsius

µL: Micro litros

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

FCQI: Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

H.G.O. y U.M.F. No. 7: Hospital General Obstétrico y Unidad de Medicina Familiar  
Número 7.

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

Kb: Kilobase

mL: Mililitro

mM: mili molar

mm: milimetro

ng/µL: nano gramos por micro litro

nm: nano metro

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pH: potencial de hidrógeno

RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica

rpm: Revoluciones por minuto

seg: segundos

TBE: Tris-Borato-EDTA

V: voltios

## **Índice de Figuras**

**Figura 1.** Representación de algunos antígenos anclados a proteínas de membrana del eritrocito.

**Figura 2.** Orientación de los genes RHD y RHCE enfrentados en su posición 3'

**Figura 3.** Mecanismo de delección del gen RHD y formación de la caja Rh híbrida.

**Figura 4.** Cambios en los aminoácidos de la proteína Rh

**Figura 5.** Gráfica de frecuencia de antígenos eritrocitarios

**Figura 6.** Gráfica de porcentajes de detección de antígenos eritrocitarios

**Figura 7.** Gráfica de frecuencia de fenotipos eritrocitarios Rh-Hr

**Figura 8.** Gráfica de porcentajes de fenotipos eritrocitarios Rh-Hr

**Figura 9.-** Gráfica comparativa de porcentajes de prevalencia de fenotipos Rh eritrocitarios

**Figura 10.** Fotografía del gel de evaluación de la presencia e integridad del ADN

**Figura 11.** PCR y digestión de las muestras 1 a la 5

**Figura 12.** PCR y digestión de las muestras 6 a la 11

**Figura 13.** PCR y digestión de las muestras 12 a la 16

**Figura 14.** PCR y digestión de las muestras 18 a la 24

**Figura 15.** PCR y digestión de las muestras 25 a la 31

**Figura 16.** PCR y digestión de las muestras 32 a la 38

**Figura 17.** PCR y digestión de las muestras 39 a la 45

**Figura 18.** PCR y digestión de las muestras 46 a la 52

**Figura 19.** PCR y digestión de las muestras 53 a la 59

**Figura 20.** ADN control

## **Índice de cuadros**

**Cuadro 1.** Distribución de fenotipo ccdee

**Cuadro 2.** Distribución de fenotipo Ccdee

**Cuadro 3.** Distribución de fenotipo ccdEe

**Cuadro 4.** Distribución de fenotipo CcdEe

**Cuadro 5.** Frecuencia de antígenos eritrocitarios detectados por aglutinación en tubo.

**Cuadro 6.** Frecuencia de fenotipos de antígenos eritrocitarios.

**Cuadro 7.** Comparación de porcentajes de prevalencia de fenotipos Rh eritrocitarios

## RESUMEN

### Introducción

Los antígenos de los grupos sanguíneos son estructuras químicas (carbohidratos unidos a lípidos o lipoproteínas y proteínas) polimórficas hereditarias, expuestas en la superficie de la membrana eritrocitaria, así como en otros tejidos y líquidos del organismo. (Reid, 2004)

Los antígenos de los sistemas Rh y ABO, son de importancia central en el campo de la inmunohematología clínica. Su identificación es obligada en toda actividad relacionada con el empleo terapéutico de sangre y sus componentes. Los seres humanos se pueden clasificar serológicamente como Rh positivo o Rh negativo, por medio de la presencia o ausencia de la reacción de aglutinación que se observa cuando una solución de eritrocitos se enfrenta con anticuerpos anti-D policlonales, monoclonales o mezcla de ellos. (Rosenfeld, 2009 citando a Mollison, 1993). El método clásico para determinar antígenos y anticuerpos de los grupos sanguíneos es la hemaglutinación, sin embargo presenta algunas limitaciones, algunas de las cuales pueden ser eliminadas con pruebas basadas en ADN. En plataformas de alto rendimiento proveen un medio para analizar cantidades grandes de donadores, abriendo la puerta para cambiar la manera en la que la sangre es provista a los pacientes y para prevenir la isoimmunización. (Reid, 2010).

**Objetivo general.**-Tipificar fenotipos eritrocitarios del Sistema RhD de donadores Rh negativos en Bancos de Sangre de Tijuana, B.C., utilizando un panel de células de referencia y mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para proponer la tipificación de las variantes del Sistema Rh-Hr como una alternativa para minimizar las reacciones postransfusionales. **Metodología.**-Se desarrolló un diseño de estudio transversal, prospectivo, descriptivo, en el Banco de Sangre del H.G.O. y U.M.F. No. 7 del IMSS en Tijuana, B.C. de enero a septiembre de 2016, utilizando como criterio de inclusión paquetes globulares serotipificados por el banco de sangre como RHD negativos y como criterio de exclusión paquetes globulares serotipificados por el banco de sangre como RHD positivos, se realizó la detección de los antígenos D, C, c, E y e en las muestras seleccionadas, se extrajo ADN utilizando un kit comercial para formar un banco de ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad del ADN, se cuantificó el

ADN de cada muestra por absorbancia, se realizó una digestión con enzimas de restricción y finalmente se compararon los patrones de bandas con los controles previamente establecidos. **Resultados.**-Se utilizaron 57 muestras de sangre de donadores RhD negativos, el fenotipo del sistema Rh con mayor prevalencia en donadores RhD negativos es el **ccdee** con un 76.27%, el 3.5% de las muestras analizadas fueron identificadas como heterocigotas. **Conclusiones.**-Las muestras identificadas como heterocigotas y los diferentes fenotipos de los genes RHD y RHCE presentes, justifica la tipificación sistemática en los bancos de sangre con la finalidad de evitar reacciones postransfusionales asociados a problemas de aloinmunización por incompatibilidad antígeno específica.

## I. INTRODUCCIÓN

Los antígenos de los grupos sanguíneos son estructuras químicas (carbohidratos unidos a lípidos o lipoproteínas y proteínas) polimórficas hereditarias, expuestas en la superficie de la membrana eritrocitaria, así como en otros tejidos y líquidos del organismo. (Reid, 2004)

Los antígenos de los sistemas Rh y ABO, son de importancia central en el campo de la inmunohematología clínica. Su identificación es obligada en toda actividad relacionada con el empleo terapéutico de sangre y sus componentes.

Los seres humanos se pueden clasificar serológicamente como Rh positivo o Rh negativo, por medio de la presencia o ausencia de la reacción de aglutinación que se observa cuando una solución de eritrocitos se enfrenta con anticuerpos anti-D policlonales, monoclonales o mezcla de ellos. (Rosenfeld, 2009 citando a Mollison, 1993)

El método clásico para determinar antígenos y anticuerpos de los grupos sanguíneos es la hemoaglutinación, sin embargo presenta algunas limitaciones, algunas de las cuales pueden ser eliminadas con pruebas basadas en ADN. En plataformas de alto rendimiento proveen un medio para analizar cantidades grandes de donadores, abriendo la puerta para cambiar la manera en la que la sangre es provista a los pacientes y para prevenir la isoimmunización. (Reid, 2010).

Las pruebas moleculares pueden utilizarse junto con el estudio serológico y apoyar al diagnóstico de problemas inmunohematológicos. La reacción falsa positiva como RhD en sujetos Rh negativo, es una causa común de isoimmunización relacionada a la transfusión. Esto se debe a que diversas variantes del gen RhCE transportan secuencias de aminoácidos, específicas del RhD y provocan reacción de aglutinación, especialmente con el uso de reactivos anti-D de origen monoclonal. (Baptista, 2004)

## **II. ANTECEDENTES**

Fue Karl Landsteiner quién descubrió las diferencias de la sangre entre grupos de personas y con su teoría sobre la especificidad de las reacciones serológicas (1900) dio inicio a la era inmunológica de la historia de la transfusión sanguínea. El descubrimiento del grupo sanguíneo ABO revolucionó la práctica de la transfusión puesto que ya con este hallazgo era posible seleccionar los donantes mediante pruebas pretransfusionales in vitro. El avance en la tecnología permitió el almacenamiento seguro de sangre y dio lugar a la formación del primer banco de sangre en Estados Unidos en el Cook County Hospital de Chicago en 1937. (Grispan, 1983)

En 1939 una mujer que había dado a luz un producto sin vida necesitaba una transfusión sanguínea. El sistema ABO había sido descubierto cuarenta años atrás y la importancia de la compatibilidad en ese sistema estaba bien establecida. Sin embargo, aunque la mujer fue trasfundida con sangre compatible proveniente de su esposo, presentó una reacción adversa a la transfusión. En el suero de ella se encontraron anticuerpos que aglutinaban los eritrocitos de su esposo; durante el embarazo, la madre había estado expuesta a un antígeno en los eritrocitos del feto que tenía origen paterno, su sistema inmunológico atacó este antígeno y la destrucción de los eritrocitos del feto provocó su muerte. La madre tuvo un segundo contacto con el antígeno paterno cuando recibió la transfusión, esto llevó al descubrimiento del sistema sanguíneo Rh. (Dean, 2005)

En 1940 Landsteiner y Wiener descubrieron el sistema Rh al inyectar eritrocitos del mono *Macacus rhesus* en conejos. El suero de conejo aglutinaba a los hematíes del mono y al 85% de los glóbulos rojos humanos en los que fue probado. Por esta razón se le denominó al nuevo sistema Rh, de Rhesus. Después se descubrieron los otros 4 antígenos principales: C, c, E y e. (Race y Sanger, 1975).

Fisher y Race propusieron tres pares de antígenos (Dd, Cc, Ee) como un sistema de antígenos heredados, pero solo el "D" se expresa como RhD+, su ausencia y no la presencia de "d" (el cual nunca se ha comprobado) indica RhD-.

Este antígeno, que tiene distribución diferente según la raza, es parte esencial de la membrana del eritrocito, las proteínas codificadas por RhDy RhCE son integrales, transmembranales y, a diferencia de otras moléculas de superficie, no son glucosiladas. (Lambertino Et al. 2014)

En 1943, Fisher y Race propusieron la existencia de tres loci o genes separados pero estrechamente ligados en haplotipos en el mismo cromosoma y heredados en grupos de tres. El haplotipo más heredado es CDe y cde, para los sujetos con Rh positivo y negativo, respectivamente. En 1951, Wiener propuso la existencia de un solo gen complejo, con alelos que resultan en varios antígenos del Rh.

En 1986, Tippet emitió la teoría sobre la existencia de dos genes estrechamente relacionados: RHD y RHCE. En 1990, Colin y colaboradores secuenciaron los dos genes del Rh, RhD y RHCE, explicando el polimorfismo Rh positivo/Rh negativo. (Baptista-González, 2005).

El sistema RH (Rhesus) es un grupo sanguíneo altamente complejo, la serología básica de este sistema ha sido ampliamente descifrada siguiendo análisis bioquímicos y moleculares que revelaron la estructura primaria de los genes, proteínas y los principales polimorfismos. Este sistema fue descubierto hace más de 65 años por su importancia en las incompatibilidades fetal-maternas responsables de la enfermedad hemolítica del recién nacido. Actualmente es el

grupo sanguíneo más inmunogénico y polimórfico del ser humano con más de 45 antígenos serotipificados. (Le Van Kim et al, 2005).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El grupo Rh es uno de los grupos sanguíneos más complejos en el ser humano, desde su descubrimiento, hace 60 años, se ha convertido en el segundo grupo sanguíneo en importancia después del sistema ABO en el campo de la medicina transfusional y se considera de suma importancia en la obstetricia, siendo la incompatibilidad la principal causa de la anemia hemolítica del recién nacido.

La negatividad Rh era un rasgo propio de la raza blanca, cuya incidencia actual es de 15% y en algunas poblaciones, como los vascos, alcanza 35%. Milenios atrás, las razas diferentes a la blanca, probablemente en su totalidad, eran Rh positivos. Hoy en día cerca de 8% de los afroamericanos y entre 2 a 4% de los Indo euroasiáticos son negativos para el antígeno Rh.

El laboratorio de referencia de inmunohematología que depende solo de la serología está limitado en su capacidad de resolver incompatibilidades complejas asociadas a la transfusión. Cuando es aplicado al donador y al receptor de la transfusión el análisis basado en ADN provee información importante que las técnicas de serología por si solas no pueden brindar. Además de un gen alterado o disfuncional heredado, los análisis moleculares aunados a la hemaglutinación pueden incrementar la seguridad de la transfusión sanguínea. (Reid, 2011)

Cuando un paciente recibe una transfusión, la presencia de eritrocitos del donador en la sangre periférica del receptor hace que la fenotipificación de los eritrocitos sea poco confiable y representa un problema mayor para el laboratorio de referencia. La práctica común de suponer el tipo de antígeno del paciente basado en la fuerza de la aglutinación, el número de componentes eritrocitarios transfundidos, el tiempo transcurrido desde la transfusión, el volumen sanguíneo estimado del paciente y la prevalencia del antígeno en cuestión es en muchas ocasiones poco sensible. Para

superar este problema pueden ser utilizados ensayos basados en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando el ADN proveniente de leucocitos, exudado bucal o incluso de sedimento urinario y de esta manera predecir el fenotipo específico del sistema RhD que posee el paciente.

Los métodos basados en análisis del material genético son aplicables a la medicina transfusional debido a que los genes que codifican los grupos sanguíneos y los polimorfismos asociados a los antígenos son conocidos. La tipificación de los polimorfismos de un solo nucleótido permite la evaluación de los antígenos de los grupos sanguíneos en circunstancias en las que no es posible hacerlo con métodos basados en detección de anticuerpos.

La determinación de los grupos sanguíneos es fundamental en la práctica clínica debido a la inherente relación que tiene con la medicina transfusional y el trasplante de órganos. En México, la cantidad de donaciones de sangre en 2014 aumentó de 15.66 por cada 1000 individuos a 17.33 por cada 1000 individuos. (Canizalez-Román, 2018).

En pacientes que han recibido numerosas transfusiones, la presencia de las células sanguíneas del donador hace la tipificación clásica inespecífica. En pacientes con anemia hemolítica autoinmune o con eritrocitos cubiertos con inmunoglobulina en ausencia de hemólisis, la presencia de IgG frecuentemente invalida los resultados de la tipificación en la prueba indirecta; los métodos de análisis molecular eliminan estas limitaciones.

La aplicación de la genotipificación molecular a la medicina transfusional tiene el potencial de cambiar dramáticamente las pruebas realizadas en un banco de sangre, esto puede mejorar el cuidado del paciente y los resultados de la transfusión reduciendo también la aloinmunización. (Westhoff, 2008)

Proveer sangre compatible para pacientes que reciben transfusión crónica, talasemia y mujeres con expectativa obstétrica es uno de los mayores retos de los servicios de transfusión y centros de donantes. La aloinmunización podría ser evitada por la coincidencia exacta de las unidades donadas con el fenotipo del receptor. (Cortéz, 2012)

## **IV. GENERALIDADES**

### **4.1 Grupo sanguíneo**

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 (Beutler,2007). Los antígenos de grupo sanguíneo son polimórficos e inmunogénicos y sus epítomos están localizados en proteínas, glicoproteínas o glicolípidos en la superficie celular (Cotorruelo, 2009).

El término grupo sanguíneo suele estar restringido a los antígenos de superficie de las células sanguíneas y particularmente a los antígenos de los eritrocitos. 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. (Daniels y cols, 2007).

Los grupos sanguíneos se clasifican en Sistemas, Series y Colecciones. Un sistema consiste en uno o más antígenos que comparten características en común como su estructura química, la localización en la membrana, controlados por un gen o genes estrechamente relacionados con escasa o nula recombinación entre ellos. Las colecciones contienen a los antígenos que tienen alguna relación bioquímica, serológica o genética, pero sin cumplir cabalmente las condiciones de un sistema. Las series corresponden a los antígenos que no reúnen los requisitos anteriores, se clasifican en series de baja prevalencia con <1% (serie 700) y de alta prevalencia con >99% (serie 900). (Escamilla, 2006).

## 4.2 Antígenos de grupo sanguíneo.

Los antígenos de los grupos sanguíneos son estructuras químicas (proteínas, glucolípidos y glucoproteínas), expuestas en la superficie de la membrana eritrocitaria, así como en otros tejidos y líquidos del organismo.

Por ejemplo, los antígenos del grupo ABO son carbohidratos, son producidos por una serie de reacciones en las que enzimas catalizan la transferencia de unidades de carbohidrato. En contraste, los antígenos del grupo Rh son proteínas, el gen RHD codifica para el antígeno D. (Dean, 2005)

La membrana del eritrocito expresa tres tipos de proteínas que contienen antígenos de grupos sanguíneos: proteínas de un pase, proteínas multi-pase y proteínas unidas a glucosilfosfatidilinositol (GPI). (Figura 1)

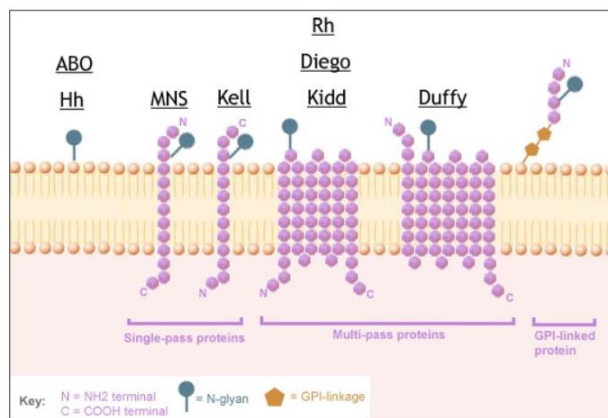


Figura 1. Representación de algunos antígenos anclados a proteínas de membrana del eritrocito. (Recuperado de Dean,2005)

## 4.3 Genes RH.

La complejidad del sistema Rh reside en dos genes, altamente polimórficos, que lo codifican, estos dos genes, RHD y RHCE, están muy cercanamente relacionados y numerosos reordenamientos genéticos entre ellos han producido genes híbridos que codifican múltiples antígenos Rh diferentes. En la actualidad se han identificado 49 diferentes antígenos. (Dean,2005)

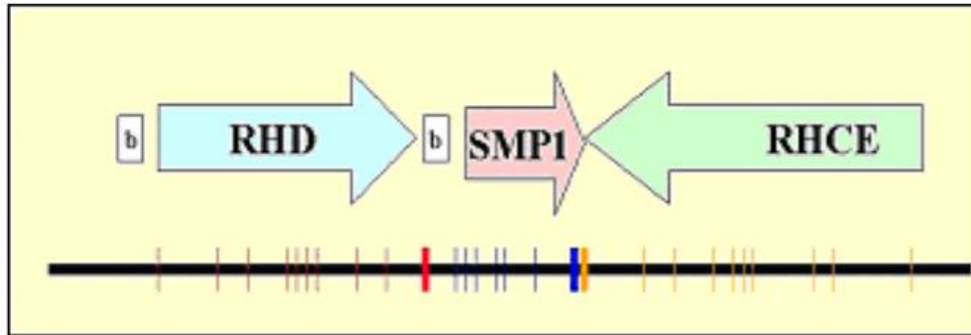


Figura 2. Orientación de los genes RHD y RHCE enfrentados en su posición 3'. Localización de las cajas Rhesus (b). Tomado de Cruz Reyes, 2010.

El RHD y el RHCE, están localizados en el cromosoma 1, en el brazo corto en la región 34 y la banda 11.

El gen RHD está flanqueado en ambos extremos por unas secuencias también de alta homología (98.6%), llamadas cajas Rhesus, río arriba (ascendente) y río debajo (descendente) de aproximadamente 9000 pb, con la misma orientación. Cada una de las cajas Rhesus tiene una región idéntica de 1463 pb, que es la región de ruptura a través de entrecruzamiento desigual en la delección del gen RHD, que forma una secuencia híbrida llamada caja Rhesus híbrida, principal mecanismo de la población RhD negativo. (Wagner y Flegel 2000).

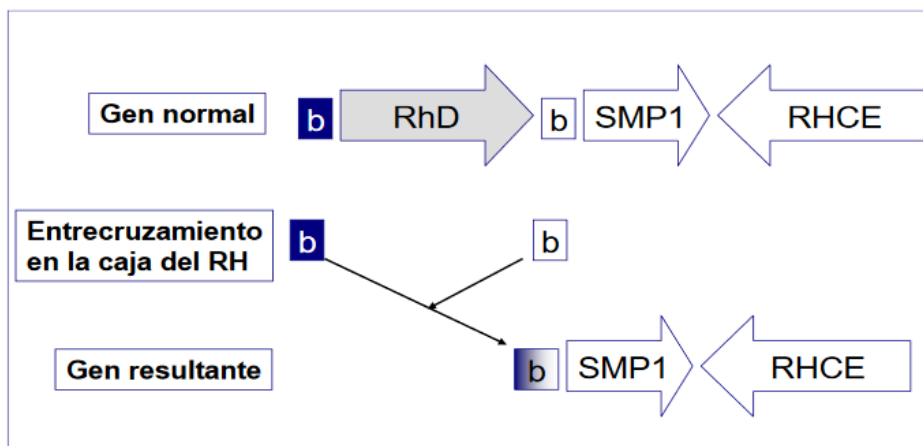


Figura 3. Mecanismo de delección del gen RHD y formación de la caja Rh híbrida. Recuperado de Baptista, 2008.

Hay otros tres genes relacionados, RHAG, RHBG y RHCG, localizados en el brazo corto del cromosoma 6 en la región 2, banda 1, sub-banda 1 (6p21.1); el gen RHAG codifica para la proteína RhAg (Rh50), cuyo papel es esencial en la expresión de las proteínas RhD y RhCE. Las proteínas RhBg y RhCg no son de distribución eritroide. (Cruz, 2010).

#### 4.4 Variantes de D

Mutaciones en el gen RHD pueden condicionar la debilidad de expresión de la proteína D, en forma de D débil, D parcial y Del, los cambios de los aminoácidos en el D débil y Del no se producen en los epítopes externos, de tal forma que los que poseen estos fenotipos no producen Anti-D por transfusión ni por embarazo, pero los D parciales sí, ya que hay modificaciones en los epítopes externos (Figura 4). (Westhoff 2007a)

**4.4.1 Variante D débil:** corresponde al fenotipo cuyos eritrocitos poseen una cantidad reducida del antígeno D.

**4.4.2 D parcial:** corresponde al fenotipo cuyos eritrocitos son catalogados como D positivos, pero carecen de una porción del antígeno D.

**4.4.3 Del:** corresponde al fenotipo cuyos eritrocitos expresan niveles muy bajos del antígeno D, por lo que no pueden ser detectados con métodos serológicos de rutina.

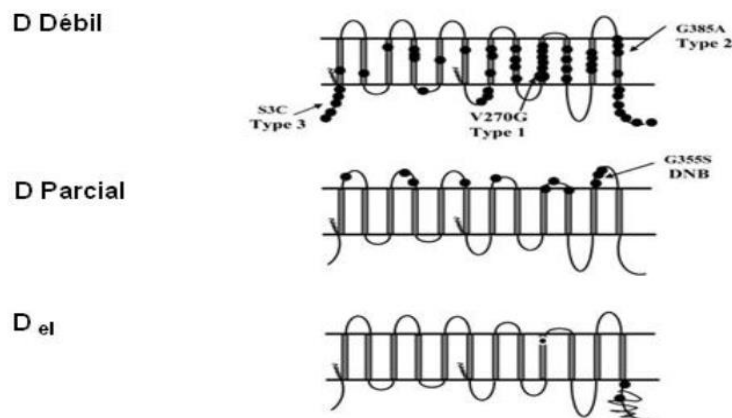


Figura 4. Cambios en los aminoácidos de la proteína Rh condicionan la presencia de RhD débil, parcial y Del. Los círculos negros denotan los cambios. Tomado de Rosenfeld, 2009.

#### **4.5 RHD negativo**

En 1986, Patricia Tippet propuso la teoría de la existencia de dos genes (RHD y RHCE) que son responsables de la presencia de los antígenos del sistema Rh, misma que fue confirmada por la clonación de ambos genes en 1990 por Colin y cols., y mediante estudios moleculares, se reveló la presencia de ambos genes en individuos RhD positivo, mientras que en individuos RhD negativo, sólo se observó la presencia del gen RHCE (Scott, 2004).

Cuando menos existen dos mecanismos moleculares para explicar la condición de Rh negativo. Uno es la delección total o parcial de gen RHD. La delección del RHD, es el mecanismo predominante en sujetos de origen étnico caucásico.

El otro mecanismo es la pérdida de expresión del gen RHD por diferentes mutaciones como la formación del pseudogen RHD $\psi$ , predominante en la población de origen africano. En este segundo grupo, el gen RHD, al menos en parte, está presente, pero su expresión fenotípica no ocurre. (Wagner 2003)

La delección del RhD es el mecanismo dominante en sujetos RhD negativo de origen europeo caucásico y ocurre por el entrecruzamiento de la caja Rh superior e inferior, formando una nueva estructura: la caja Rh híbrida. El punto de ruptura se localiza en la región de identidad de las cajas del Rh y se explica por un entrecruzamiento desigual con otros elementos de alta homología. La caja Rh híbrida es idéntica en su terminación 5' a la caja Rh superior y en su terminación 3' a la caja Rh inferior. La presencia homocigota de la caja Rh híbrida ocurre en más de 99 % de la población RhD negativo de origen caucásico. (Baptista-González, 2010)

#### **4.6 Pruebas tradicionales de clasificación.**

La prueba para la clasificación sanguínea de rutina se basa en una técnica de hemaglutinación. Se utilizan reactivos comerciales que contienen anticuerpos específicos para cada antígeno, que se mezclan con la sangre a clasificar. Después de mezclar una gota del reactivo con una gota de sangre, se observa la presencia de hemaglutinación. (Arbeláez, 2009)

Las técnicas de laboratorio utilizadas para la identificación del fenotipo Rh han sido la hemaglutinación en tubo, que es la prueba más difundida y evaluada, seguida por otras técnicas aplicables solamente a nivel experimental, como son la determinación de la densidad del antígeno D mediante citometría de flujo o pruebas de electroforesis de proteínas (Western Blot). Actualmente también se usa la técnica de fotoaglutinación en placas de gel. (Vengelen-Tyler V, 2005)

Entre otras, se pueden mencionar las siguientes pruebas de clasificación:

1. Salino: tiene como única limitante la aglutinación de IgM, ya que los IgG son demasiado pequeños para unirse, a la distancia en que se encuentran, a los glóbulos rojos suspendidos; por tanto, no habrá aglutinación ante un solo IgG. Hoy en día no tiene cabida en el estudio diagnóstico.
2. Suero de Coombs: se produce después de inocular suero humano en conejos o conejillos de India, dando origen a un antisuero específico (suero Coombs). El suero del paciente se mezcla con glóbulos rojos RhD+ y después se lavan en cuatro ocasiones con solución salina para retirar los anticuerpos no adheridos al eritrocito; el suero de Coombs se adiciona a la mezcla y en presencia de uniones AntiD-antígeno se observará la aglutinación.
3. Enzimático: es el más sensible de los métodos manuales de tamizaje de anticuerpos Rh. Consiste en disminuir el potencial de membrana del glóbulo rojo por medio de métodos enzimáticos y así aumentar su capacidad de aglutinación por IgG antiD. (Lambertino Et al. 2014)
4. Aglutinación en columna: os sistemas comerciales emplean una tarjeta o tira de microtubos, éstos permiten el procesamiento de varias pruebas en forma simultánea. Un espacio en la parte superior de cada columna se usa para los eritrocitos o para incubar las células y el suero o plasma. Cuando los eritrocitos pasan a través de la columna durante la centrifugación, el medio de la columna separa los eritrocitos aglutinados de los no aglutinados, de acuerdo al tamaño del agregado. (Arbeláez-García, 2009)

#### **4.7 Pruebas moleculares**

Entre las técnicas de la biología molecular que son rápidas y económicas se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa seguida por la digestión con enzimas de restricción (en inglés, PCR-RFLP). Esta ha demostrado ser útil para el diagnóstico de mutaciones puntuales causadas por el cambio de una base nitrogenada o pequeñas deleciones o inserciones que crean o destruyen un sitio de restricción. Se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular o de longitudes diferentes, de manera que, mediante el análisis de los polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción, es posible determinar la presencia o no de la mutación, y por tanto, el genotipo del individuo. (Reyes,2013)

Al presente todos los genes de los 30 sistemas sanguíneos han sido identificados y secuenciados. Se han determinado las bases moleculares para todos los polimorfismos de los grupos sanguíneos clínicamente importantes, además de las variantes raras. La asociación de la mayoría de los antígenos de los eritrocitos con polimorfismos de nucleótidos únicos o SNPs (por sus siglas en inglés, single-nucleotide polymorphisms), proveen las bases para la detección de la expresión del antígeno por medio de DNA. (Arbeláez-García, 2009)

Otras técnicas de diagnóstico molecular aplicado a la inmunohematología incluyen la secuenciación de fragmentos de ADN de interés o la aplicación de PCR en tiempo real (Rosenfeld, 2009) que optimizan los procesos al minimizar el volumen de muestra y mostrar sin necesidad de un revelador la amplificación obtenida.

## **V. OBJETIVO GENERAL**

Identificar fenotipos eritrocitarios del Sistema Rh por métodos convencionales de Hemaglutinación y por la técnica de PCR-RFLP en donadores RhD negativos en Bancos de Sangre de Tijuana, B.C. como herramienta para optimizar la tipificación del sistema Rh.

### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Identificar fenotipos eritrocitarios del sistema RhD por el método convencional de aglutinación en tubo.
- 2) Extraer ADN de las muestras seleccionadas para formar un banco de ADN.
- 3) Realizar pruebas de PCR-RFLP para determinar la presencia de la caja Rh Híbrida e Identificar el mecanismo molecular predominante mediante el cual se genera la condición Rh negativo.

## **VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **6.1 METODOLOGÍA**

Estudio realizado de manera transversal, prospectivo, descriptivo en el Banco de Sangre del H.G.O. y U.M.F. No.7 del IMSS en Tijuana, B.C. de enero a septiembre de 2016, utilizando como criterio de inclusión paquetes globulares serotipificados por el banco de sangre como RhD negativos y como criterio de exclusión paquetes globulares serotipificados por el banco de sangre como RhD positivos, se realizó la detección de los antígenos D, C, c, E y e en las muestras seleccionadas, se extrajo ADN utilizando un kit comercial para formar un banco de ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad del ADN, se cuantificó el ADN de cada muestra por absorbancia, se realizó una digestión con enzimas de restricción y finalmente se compararon los patrones de bandas con los controles previamente establecidos.

**A. Tipo de estudio.** Transversal, prospectivo, descriptivo

**Espacio:** Donadores de Sangre tipificados como Rh negativos

**Lugar:** Banco de Sangre de la UMF no 7 del IMSS

**Temporalidad.** De enero a septiembre de 2016.

## **B. Criterios de Inclusión y Exclusión**

### **Criterios de Inclusión**

Paquetes globulares serotipificados por el banco de sangre como RHD negativos.

### **C. Criterio de Exclusión**

Paquetes globulares serotipificados por el banco de sangre como RHD positivos.

## **D. Variables**

### **Variable independiente**

Factor RH

### **Variable dependiente**

Fenotipo del sistema RhD

## **E. Tipo de muestra**

Paquetes globulares serotipificados como RHD negativos de donadores sanos.

## **F. Tamaño de la muestra**

Paquetes globulares serotipificados como RHD negativos de donadores sanos en cantidad estadísticamente significativa con respecto al total de paquetes en disponibilidad.

Se determinó el tamaño muestral utilizando la fórmula:

$$n = \frac{Z^2\sigma^2N}{e^2(N-1)+Z^2\sigma^2}$$

Donde: n: tamaño de muestra

Z: valor de nivel de confianza (95% = 1.96)

$\sigma$ : desviación estándar (0.5)

N: tamaño de población (480)

e: límite de error (5% = 0.5)

El tamaño de muestra calculado fue de 48, se agregó el 24 % extra para considerar la posibilidad de pérdida o muestras descartadas obteniendo un total de 59 muestras.

## **6.2 MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.2.1 Recolección de muestras de paquetes globulares.**

Para la recolección de muestras sanguíneas se acudió al banco de sangre del H.G.O. y U. M. F. no. 7 del IMSS donde se seleccionaron los paquetes globulares previamente serotificados por el banco de sangre como RhD negativos de los refrigeradores de almacén, se cortó un piloto y se tomó registro del número de identificación de la bolsa correspondiente. Se asignó un número consecutivo a cada piloto y se marcó un tubo de ensayo de 13x100mm con marcador indeleble.

### **6.2.2 Fenotipificación por aglutinación en tubo.**

Para determinar la presencia de los antígenos D, C, c, E y e se llevó a cabo el siguiente método para cada muestra problema.

1. Se tomaron 50 $\mu$ L de concentrado eritrocitario y se colocaron en un tubo de ensayo de 13x100mm limpio y seco previamente marcado con el número correspondiente a la muestra.
2. Se realizó un lavado de las células suspendiendo los eritrocitos en solución salina fisiológica estéril a temperatura ambiente con ayuda de una pipeta transfer y se centrifugaron a 2500rpm durante 1 minuto, se desechó el sobrenadante y se repitió el proceso 3 veces.
3. Se realizó una suspensión de eritrocitos lavados al 5% en solución salina fisiológica estéril.
4. Se rotularon 5 tubos de ensayo de 13x100mm (D, C, c, E y e) con marcador indeleble y se colocó una gota de suspensión eritrocitaria al 5% en cada uno.
5. Se adicionó una gota del antisuero monoclonal correspondiente a cada tubo (Anti-D, Anti-C, Anti-c, Anti-E y Anti-e)
6. Se incubaron las muestras en una incubadora para tubos BIORAD® a 37° C por 15 minutos.
7. Se centrifugaron las muestras a 2500rpm por 2 minutos y se interpretó la presencia de aglutinación por medio de cruces (+), siendo negativo (-) la ausencia de aglutinación y 4 cruces (++++) la aglutinación máxima.

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

### **6.2.3 Extracción de ADN.**

De cada muestra sanguínea se realizó la extracción de ADN genómico con el kit comercial Genomic DNA Mini Kit (tissue) IBI SCIENTIFIC® siguiendo los pasos indicados en el inserto (Anexo 1).

Las muestras de ADN fueron almacenadas en tubos para microcentrífuga de 1500µL a -20° C para su posterior análisis.

### **6.2.4 Evaluación de la presencia e integridad del ADN.**

Para evaluar la integridad del DNA obtenido se tomaron 2µL de muestra, se mezclaron con 1µL de buffer de carga DNA Gel Loading Dye (6X) Thermo Scientific™ y se cargaron en un gel de agarosa al 1% adicionado con 1µL de Midori Green para someterlo a electroforesis con amortiguador TBE 1X [(500 mM de Tris-HCl, ácido bórico 60 mM y EDTA-Na2 83 mM), pH 8.0], utilizando 100v por 20 minutos.

Como control negativo se usaron todos los reactivos, pero sin DNA, para determinar una posible fuente de contaminación del material obtenido.

Los geles fueron fotografiados con el sistema de captura Alphamager utilizando el software AlphaView.

### **6.2.5 Cuantificación del ADN.**

Se determinó la pureza y concentración del ADN de todas las muestras utilizando un espectrofotómetro uv-visible ACTGene realizando lecturas a 260 y 280nm, se colocaron 2µL de muestra en el dispositivo de lectura y se registraron los resultados mediante el software integrado al equipo.

### **6.2.6 PCR**

Para la reacción de amplificación del segmento de interés se utilizaron los siguientes primers:

*Forward* 5' AAT CTA GGC GAA GGT TTC CAA 3'

*Reverse* 5' CTC TGT CTC AAA AAA AAA AAA AAA ACA AGT G 3'

Se mezclaron 7.5µL de HotStar Taq Master Mix QIAGEN®, 0.5µL de primer F, 0.5µL de primer R, 5.75µL de agua libre de nucleasas y 0.75µL de ADN genómico para obtener un volumen de reacción de 15µL.

Las condiciones para la realización del PCR fueron: 15 minutos de desnaturalización inicial a 95° C, 35 ciclos de 30seg de desnaturalización a 94° C, 30seg de alineamiento a 50° C y 1.5 minutos de extensión a 72° C, y 10 minutos de una extensión final a 72° C.

### 6.2.7 Digestión con enzimas de restricción (RFLP)

Se tomaron 8µL de los productos del PCR y se adicionaron 0.3µL de la enzima EcoRV New England Biolabs®, previo análisis bioinformático de los sitios de corte en el amplicón, y se incubó durante 1.5 horas a 37° C.

Posteriormente se evaluó el patrón de bandas en un gel de agarosa al 2% adicionado con 1µL de Midori Green con amortiguador TBE 1X [(500 mM de Tris-HCl, ácido bórico 60 mM y EDTA-Na2 83 mM), pH 8.0]. Se aplicó una corriente de 100v durante 5 minutos y posteriormente 75v durante 25 minutos. Los geles fueron fotografiados con el sistema de captura Alphamager utilizando el software AlphaView.

## VII. RESULTADOS.

### 7.1 Fenotipificación por aglutinación en tubo.

Se tipificaron 59 muestras de paquetes globulares serotipificados por el banco de sangre como Rh negativos. Se determinó su fenotipo y su genotipo.

**Cuadro 1.** Distribución de fenotipo ccdee

Fenotipos Eritrocitarios Rh-Hr de Donadores de sangre Rh negativos									
No.	ID muestra	D	C	c	E	e	Fenotipo	Genotipo	
1	71614746	-	-	4+	-	2+	ccdee	cde/cde	
2	N9115171	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde	

3	71614809	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
4	71614666	-	-	3+	-	3+	ccdee	cde/cde
5	P9175634	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
6	71615186	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
7	1614587	-	-	3+	-	2+	ccdee	cde/cde
8	71615018	-	-	2+	-	2+	ccdee	cde/cde
10	71614824	-	-	2+	-	2+	ccdee	cde/cde
11	71614814	-	-	2+	-	2+	ccdee	cde/cde
12	71614942	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
13	71615049	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
14	71614766	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
15	C9174262	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
17	N9119450	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
18	P9119403	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
19	AF0626245	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
20	71615181	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
21	P9115204	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
22	71614956	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
23	D9119349	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
24	C9175625	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
25	D9115271	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
26	P9115263	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
29	D9115240	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
31	P9119410	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
32	D9115332	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
33	E9175502	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
35	E9115201	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
36	E9175549	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
37	C9175005	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
38	C9175629	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
39	P9175007	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
40	C9175004	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
41	D9115172	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
43	71704703	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
45	71704683	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
46	71704659	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
47	71704661	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
50	71704543	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
52	1704	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
55	2285	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
57	71702705	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
58	1751	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
59	1753	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde

**Cuadro 2.** Distribución de fenotipo Ccdee

Fenotipos Eritrocitarios Rh-Hr de Donadores de sangre Rh negativos								
No.	ID muestra	D	C	c	E	e	Fenotipo	Genotipo
9	C9175550	-	2+	4+	-	3+	Ccdee	Cde/cde
16	N9115195	-	4+	4+	-	3+	Ccdee	Cde/cde
27	P9175630	-	3+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
30	C9174266	-	4+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
48	71704547	-	+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
49	401681	-	+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
51	1702	-	+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
53	2286	-	+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
54	1749	-	3+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde

**Cuadro 3.** Distribución de fenotipo ccdEe

Fenotipos Eritrocitarios Rh-Hr de Donadores de sangre Rh negativos								
No.	ID muestra	D	C	c	E	e	Fenotipo	Genotipo
28	P9119335	-	-	4+	3+	4+	ccdEe	cde/cde
34	P9115262	-	-	4+	4+	3+	ccdEe	cdE/cde
56	71704452	-	-	4+	4+	4+	ccdEe	cdE/cde

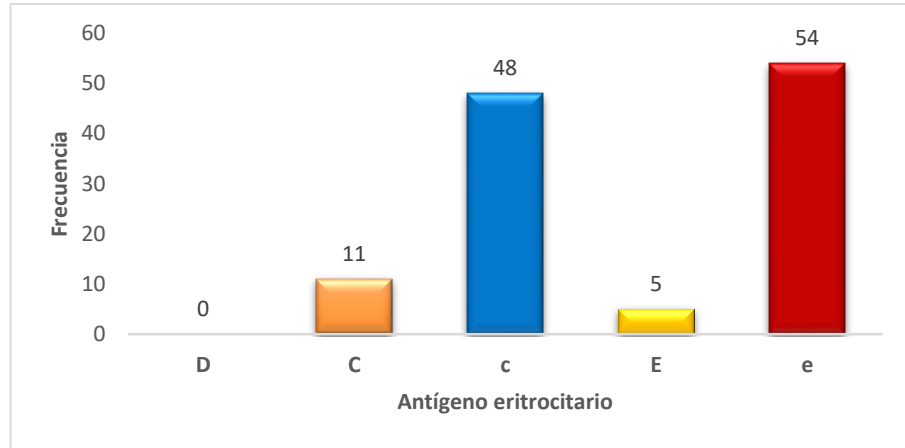
**Cuadro 4.** Distribución de fenotipo CcdEe

Fenotipos Eritrocitarios Rh-Hr de Donadores de sangre Rh negativos								
No.	ID muestra	D	C	c	E	e	Fenotipo	Genotipo
42	71704693	-	+	4+	+	4+	CcdEe	CdE/cde
44	71704670	-	4+	4+	+	4+	CcdEe	CdE/cde

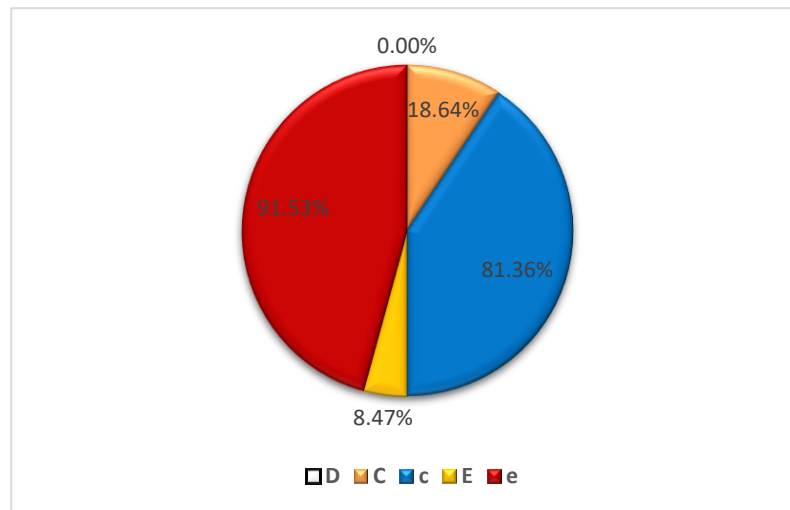
**Cuadro5.** Frecuencia de antígenos eritrocitarios detectados por aglutinación en tubo.

Antígeno eritrocitario	Frecuencia	Porcentaje
D	0	0.00%
C	11	18.64%
c	48	81.36%
E	5	8.47%
e	54	91.53%

**Figura 5.** Gráfica de frecuencia de antígenos eritrocitarios.



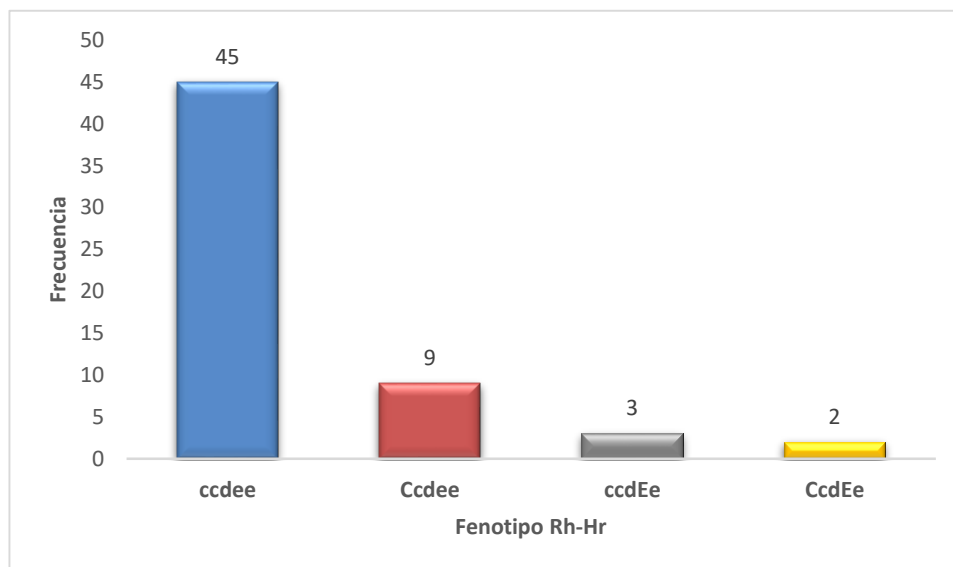
**Figura 6.** Gráfica de porcentajes de detección de antígenos eritrocitarios.



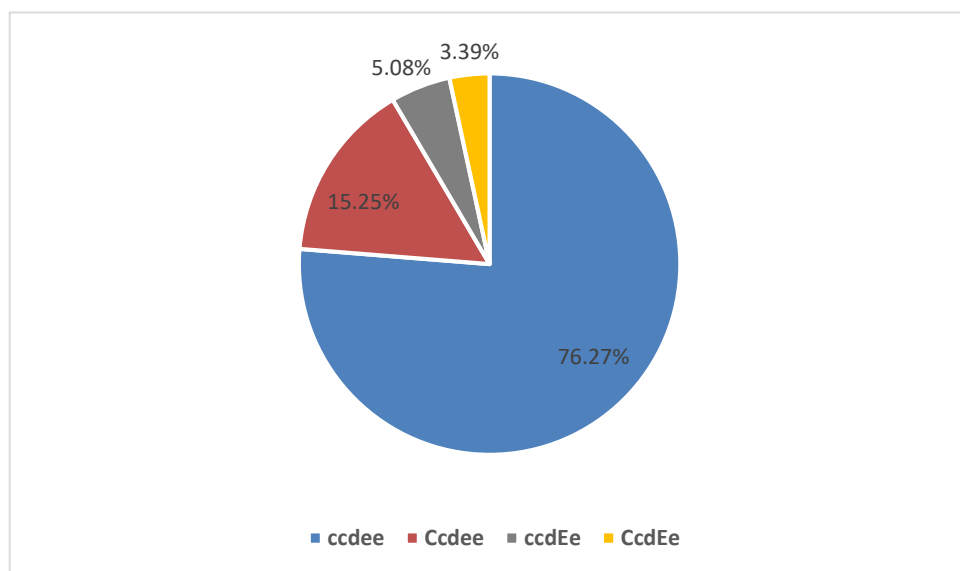
**Cuadro 6.-** Frecuencia de fenotipos de antígenos eritrocitarios.

Fenotipo	Frecuencia	Porcentaje
ccdee	45	76.27%
Ccdee	9	15.25%
ccdEe	3	5.08%
CcdEe	2	3.39%

**Figura 7.** Gráfica de frecuencia de fenotipos eritrocitarios Rh-Hr



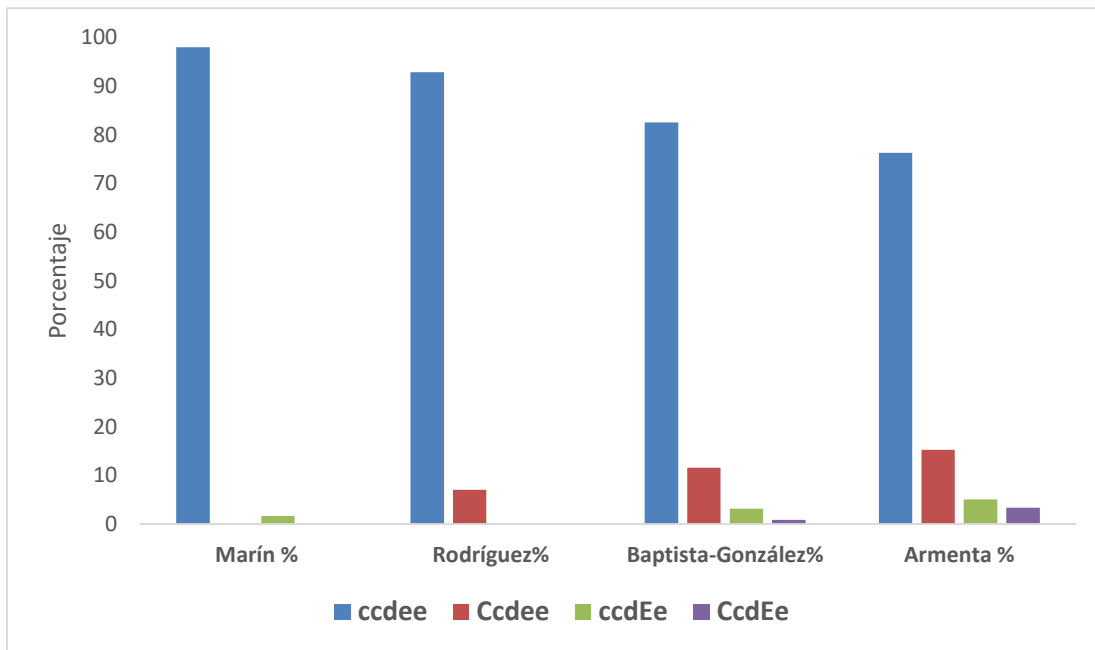
**Figura 8.** Gráfica de porcentajes de fenotipos eritrocitarios Rh-Hr



**Cuadro 7.-** Comparación de porcentajes de prevalencia de fenotipos Rh eritrocitarios

	Marín %	Rodríguez%	Baptista-González%	Armenta %
ccdee	98	92.9	82,8	76.3
Ccdee	0,0	7,1	11,6	15.3
ccdEe	1,7	0	3,2	5.1
CcdEe	0	0	0,9	3.4

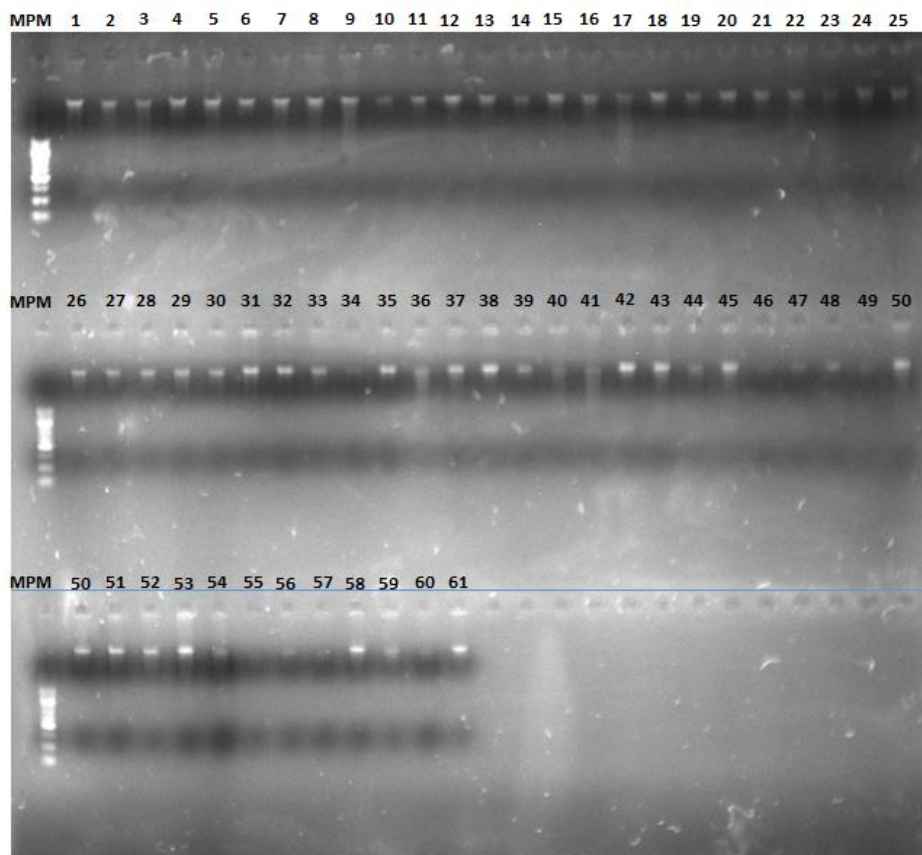
**Figura 9.-** Gráfica comparativa de porcentajes de prevalencia de fenotipos Rh eritrocitarios



## 7.2 Evaluación de la presencia e integridad del ADN.

Se evaluó la presencia e integridad del ADN mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% (Figura 8)

**Figura 10.-** Fotografía del gel de evaluación de la presencia e integridad del ADN.



### **7.3 Cuantificación del ADN.**

Para obtener información de la pureza del ADN obtenido y hacer los ajustes necesarios para la reacción de PCR se obtuvo la relación de absorbancia a 260 y 280nm y se realizó su cuantificación en ng/  $\mu$ L.

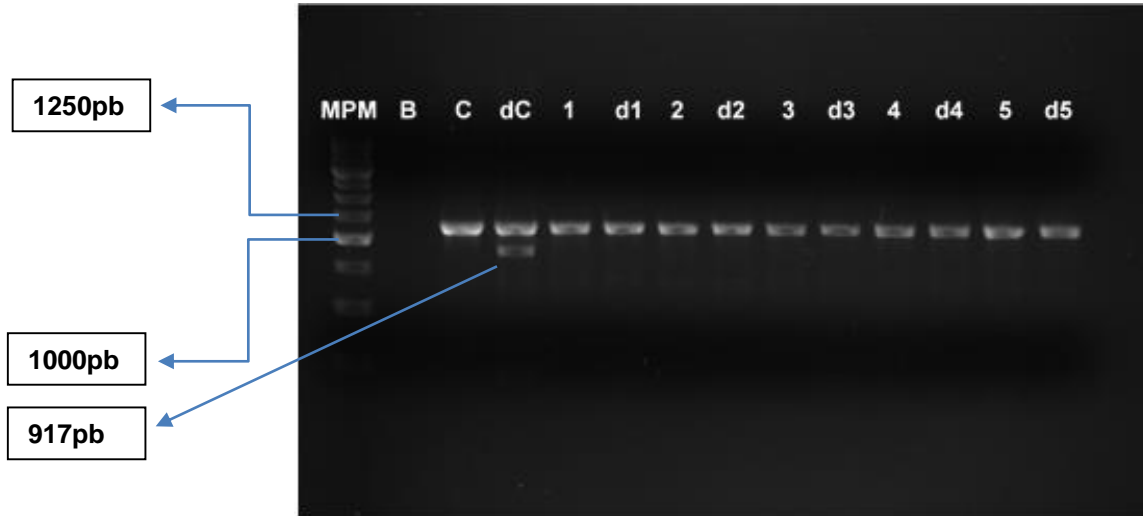
- a) Como valor promedio de la relación 260/280nm se obtuvo **1.7704**
- b) Como valor promedio de la concentración de ADN se obtuvo **40.06 ng/  $\mu$ L**

(Los resultados individuales desglosados se encuentran en el anexo 3)

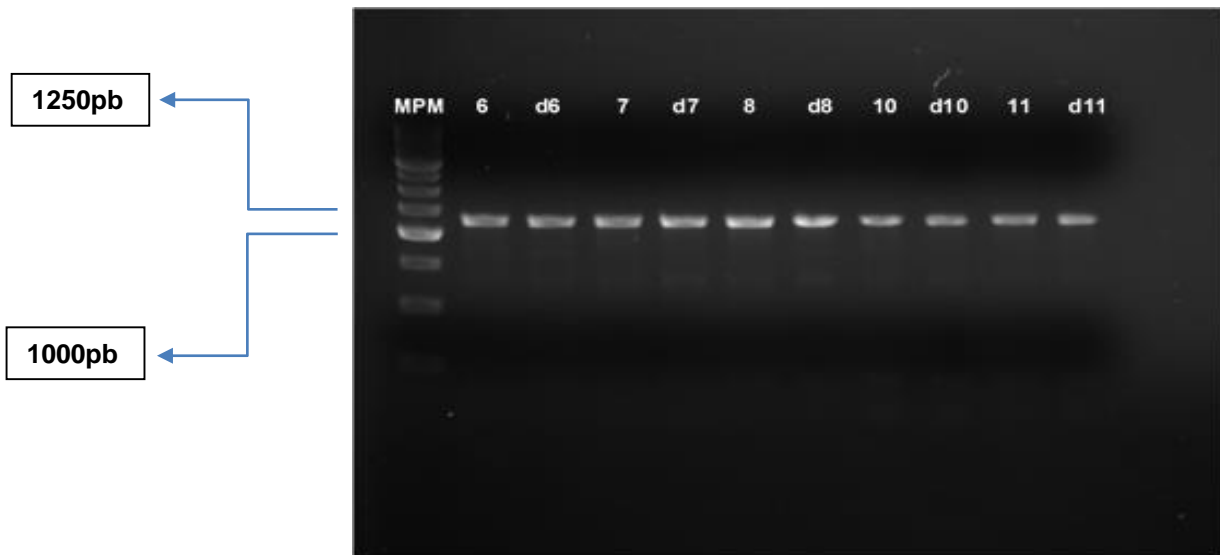
### **7.4 PCR y digestión con EcoRV**

Se realizó la reacción de PCR para obtener un amplicón de 1151pb que posteriormente fue sometido a la digestión con la enzima EcoRV obteniendo patrones de bandas. (Figuras 9 a la 13)

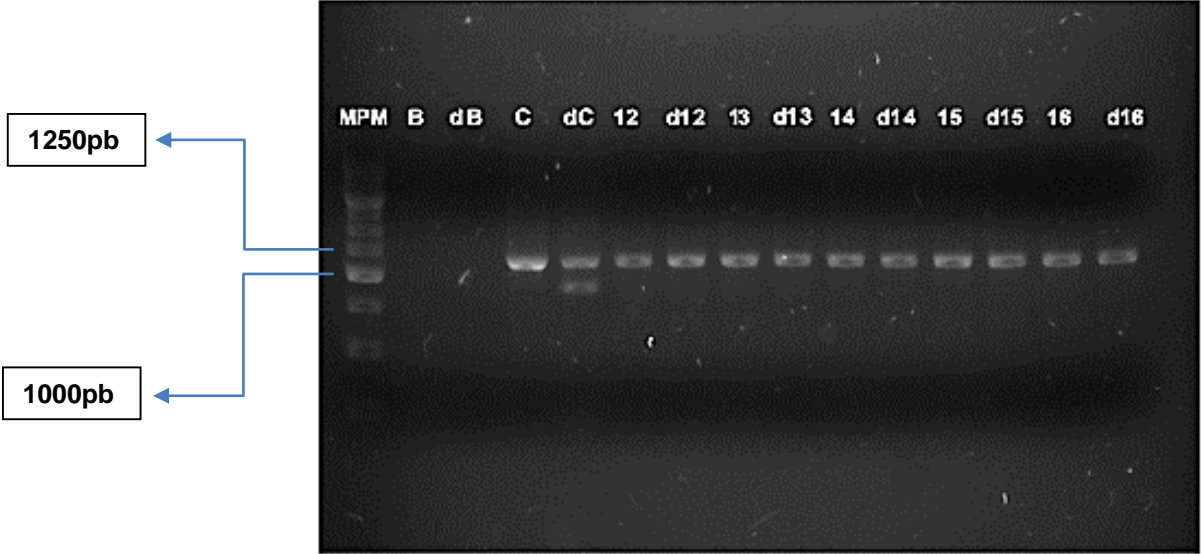
**Figura 11.-** PCR y digestión de las muestras 1 a la 5. En el tercer carril se colocó un ADN heterocigoto control y en el cuarto carril su digestión.



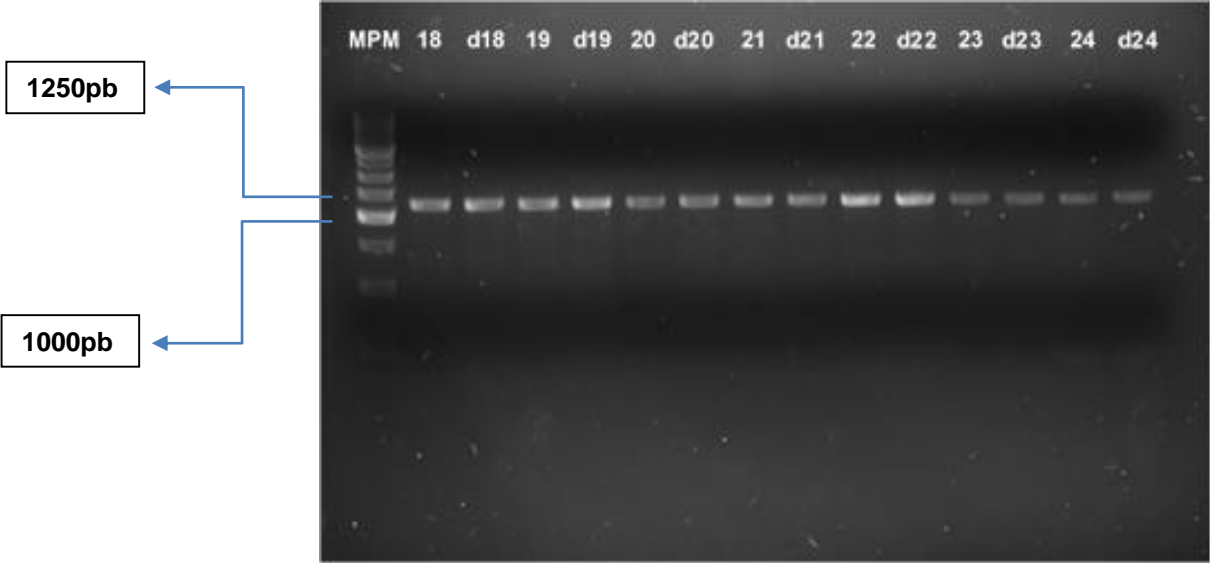
**Figura 12.-** PCR y digestión de las muestras 6 a la 11 (se excluye la muestra 9 por no presentar amplificación)



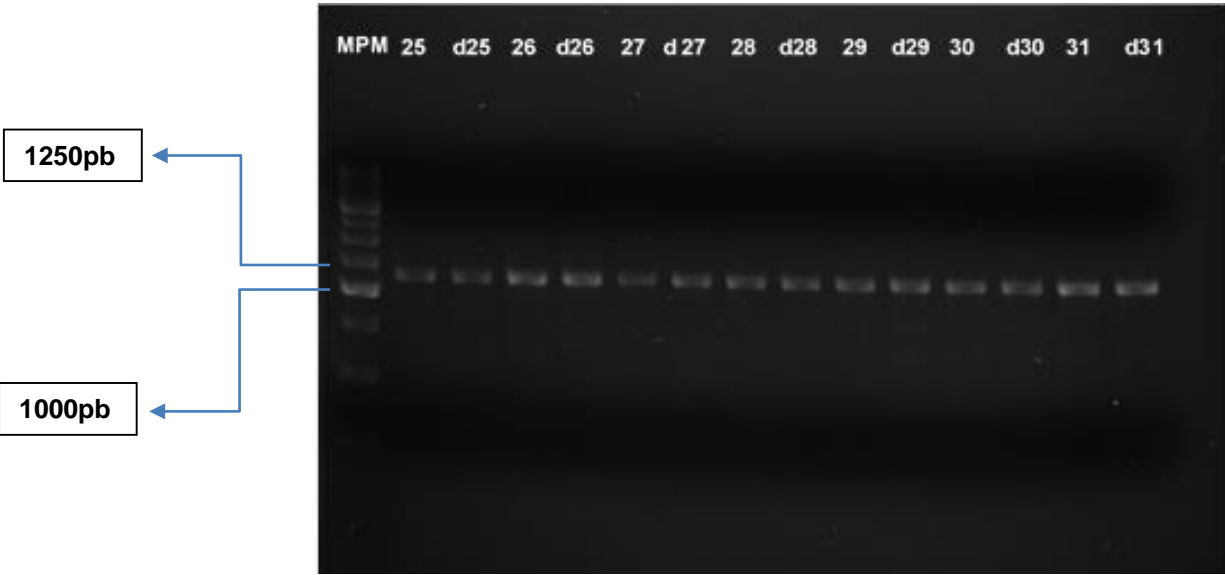
**Figura 13.-** PCR y digestión de las muestras 12 a la 16.



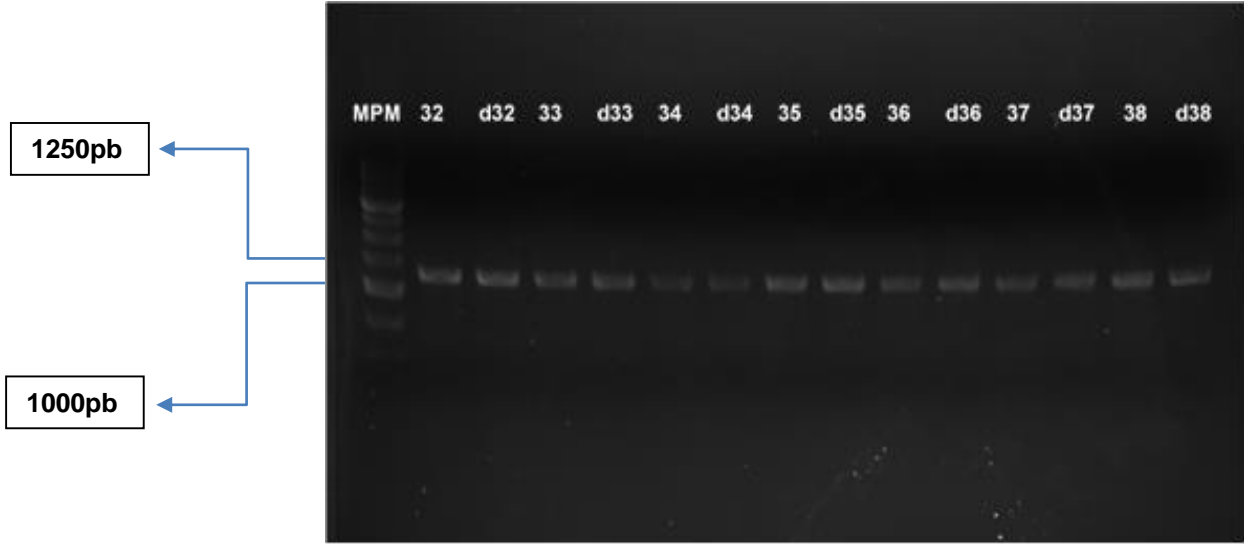
**Figura 14.-** PCR y digestión de las muestras 18 a la 24 (se excluye la muestra 17 por no presentar amplificación)



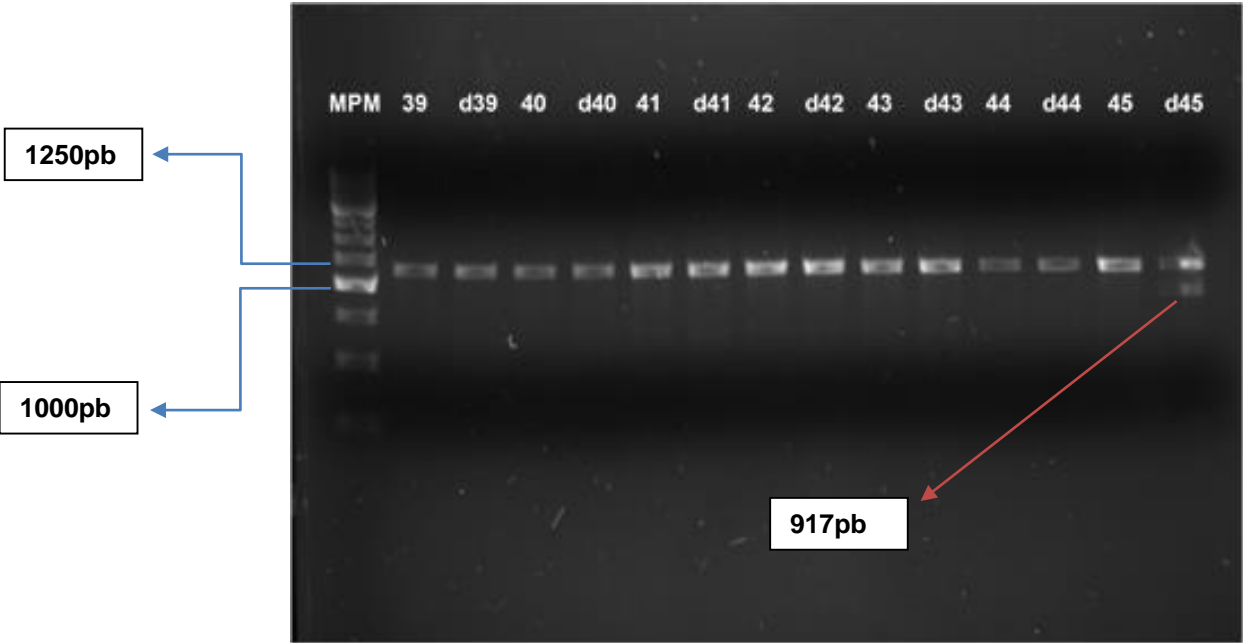
**Figura 15.-** PCR y digestión de las muestras 25 a la 31.



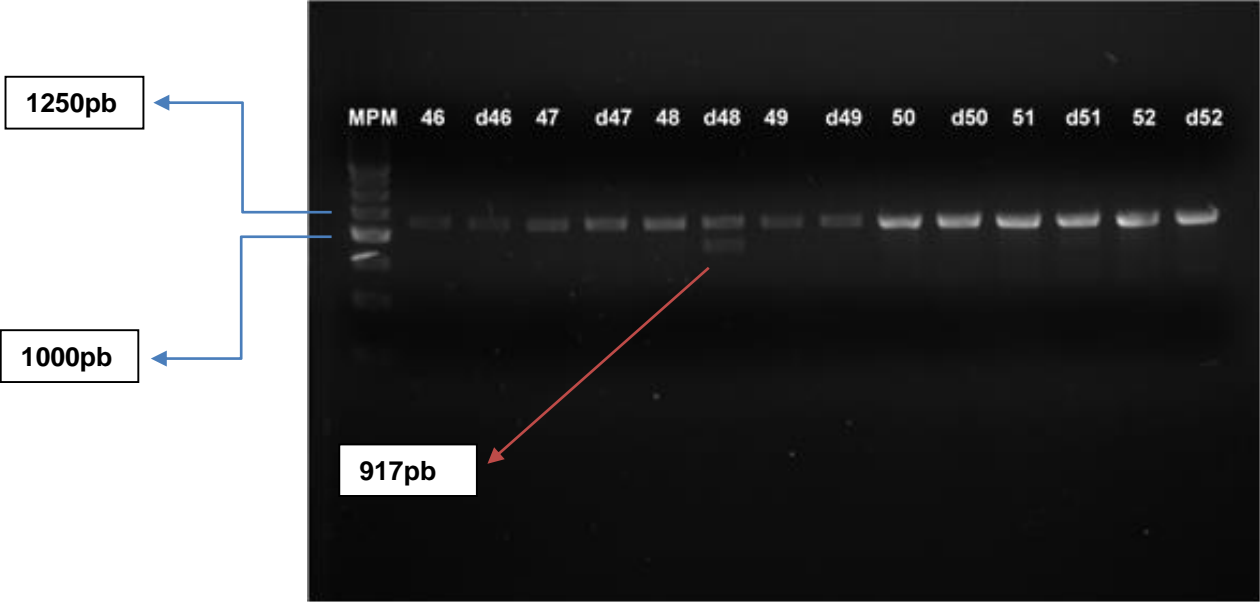
**Figura 16.-** PCR y digestión de las muestras 32 a la 38.



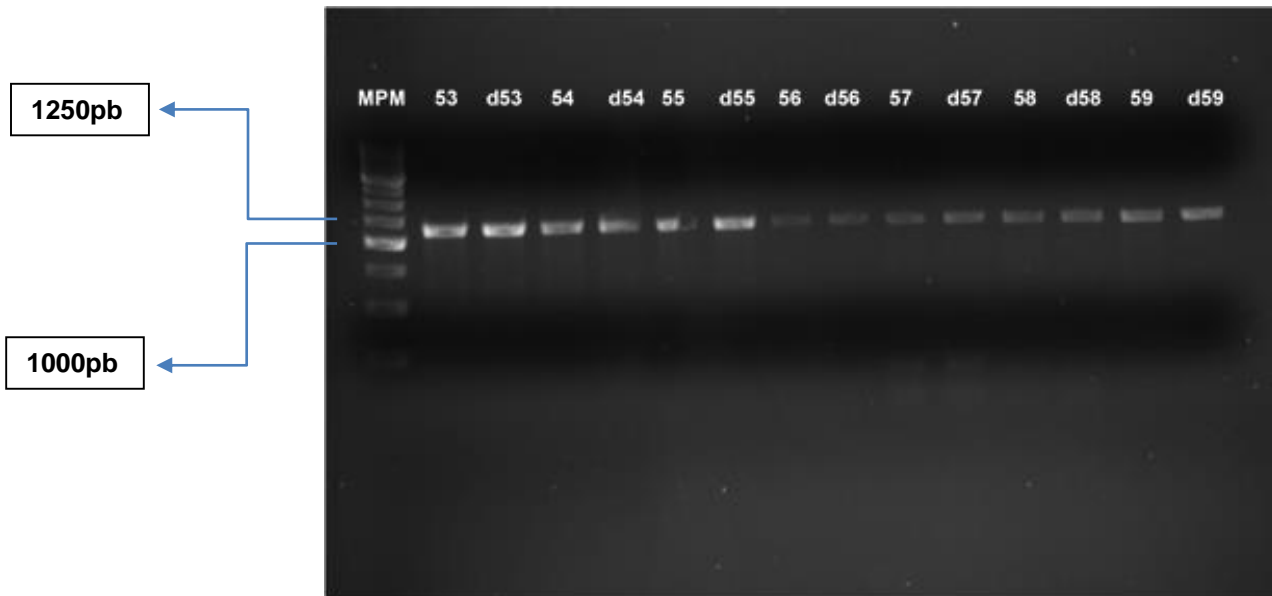
**Figura 17.-** PCR y digestión de las muestras 39 a la 45.



**Figura 18.-** PCR y digestión de las muestras 46 a la 52.

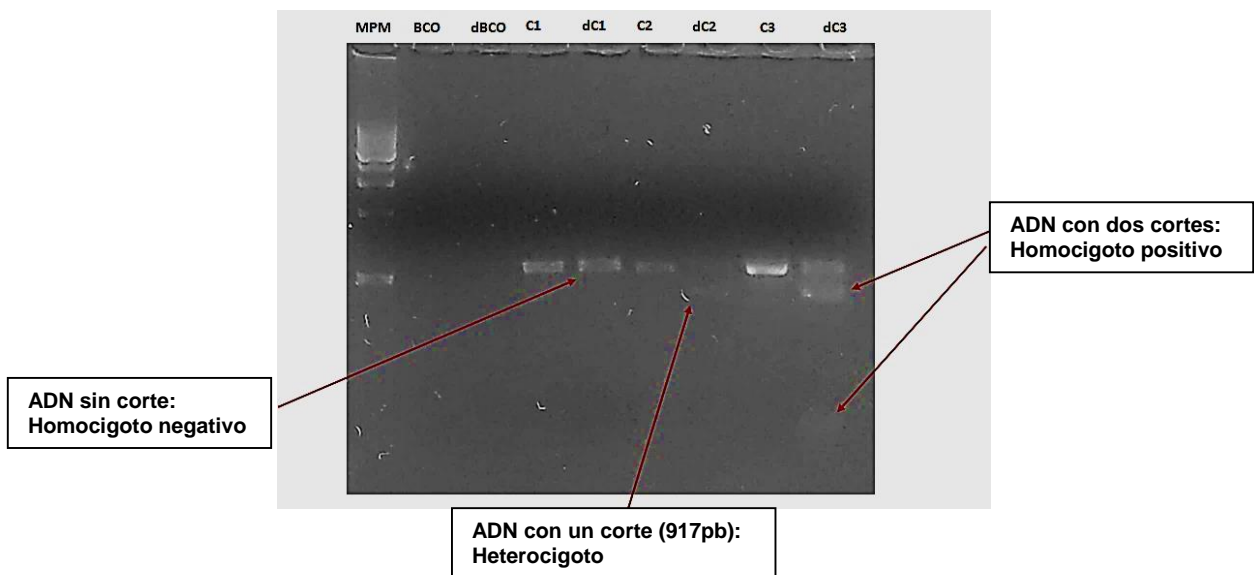


**Figura 19.-** PCR y digestión de las muestras 53 a la 59.



**7.5 Controles.** Para comparar los resultados obtenidos se utilizaron tres ADN control, provistos por el Instituto Nacional de Perinatología, previamente genotificados para el Rh. En la figura 14 se observa el patrón de bandas resultantes de la digestión del producto de PCR con EcoRV.

**Figura 20.-** ADN control



## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En las pruebas de fenotipificación se observó una alta elevada prevalencia de los antígenos c y e, mientras que los antígenos C y E fueron detectados en muy pocas muestras. (ver tabla 1). El antígeno D no fue detectado en ninguna de las muestras.

Del total de muestras fenotipificadas, el 76.27% presentó el fenotipo **ccdee**, el 15.25% el fenotipo **Ccdee**, el 5.08% **ccdEe** y el 3.39% **CcdEe**, estos resultados presentan similitud con los reportados por Baptista-González en el 2010 en una población del Valle de México [ccdee 92.3%, Ccdee 4.9%, ccdEe 1.7%, CcdEe 0.9%] (Baptista-González, 2010).

La media de la relación de absorbancia 260/280nm obtenida en el análisis de la pureza del ADN en las muestras fue de **1.7704**, la literatura (Sambrook,1989) reporta que es deseable una relación 260/280 mayor a 1.6 y menor a 2, ya que una relación menor a 1.6 es evidencia de contaminación de las muestras con compuestos aromáticos como los encontrados en las proteínas, y una relación mayor a 2 indica contaminación con ARN.

Como valor promedio de la concentración de ADN en las muestras se obtuvo **40.06ng/μL**, en promedio una concentración de 20ng/μL es suficiente para llevar a cabo una PCR, lo que favorece a la metodología pues al tener una alta cantidad de ADN se reduce el volumen de muestra a utilizar.

Del total de muestras sometidas a PCR, las muestras 9 y 17 se excluyeron del protocolo por no presentar amplificación a pesar de encontrarse en igualdad de condiciones que el resto de las muestras.

Para la digestión del producto de PCR con EcoRV inicialmente se incubaron las muestras a 37° C por un lapso de 30 minutos, sin embargo se observó un patrón de corte mejor definido al dejar incubar a 37° C por 1.5 horas.

De las 57 muestras amplificadas por PCR 55 no presentaron fragmentos derivados de cortes por la enzima de restricción, lo que provee evidencia de la delección del gen RHD y consecuente formación de la caja Rh híbrida de forma homocigota, sin embargo 2 de ellas (muestra 45 y muestra 48) presentaron un corte por la enzima EcoRV generando un fragmento de 917pb, siendo interpretados como individuos heterocigotos a la delección de gen RHD y representando el **3.5%** del total.

## IX. CONCLUSIONES

1.- El fenotipo del Sistema Rh con mayor prevalencia en donadores RhD negativos es el ccdee con un 76.27%. Genotipo cde/cde.

2.- Los fenotipos Ccdee, genotipo Cde/cde (15.25%) CcdEe, genotipo CdE/cde (3.39%) y ccdEe genotipo cde/cdE (5.08%), representan un importante hallazgo dado que al ser portadores de los antígenos C y E respectivamente, representan un riesgo potencial de incompatibilidad, en transfusiones sanguíneas entre RhD negativos al tratarse de antígenos altamente inmunogénicos.

3.- El fenotipo **ccdEe**, genotipo cde/cdE (5.08%), representa un porcentaje mayor al reportado por otros autores, lo que justifica su tipificación sistemática con la finalidad de evitar reacciones postransfusionales por incompatibilidad específica contra el antígeno **E**, especialmente en pacientes politransfundidos ó en mujeres múltiparas.

4.- El fenotipo CcdEe, genotipo CdE/cde (3.39%) representa un hallazgo remarcable, dado que no ha sido detectado por otros autores en estudios similares o ha sido detectado en un porcentaje muy bajo.

5.- El **3.4%** de las muestras analizadas fueron catalogadas como heterocigotas para la formación de la caja Rh híbrida como evidencia de la delección del gen RHD. Lo que sugiere un fenotipo D/d, cuya expresión no se dio probablemente debido a eventos moleculares que pueden sugerir un sujeto con condición de D débil o parcial.

6.- Al comparar los resultados de la serotipificación de rutina del banco de sangre con la tipificación serológica de aglutinación en tubo de este proyecto se encontró una correlación del 100%. Sin embargo al comparar con los resultados de la prueba molecular se obtienen 2 muestras heterocigotas (3.4%) que al extrapolarse al volumen de donadores anuales serían al menos 24 donadores con una tipificación incorrecta.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Arbeláez García, C. A. (2009). Sistema de grupo Sanguineo ABO. *Banco de Sangre*, 22(3), 329-346.
2. Baptista-González H. (2004). Actualidades en el sistema Rh. *Gac Méd Méx Vol.* 140, Suplemento No. 3, 2004
3. Baptista-González, H. A. (2005). El sistema Rh, una mirada a fondo. *Revista Médica del IMSS*, 3-8.
4. Baptista-González, H., Rosenfeld-Mann, F., Trueba-Gómez R., Reyes-Maldonado, E., & Jiménez-Zamudio, L. (2010). Identificación de la caja RH híbrida en el fenotipo Rh negativo de sujetos del valle de México. *Gac Méd Méx Vol.* 146 No. 1, 19-23.
5. Beutler E, Litchman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. Williams Hematología. 6a edición 2007.
6. Canizalez-Román, A., Campos-Romero, A., Castro-Sánchez, J. A., López-Martínez, M. A., Andrade-Muñoz, F. J., Cruz-Zamudio, C. K., & ... Alcántar-Fernández, J. (2018). Blood Groups Distribution and Gene Diversity of the ABO and Rh (D) Loci in the Mexican Population. *Biomed Research International*, 1-11. doi:10.1155/2018/1925619
7. Cortés Buelvas, A. (2012). 6º ciclo internacional de conferencias de la calidad. *Importancia de la Serotipificación Completa en Donantes*, (págs. 1-37). México.
8. Cotorruelo C, Biondi C, Racca L, Borrás SG, Racca A. Duffy genotyping facilitates transfusion therapy. *ClinExp Med*2009;9:249-51.
9. Daniels G, Castilho L, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, Lomas-Francis C, Moulds JM, Moulds J, 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
10. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/>
11. Escamilla Guerrero G, Contreras Trujado EL, 2006. Cap. 6. Sistema ABO. En: *Medicina transfusional*, Radillo González A, 2da. ed. Ed. Prado. México DF, p.p. 97-98.

12. Fichou, Y., Le Maréchal, C., & Férec, C. (2017). Next-generation sequencing for blood group genotyping. *ISBT Science Series*, 12(1), 184-190. doi:10.1111/voxs.12311
13. Grispan, S. (1983) Grupos sanguíneos ABO Y RH. *Rev. Medica Hondur.* vol. 51, 103-114.
14. Hyland, C. A. (2013). The challenge and paradox in serology RhD typing for blood donors and patients. *Blood Transfus*, 4-5.
15. Kulkarni, S., Kasiviswanathan, V., & Ghosh, K. (2013). A simple diagnostic strategy for RhD typing in discrepant cases in the Indian population. *Blood Transfus*, 37-42.
16. Lambertino, J. R., & Villegas, S. M. (2014). Aloinmunización Rh en mujeres gestantes, una mirada al diagnóstico y a su aproximación terapéutica. *Ginecología y Obstetricia de México*, 82(11), 744-754.
17. Le Van Kim, Collin Yves, Cartron Jean-Pierre. 2005. Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Reviews* 2005; 20:93-110.
18. Linares Ramirez, V. (2014). HEMOVIGILANCIA: REACCIONES ADVERSAS A LA TRANSFUSION EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
19. Lögdberg L, Reid ME, Lamont RE, Zelinski T. 2005 Human blood group genes 2004: chromosomal locations and cloning strategies. *Transf Med Rev* 19:45-57.
20. Prisco Arnoni, C., Moreira Latini, F. R., Guilhem Muniz, J., Gazito, D., de Medeiros Person, R., de Paula Vendrame, T. A., Castilho, L. (2014). How do we identify RHD variants using a practical molecular approach? *TRANSFUSION*, 54, 962-969.
21. Race RR y Sanger R. 1975. Los Grupos sanguíneos humanos. Ed. La Prensa Médica Mexicana 2ª. Edición, México DF, pp. 170-1.
22. Reid ME and Lomas-Francis C. The Blood Group Antigen Facts Book. Second ed. 2004, New York: Elsevier Academic Press.
23. Reid, M. E. (2010). Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 171-177.
24. Reid, M. E., & Denomme, G. A. (2011). DNA-Based Methods in the Immunohematology Reference Laboratory. *Transfus Apher Sci.*, 44(1), 65–72.

25. Rosenfeld-Mann, F., 2009. *Determinación de la cigocidad del gen RHD*. Tesis de doctorado no publicada. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
26. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York. Cold Spring Harbor. 1989;9.14-9.19.
27. Scott M.L. 2004. The complexities of the Rh system. *Vox Sang*; 87:58-62.
28. Vengelen-Tyler V, 2005. *Technical Manual of American Association of Blood Banks*. 2005 15 Ed. Washington DC, Chap 14. pp.315-333.
29. Wagner FF y Flegel WA. 2000 RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*:95 (12):3662-8.
30. Wagner et al BMC 2003. *Genet*; 4: 14)
31. Westhoff CM. 2007a. The Structure and Function of the Rh antigen Complex. *Semin Hematol* 44(1):42-50.
32. Westhoff, C. M., & Sloan, S. R. (2008). Molecular Genotyping in Transfusion Medicine. *Clinical Chemistry*, 54(12), 1948–1950.

## ANEXOS.

### Anexo 1.- Inserto kit comercial Genomic DNA Mini Kit (tissue) IBI SCIENTIFIC®

#### Genomic DNA Mini Kit (Tissue)

*For research use only*

**Sample:** up to 30 mg of tissue (tailsnips, liver, kidney, brain, adipose tissue, earpunches, insects etc.)

**Yield:** 10-20 µg (0.5 cm of mouse tail, 20 mg of mouse liver), 20-50 µg (20 mg of mouse kidney)

**Format:** spin column

**Time:** within 30 minutes

**Elution volume:** 30-200 µl

**Storage:** dry at room temperature (15-25°C)



#### Introduction

The Genomic DNA Mini Kit (Tissue) was designed specifically for purifying total DNA (including genomic, mitochondrial and viral DNA) from a variety of tissue and insect samples. The provided micropestle can efficiently homogenize tissue samples to shorten the time in the Lysis Step. Proteinase K and chaotropic salt are used to lyse cells and degrade protein, allowing DNA to be easily bound by the glass fiber matrix of the spin column. Once any contaminants have been removed, using a Wash Buffer (containing ethanol), the purified DNA is eluted by a low salt Elution Buffer, TE or water. The entire procedure can be completed without phenol/chloroform extraction or alcohol precipitation. The purified DNA (approximately 20-30 kb) is suitable for use in PCR or other enzymatic reactions.

#### Quality Control

The quality of the Genomic DNA Mini Kit (Tissue) is tested on a lot-to-lot basis by isolating genomic DNA from a 20 mg mouse liver sample. The purified DNA (more than 10 µg with an A260/A280 ratio of 1.8-2.0) is quantified with a spectrophotometer and analyzed by electrophoresis.

#### Kit Contents

Component	IB47220	IB47221	IB47222
GT Buffer	3 ml	30 ml	75 ml
GBT Buffer	4 ml	40 ml	75 ml
W1 Buffer	2 ml	45 ml	130 ml
Wash Buffer* (Add Ethanol)	1 ml (4 ml)	25 ml (100 ml)	50 ml (200 ml)
Proteinase K** (Add ddH <sub>2</sub> O)	1 mg (0.1 ml)	11 mg (1.1 ml)	65 mg (6.5 ml)
Elution Buffer	1 ml	30 ml	75 ml
GS Columns	4	50	300
2 ml Collection Tubes	8	100	600
Micropestle	4	50	300

#### Order Information

Genomic DNA Extraction		
Product	Package Size	Cat. Number
Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell)	100/300 preps	IB47201/202
Genomic DNA Mini Kit (Tissue)	50/300 preps	IB47221/222
gMAX Mini Kit (Blood/Tissue)	100/300 preps	IB47281/282
Genomic DNA Mini Kit (Plant)	100 preps	IB47230
gSWAB Mini Genomic DNA Kit	100/300 preps	IB47276/277
gBAC Mini DNA Bacteria Kit	100/300 preps	IB47291/292
gYEAST Genomic DNA Kit	100/300 preps	IB47266/267
96 Well Blood Genomic DNA Extraction Kit	4/10 x 96 preps	IB47251/252
gPURE Cell DNA Isolation Kit	100/1000 rxns	IB47431/432

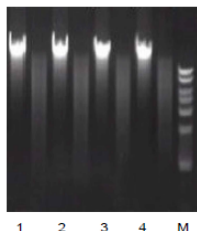
\*Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to the Wash Buffer prior to initial use

\*\*Add ddH<sub>2</sub>O (see the bottle label for volume) to prepare Proteinase K (vortex to dissolve and spin down) and store at 4°C

#### Caution

GBT Buffer contains guanidine hydrochloride. During operation, always wear a lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

#### Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Functional Test Data



**Figure 1.** Genomic DNA from a variety of tissue samples was extracted using the Genomic DNA Mini Kit (Tissue). The purified genomic DNA (30-40 kb) was *Eco*RI digested and analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel.

1 = Mouse Liver  
2 = Mouse Tail  
3 = Fish Muscle  
4 = Fruit Fly (*Drosophila*)  
M = Geneaid 1 Kb DNA Ladder



## Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Protocol

### IMPORTANT BEFORE USE

- Add ddH<sub>2</sub>O (see the bottle label for volume) to prepare Proteinase K (vortex to dissolve and spin down) and store at 4°C
- Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to the Wash Buffer prior to initial use
- Additional requirements: microcentrifuge tubes, absolute ethanol, (optional) RNase A (10 mg/ml), ddH<sub>2</sub>O

Tissue Dissociation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cut up to 30 mg of animal tissue (or 0.5 cm of mouse tail) then transfer it to a 1.5 ml microcentrifuge tube.</li> </ul> <p>NOTE: If tissue has a higher number of cells (e.g. spleen or liver), reduce the starting material to 10 mg.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Use the provided <b>Micropestle</b> to grind the tissue to a pulp.</li> <li>• Add 200 µl of <b>GT Buffer</b> to the tube and homogenize the sample tissue by grinding.</li> <li>• Add 20 µl of <b>Proteinase K</b> to the sample mixture then shake vigorously and incubate at 60°C for 30 minutes.</li> </ul> <p>NOTE: During incubation, invert the tube every 5 minutes.</p>
Step 1 Lysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add 200 µl of <b>GBT Buffer</b> then shake vigorously for 5 seconds.</li> <li>• Incubate at 60°C for at least 20 minutes to ensure the lysate is clear.</li> </ul> <p>NOTE: During incubation, invert the tube every 5 minutes. If insoluble material is present following incubation, centrifuge for 2 minutes at 14-16,000 x g then transfer the supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube.</p> <p>At this time, preheat the required <b>Elution Buffer</b> (200 µl per sample) to 60°C (for Step 4 DNA Elution).</p> <p><b>Optional Step: RNA Degradation</b> (If RNA free gDNA is required, perform this optional step)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Following 60°C incubation, add 4 µl of <b>RNase A</b> (10 mg/ml) to the sample lysate then shake vigorously.</li> <li>• Incubate at room temperature for 5 minutes.</li> </ul>
Step 2 DNA Binding	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add 200 µl of <b>absolute ethanol</b> to the lysate then immediately shake vigorously for 10 seconds.</li> </ul> <p>NOTE: If precipitate appears, break it up as much as possible with a pipette.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Place a <b>GS Column</b> in a <b>2 ml Collection Tube</b>.</li> <li>• Transfer the mixture (including any precipitate) to the <b>GS Column</b> then centrifuge at 14-16,000 x g for 2 minutes.</li> <li>• Discard the <b>2 ml Collection Tube</b> then transfer the <b>GS Column</b> to a new <b>2 ml Collection Tube</b>.</li> </ul>
Step 3 Wash	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Add 400 µl of <b>W1 Buffer</b> to the <b>GS Column</b> then centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds.</li> <li>• Discard the flow-through then place the <b>GS Column</b> back in the <b>2 ml Collection Tube</b>.</li> <li>• Add 600 µl of <b>Wash Buffer</b> (make sure ethanol was added) to the <b>GS Column</b>.</li> <li>• Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds.</li> <li>• Discard the flow-through then place the <b>GS Column</b> back in the <b>2 ml Collection Tube</b>.</li> <li>• Centrifuge for 3 minutes at 14-16,000 x g to dry the column matrix.</li> </ul>
Step 4 DNA Elution	<p>Standard elution volume is 100 µl. If less sample is to be used, reduce the elution volume (30-50 µl) to increase DNA concentration. If higher DNA yield is required, repeat the DNA Elution step to increase DNA recovery and the total elution volume to approx. 200 µl.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Transfer the dried <b>GS Column</b> to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.</li> <li>• Add 100 µl of <b>pre-heated Elution Buffer</b> or <b>TE</b> to the <b>CENTER</b> of the column matrix.</li> <li>• Let stand for at least 5 minutes to ensure the <b>Elution Buffer</b> or <b>TE</b> is completely absorbed.</li> <li>• Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds to elute the purified DNA.</li> </ul>

## Troubleshooting

Problem	Possible Reasons/Solution
Clogged Column	<p>Too much tissue was used</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• If using more than 30 mg of tissue, separate into multiple tubes.</li> </ul> <p>Sample tissue was not lysed completely</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Add additional Proteinase K and extend the incubation time in the Lysis Step.</li> <li>• Following the Lysis Step, centrifuge for 2 minutes at 14-16,000 x g to remove sample debris. Transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube and proceed with the DNA Binding Step.</li> </ul>
	<p>Precipitate was formed at DNA Binding step</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce the sample material.</li> <li>• Following ethanol addition, break up any precipitate as much as possible prior to loading GS Column.</li> </ul>
Low Yield	<p>Sample tissue was not lysed completely</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Add additional Proteinase K and extend the incubation time in the Lysis Step.</li> </ul> <p>Column was clogged at DNA Binding step</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Following the Lysis Step, remove the insoluble debris by centrifugation.</li> <li>• Prior to loading the column, break up the precipitate in the ethanol-added lysate.</li> </ul>
	<p>Incorrect DNA Elution Step</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ensure that the Elution Buffer or TE is added to the center of the GS Column matrix and is absorbed completely.</li> </ul>
	<p>Incomplete DNA elution</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Elute twice to increase the DNA recovery.</li> </ul>
Eluted DNA does not perform well in downstream applications	<p>Residual ethanol contamination</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Following the Wash Step, dry the GS Column by centrifuge at 14-16,000 x g or incubate at 60°C for 5 minutes.</li> </ul> <p>RNA/Protein contamination</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Perform optional RNA Degradation step/reduce the sample amount.</li> </ul> <p>Genomic DNA was degraded</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Use fresh samples or freeze fresh samples in liquid nitrogen immediately and store at -80°C.</li> </ul>

**Anexo 2.- Tabla de resultados de fenotipificación por aglutinación en tubo.**

Fenotipos Eritrocitarios Rh-Hr de Donadores de sangre Rh negativos								
No.	ID muestra	D	C	c	E	e	Fenotipo	Genotipo
1	71614746	-	-	4+	-	2+	ccdee	cde/cde
2	N9115171	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
3	71614809	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
4	71614666	-	-	3+	-	3+	ccdee	cde/cde
5	P9175634	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
6	71615186	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
7	1614587	-	-	3+	-	2+	ccdee	cde/cde
8	71615018	-	-	2+	-	2+	ccdee	cde/cde
9	C9175550	-	2+	4+	-	3+	Ccdee	Cde/cde
10	71614824	-	-	2+	-	2+	ccdee	cde/cde
11	71614814	-	-	2+	-	2+	ccdee	cde/cde
12	71614942	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
13	71615049	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
14	71614766	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
15	C9174262	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
16	N9115195	-	4+	4+	-	3+	Ccdee	Cde/cde
17	N9119450	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
18	P9119403	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
19	AF0626245	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
20	71615181	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
21	P9115204	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
22	71614956	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
23	D9119349	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
24	C9175625	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
25	D9115271	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
26	P9115263	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
27	P9175630	-	3+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
28	P9119335	-	-	4+	3+	4+	ccdEe	cde/cde
29	D9115240	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
30	C9174266	-	4+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
31	P9119410	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
32	D9115332	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
33	E9175502	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
34	P9115262	-	-	4+	4+	3+	ccdEe	cdE/cde
35	E9115201	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
36	E9175549	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
37	C9175005	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
38	C9175629	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
39	P9175007	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
40	C9175004	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde

41	D9115172	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
42	71704693	-	+	4+	+	4+	CcdEe	CdE/cde
43	71704703	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
44	71704670	-	4+	4+	+	4+	CcdEe	CdE/cde
45	71704683	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
46	71704659	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
47	71704661	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
48	71704547	-	+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
49	401681	-	+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
50	71704543	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
51	1702	-	+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
52	1704	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
53	2286	-	+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
54	1749	-	3+	4+	-	4+	Ccdee	Cde/cde
55	2285	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
56	71704452	-	-	4+	4+	4+	ccdEe	cdE/cde
57	71702705	-	-	4+	-	3+	ccdee	cde/cde
58	1751	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde
59	1753	-	-	4+	-	4+	ccdee	cde/cde

**Anexo 3.-** Tabla de absorbancia y cuantificación de ADN

<b>Cuantificación de ADN en muestras de donadores Rh negativos</b>		
<b>Muestra</b>	<b>260/280</b>	<b>concentration(ng/ul)</b>
1614587	1.56	173.2
P9175634	1.58	93.7
2285	1.54	93.3
1614597	1.57	82
1614587	1.54	78.2
71615207	1.53	75.4
C9175004	1.31	70.5
71704661	1.64	66.5
E9175549	1.5	65.3
P9175007	1.57	63.9
N9115171	1.59	56
D9115240	1.7	55.7
71614761	1.67	53.9
71615135	1.61	53.6
71614956	1.68	51.6
C9174266	1.54	49.9
71614746	1.67	48.8
71614944	1.68	47.6
C9175550	1.63	46.8
71614814	1.61	46.6
AF0626245	1.68	44.4
71704693	1.75	37
71704452	1.75	36.6
E9175502	1.62	36.2
71704703	1.76	35.5
71614766	1.8	35.4
71614760	1.8	35.2
71614824	1.43	34.7
71614666	1.66	34.6
71615186	1.74	34.4
71615049	1.65	34.4
N9115195	1.63	33.6
71704659	1.77	31.8
C9175629	1.45	30.9
D9119349	1.77	30.7
71704670	1.78	30.6
71614746	1.7	29.8
71615181	1.61	29.2
N9119450	1.35	28.8
C9175005	1.73	28.6
P9175615	1.74	27.5
71614809	1.7	26
71614666	1.7	25.7
71704547	1.77	23.9

D9115332	1.7	22.8
71615018	1.65	22.7
P9119403	1.81	22.7
P9119410	1.74	21.7
71704683	1.84	21.3
P9115204	1.72	21.1
401681	1.47	20.9
1704	1.62	20.1
71702705	1.79	20
71702705	1.79	19.7
P9175630	1.78	17.3
C9175625	1.84	16.7
1749	2.11	16.5
P9115262	1.84	15.2
C9174262	1.93	15.1
P9115203	1.81	12.7
2286	1.87	8.5
71614942	1.41	5.5
71615018	8	1.1