

Nuevas fronteras en el conocimiento de la complejidad del Sistema Rh



Lilian Castilho, PhD

VI CONGRESO del GRUPO COOPERATIVO de
MEDICINA TRANSFUSIONAL – G-CIAMT
Lima, 6 a 11/06/2009

Sistema Rh

□ *Sistema complejo*

- *50 antígenos*
- *muchos fenotipos*
- *mínimo 200 alelos*
- *un fenotipo puede generar varios genotipos*

□ *Principales antígenos*

- *D; C/c; E/e*
- *8 haplotipos: Dce(R₁), Ce(r'), DcE(R₂), cE(r''), Dce(R₀), ce(r), DCE(R_z), CE(r_y)*

Sistema Rh: Terminología

- ❑ *Rh*
- ❑ *Sistema ISBT: 004*
- ❑ *Símbolo ISBT: RH*
- ❑ *Fenotipo: D+C+E-c+e+*
RH: 1,2-3,4,5
Dce/ce ou Dce/dce = R₁r
- ❑ *Probable genotipo: DCE/ce, RH*1,2,5/RH*4,5*
ou R¹r

Preguntas frecuentemente realizadas

1. Por que RhD es tan inmunogénico?

Principal causa de la DHFR

40-75% de los D- tornan se aloimmunizados cuando expuestos a la hematíes D+

2. Por que el sistema Rh es tan complejo?

- Número elevado de antígenos

D, C/c, E/e (comunes)

~ otros 40

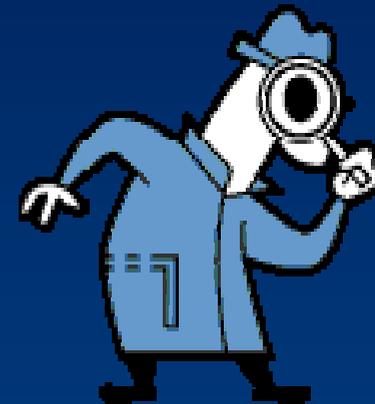
Variantes

- Diferencias en la expresión de D

D positivo o D negativo?

- D débil

- D parcial

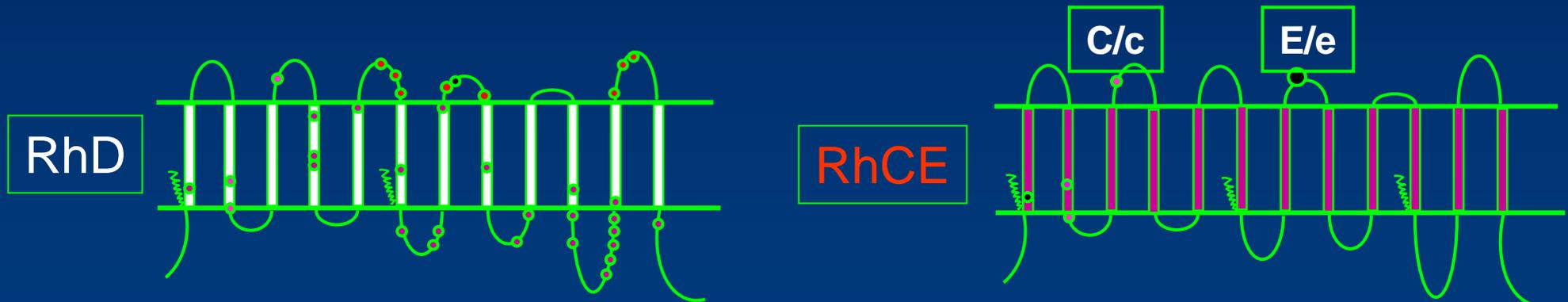


3. Por que grupos étnicos Africanos/ Hispánicos desarrollan anticuerpos RhD complicados?

Anti-D en D+, D débil

Locus RH

Duplicación de 2 Genes

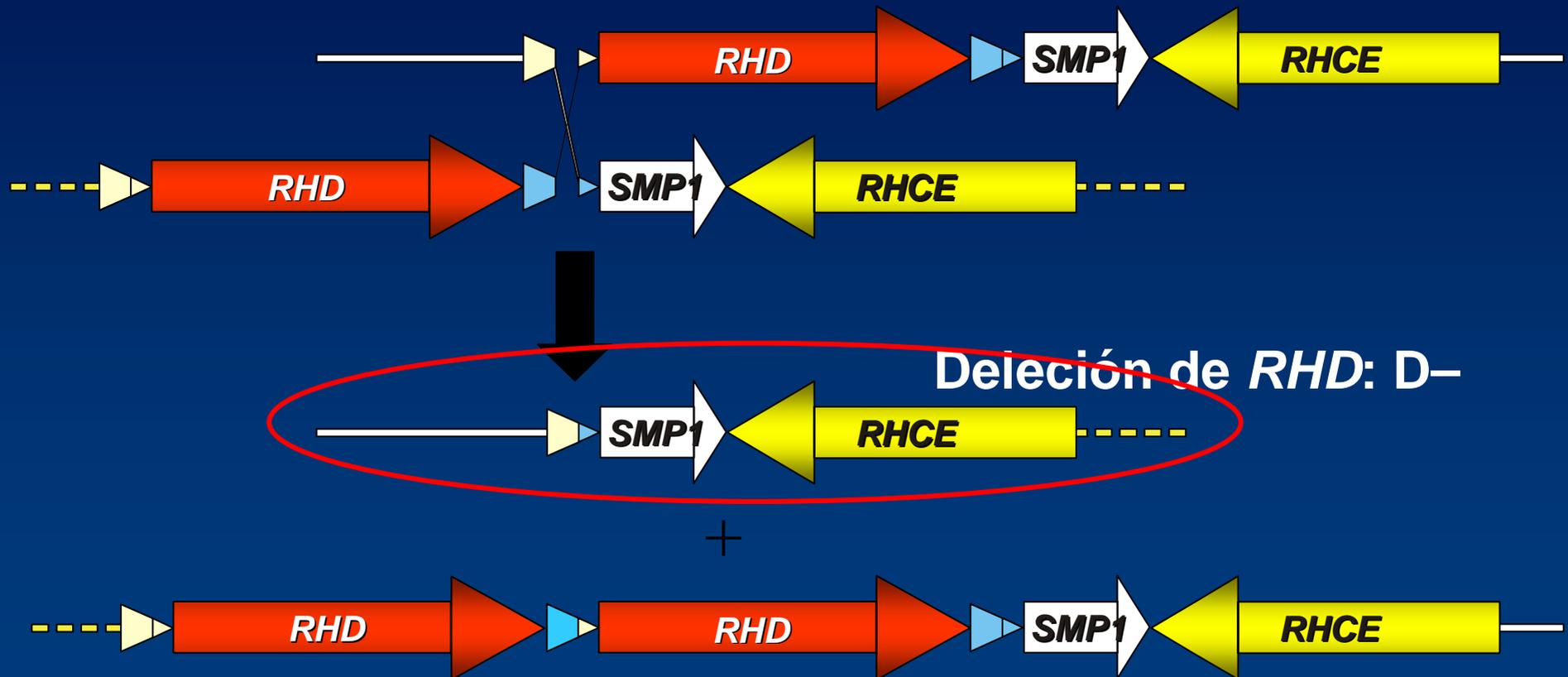


Círculos- representan 32-35 diferentes amino ácidos entre RhD y RhCE

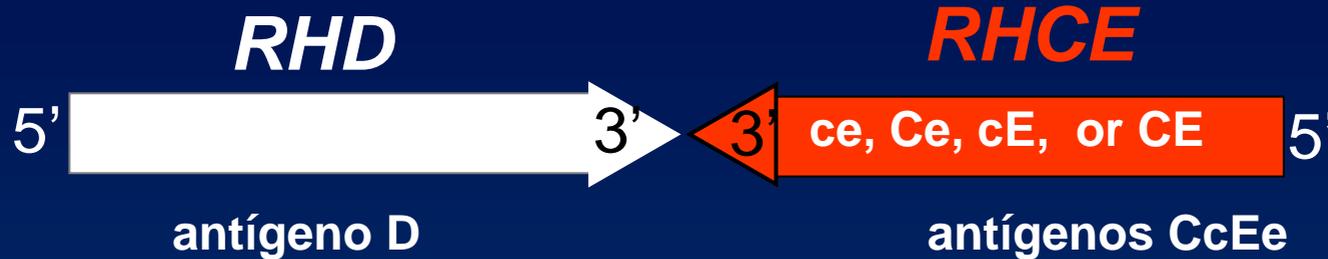
1. Esa diferencia explica por que RhD es tan inmunogénico
Mayoría de los antígenos de grupos sanguíneos difieren en u (o pocos) aa

RhD+ y RhD-

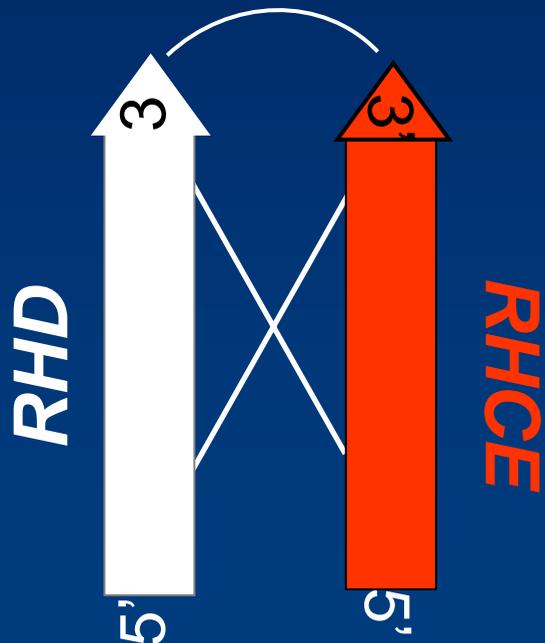
Delección *RHD* ocurrió por crossing over desigual



2. Por que el sistema Rh es tan complejo ?



- **Localización en el cromosoma** - genes mucho próximos
- **Orientación** – final 3' cara a cara un con otro



Durante la replicación cromosómica

formación de hair-pins
cambios ocurren

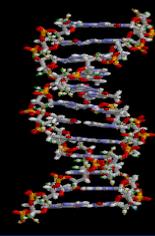
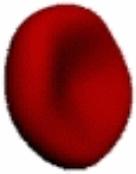
- un actúa como template para la porción do otro

“Conversión génica”

Principal causa para la diversidad RH



Adición (es) de nucleótidos puede alterar la expresión del antígeno

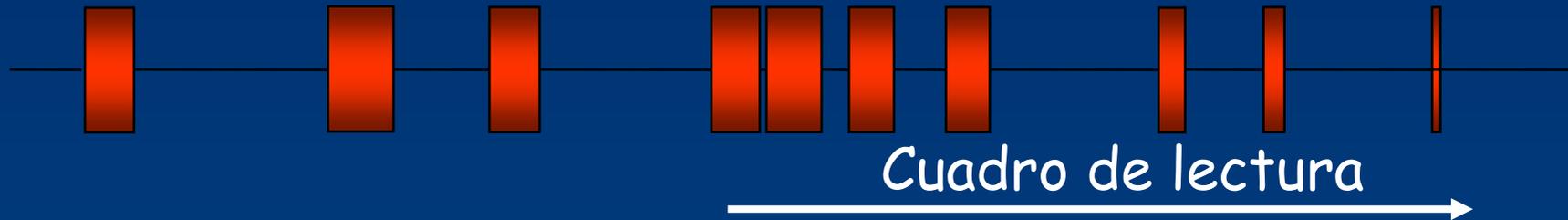


RHD Ψ

3 mutaciones missenses en el exon 5
M218I, F223V, S225F

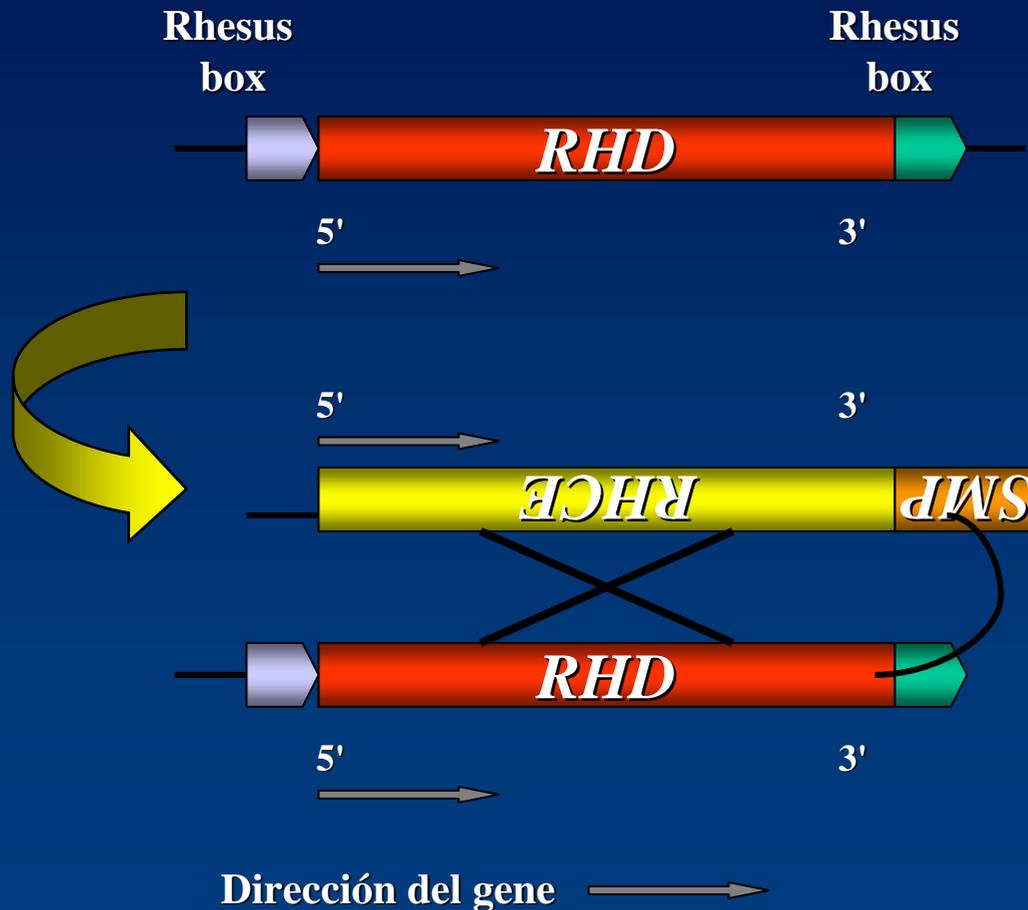
Inserción de 37 bp en la
unión intron 3/exon 4

Stop codon prematuro
en el nt 269



Ningún transcrito detectado;
Ninguna RhD en la superficie de las hematíes

Variantes del antígeno D pueden ser generadas por cambios de DNA entre genes similares



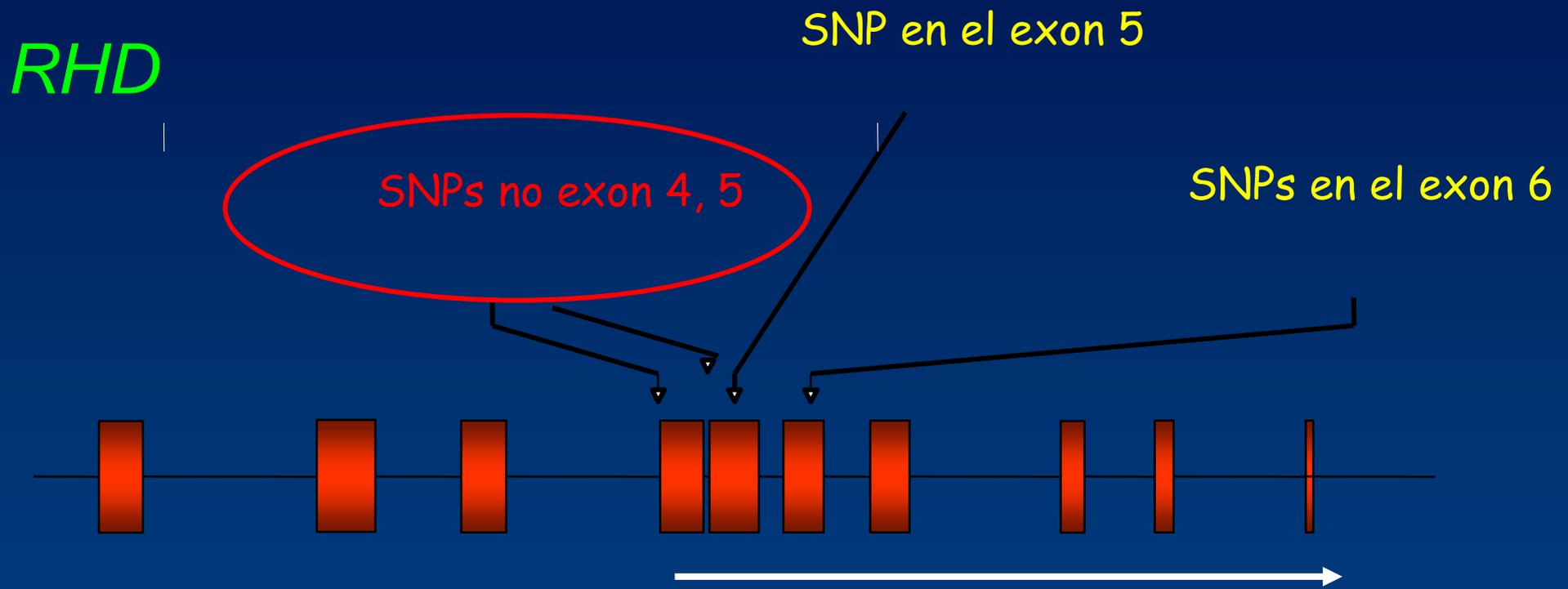
Conversión génica

D parcial (D^{IVb} , D^{VI} , DBT)

Fenotipos D- -, Dc-, r'^s

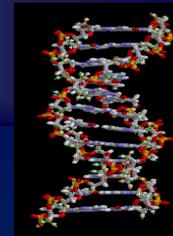
Antígenos de baja incidencia

SNP pueden generar variantes del antígeno D y nuevos antígenos



Alteran epítopes y la expresión del antígeno RhD en la superficie de las hematías

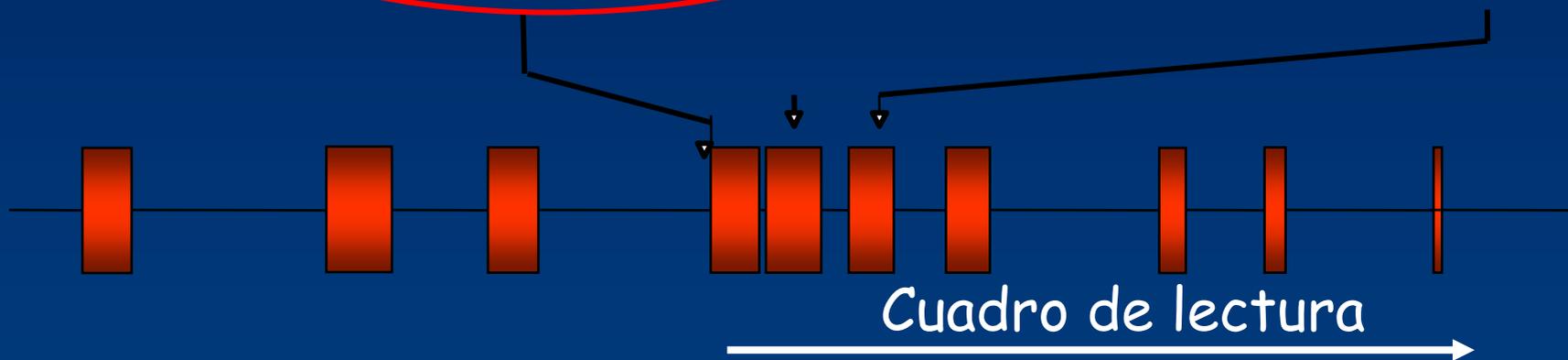
Delección (es) de nucleótidos puede alterar la expresión del antígeno



Del
RhD-neg

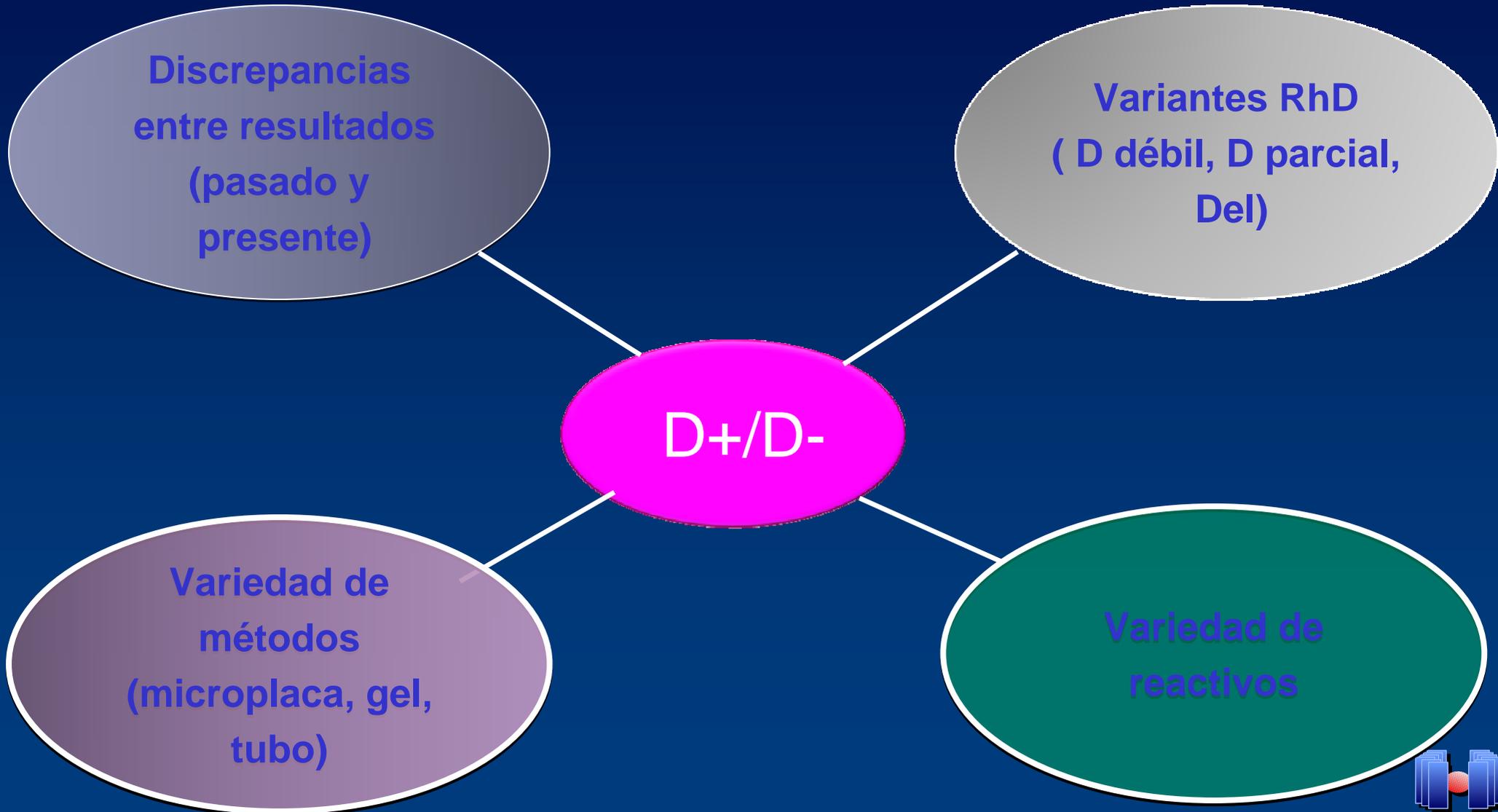
Delección en
Exons y sitios de splice

Stop codon prematuro



Ningun transcrito detectado;
Débil expresión RhD en la superficie de las hematíes

Problemas en la tipaje RhD



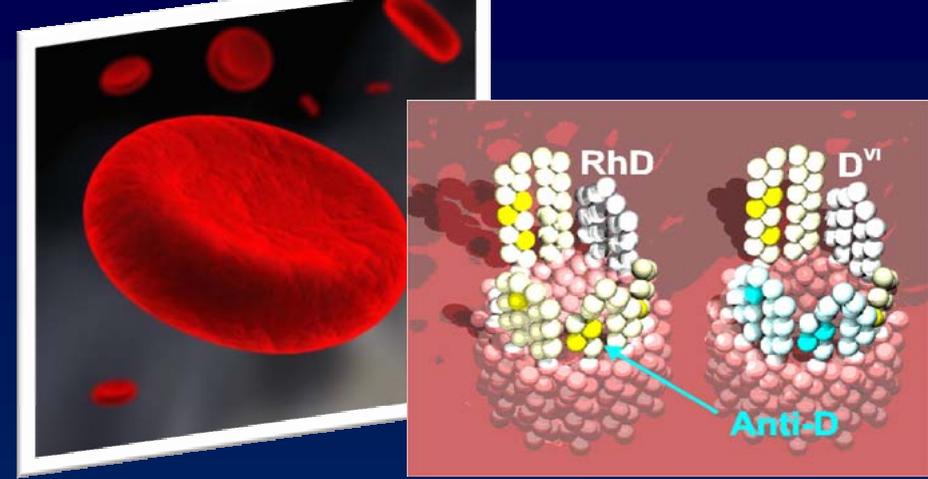
Diferencias en la expresión de RhD

D-negativo - 15-17% Europeos - debido a delección *RHD*
3-7% Africanos, 0.5-1% Asiáticos – debido a mutaciones *RHD*

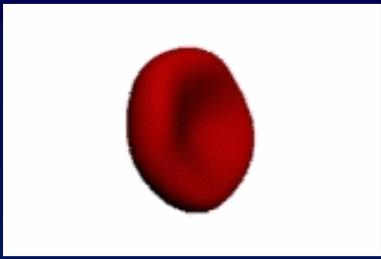
D-positivo – Mayoría tiene el gene *RHD* – **PERO HAY EXCEPCIONES**



Variantes RhD



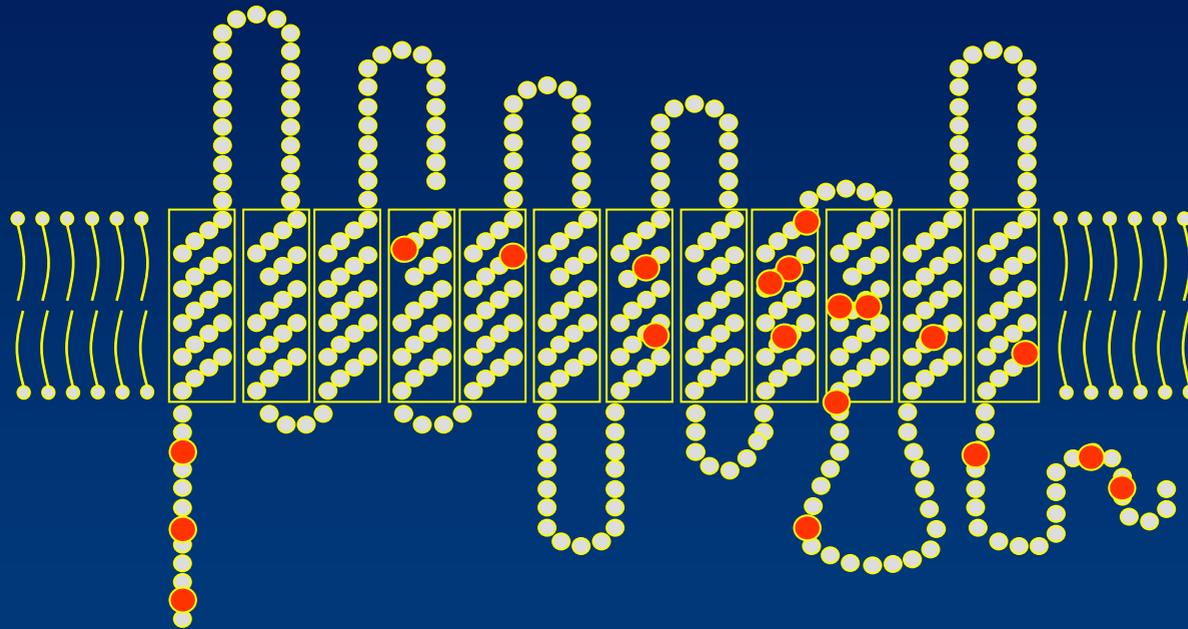
- ❑ D débil (presentan todos los epítopes de D, pero con variaciones en la expresión dependiendo del monoclonal)
- ❑ D parciales (pierden epítopes y reacciona con algunos monoclonales y no reacciona con otros)
- ❑ Del (expresión muy baja, detectado solamente por testes de adsorción y elución)



D débil



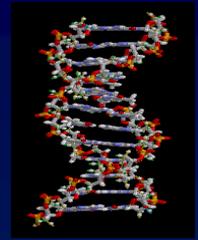
- mutaciones de único polimorfismo (SNP) en lo gene (72 tipos descritos)



- efecto en la cantidad de la proteína, pero no en los epítopes de D
generalmente no desarrollan anti-D

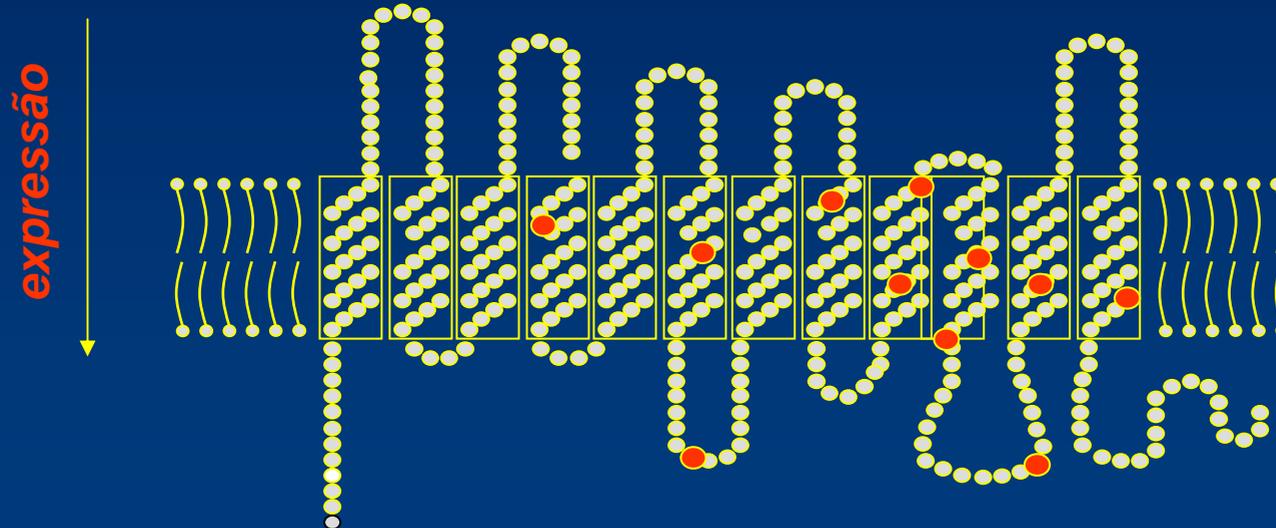


DEL



expresión muy débil del antígeno RhD : siempre fenotipado como D negativo (17 tipos descritos)

- detectado por elución
- mutaciones de único polimorfismo (SNP) en el gene
- mutaciones en sitios de splice
- impiden la integración con la membrana



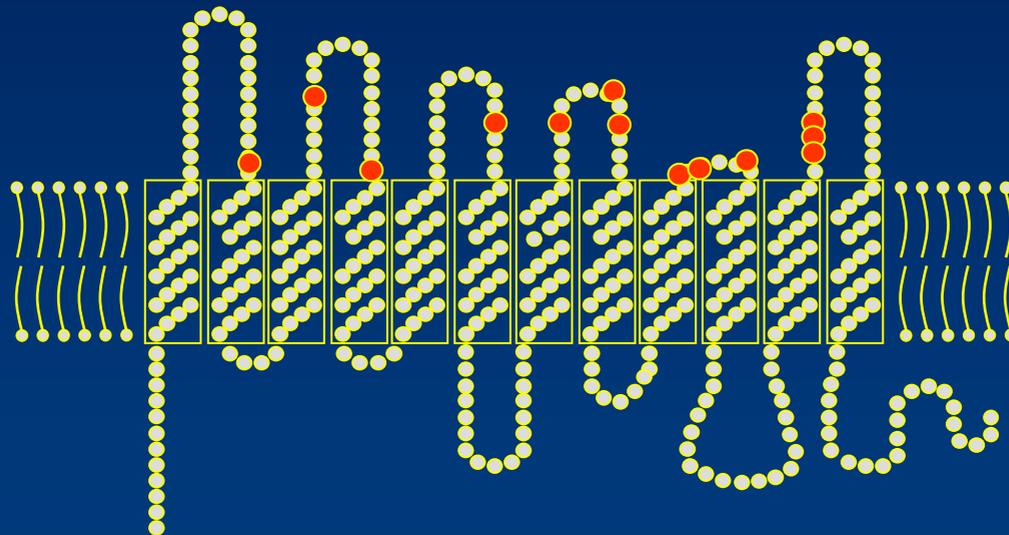
- *DEL RHD(K409K)* encontrado en los raros Asiáticos D negativos (1/3) y son generalmente C+



D Parcial

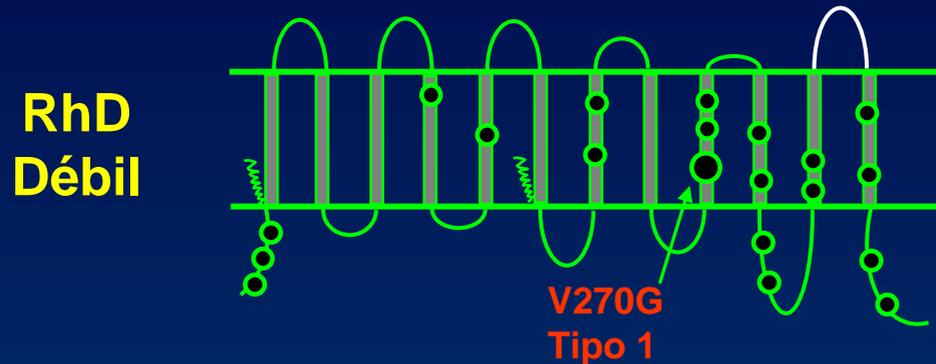


- **D categorías (31) y otros tipos de D parcial (57)**
 - SNPs- extracelular
 - O muchos genes híbridos- regiones del gene *RHD* cambiadas por *RHCE*



- nuevos antígenos y epítopes D alterados pueden desarrollar anti-D

Problemas debido a el D Débil y DEL



1. Algunos son difíciles de detectar con reactivos serológicos

Discrepancias en la tipaje: D- con un reactivo; D+ con otro

Se unidades de sangre de donantes son rotuladas como D- pueden estimular anti-D en receptores D-

Ejemplos: D Débil tipo 2

D Débil con *RHCE* en trans

DEL- ningún reactivo detecta

2. Algunos pacientes desarrollan anti-D

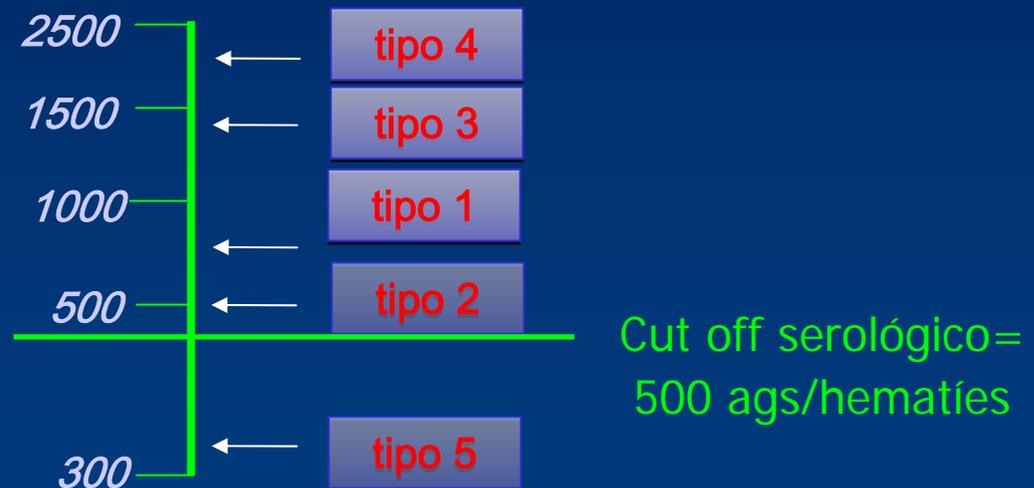
Preconizado - mayoría dos pacientes con D débil no desarrollan anti-D

- altera cantidad da proteína, pero no los epítopes D da superficie

- No es regla para todos los tipos de D débil – difícil de pre determinar

Proteína D Débil

- RhD: 10.000 a 25.000 sitios/hematíes
- D Débil: densidad antigénica varia de acuerdo con el tipo de D débil: 66 a 5.000 sitios/hematíes



D débil tipo 5: generalmente tipados como RhD-negativo

Proteína DEL

- RhD: 10.000 a 25.000 sitios/hematíes
- DEL: densidad antigénica: < 50 sitios/hematíes

Cut off serológico=500 ags/hematíes

DEL: generalmente tipados como RhD-negativo

DEL encontrado en los raros Asiáticos RhD-negativos y son C+ ou E+



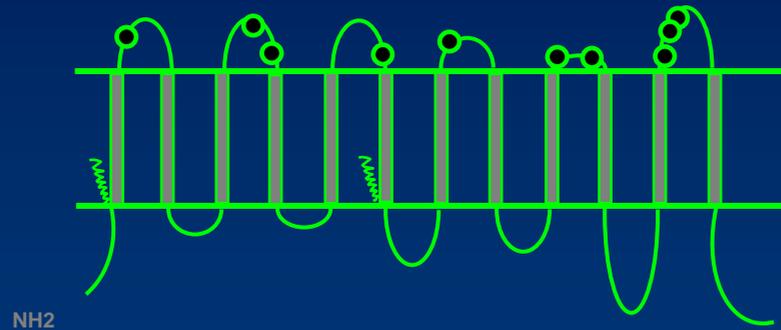
Gene *RHD* y donantes *DEL*-positivos entre donantes D-negativos

Fenotipo Rh	Nº Donantes	<i>RHD</i> Pos	<i>DEL</i> Pos
ccee	27.859	8	0
CcEe	1.241	44	23
ccEe	679	7	1
CCee	20	2	2
CcEe	19	0	0
ccEE	4	0	0
CCEe	1	0	0
Total	29.823	61	26

Problemas con D Parcial

Hematíes **D Parcial** reacciona como D+ y no son identificadas hasta que el paciente desarrolle anti-D

poseen epítopes de D alterados



- Debido a las **mutaciones localizadas en la region extracelular**

DMH- L54P

DFW- H166P

D^{HMi}- T283I

D^{II}- A354D

D^{VII}- L110P

DHR- R229K

DNU-G353R

DNB- G355S

- Debido a las **proteínas RhD/RhCE híbridas**

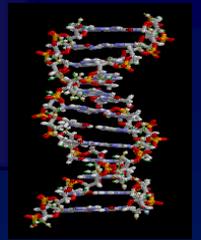
DIII DIV DV DVI DBT DAR DOL DAU etc.

Proteína D Parcial

- RhD: 10.000 a 25.000 sitios/hematíes
- D parcial: densidad antigénica: 500 a 25.000 sitios/hematíes

D Cat VI y DAR: pueden ser tipados como RhD-negativo

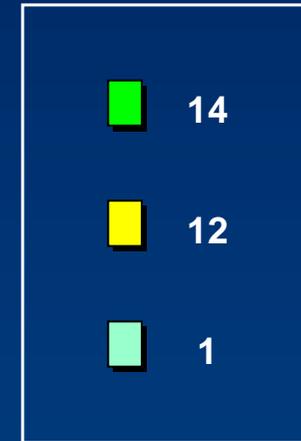
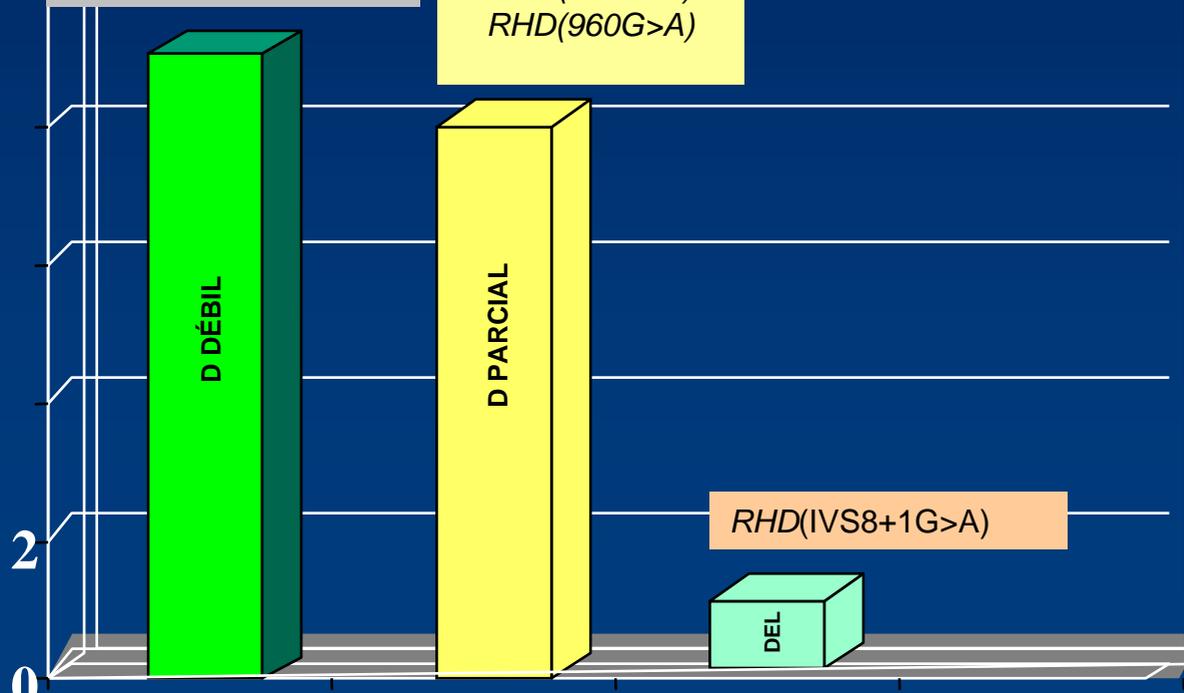
Nuevos Alelos RHD



RHD(L299G)
 RHD(A22E)
 RHD(L214F)
 RHD(G336R)
 RHDL383P)
 RHDdelF407W408)
 RHD(R10W)
 RHD(P221T)
 RHD(I253N)
 RHD(A294V)
 RHD(A23D)
 RHD(V306I)
 RHD(R10P)
 RHD(D404E)
 RHD(A414V)
 RHD(IVS3=3G>C)
 RHD(IVS4+5G>A)
 RHDIVS6-14DEL13)

2007-2008

RHD(A226P)
 RHD(S225F)
 RHD(L227P)
 RHD(H171Q)
 RHD(I288T)
 RHD(S284L)
 RHD(L207F)
 RHD(Q49R)
 RHD(G96S)
 RHD(S103P)
 RHD(165C>T)
 RHD(960G>A)



Flegel, 2008



Tipo de variante RhD correlaciona con el tipo de variante molecular

	Tipo de variante
Antígeno D	Alelo (tipo molecular)
D categoría	<i>RHD-CE-D</i> (alelos híbridos)
D parcial: Europeos	Cambio missense (1 aa) extracelular
D parcial: Africanos	Cambio missense (varios aa) extracelular
D débil	Cambio missense (1 aa) no extracelular
DEL	e. x. Mutaciones en sitios de splice
D negativo	Delección <i>RHD</i> Reordenación no funcional Mutaciones nonsense

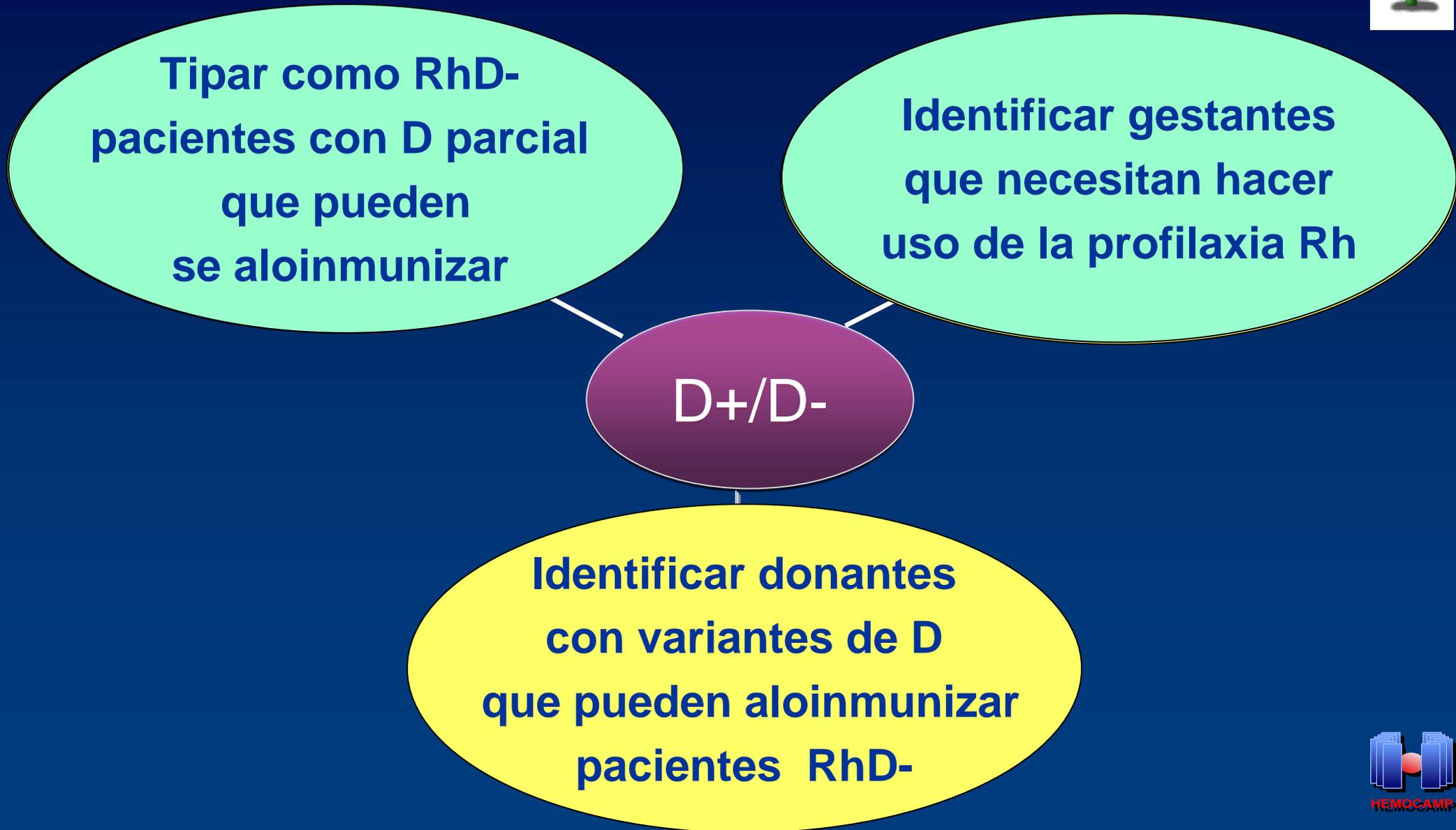
Distribución de los tipos de D débil en Europeos y Brasileños

D Fraco	Alemanha	Tyrol	Republica Checa	França	Espanha	Portugal	Brasil
Tipo 1	95 (60%)	43 (33%)	98 (58%)	30 (46%)	21 (49%)	15 (16%)	207 (46%)
Tipo 2	43 (27%)	10 (8%)	17 (10%)	21 (32%)	14 (33%)	63 (64%)	81 (18%)
Tipo 3	7 (4%)						
Tipo 4							
Outros							
Total							

D débil tipos 1-4 son los mas frecuentes: 94-96% Europa
91-99% Brasil

Importancia de la tipaje RhD

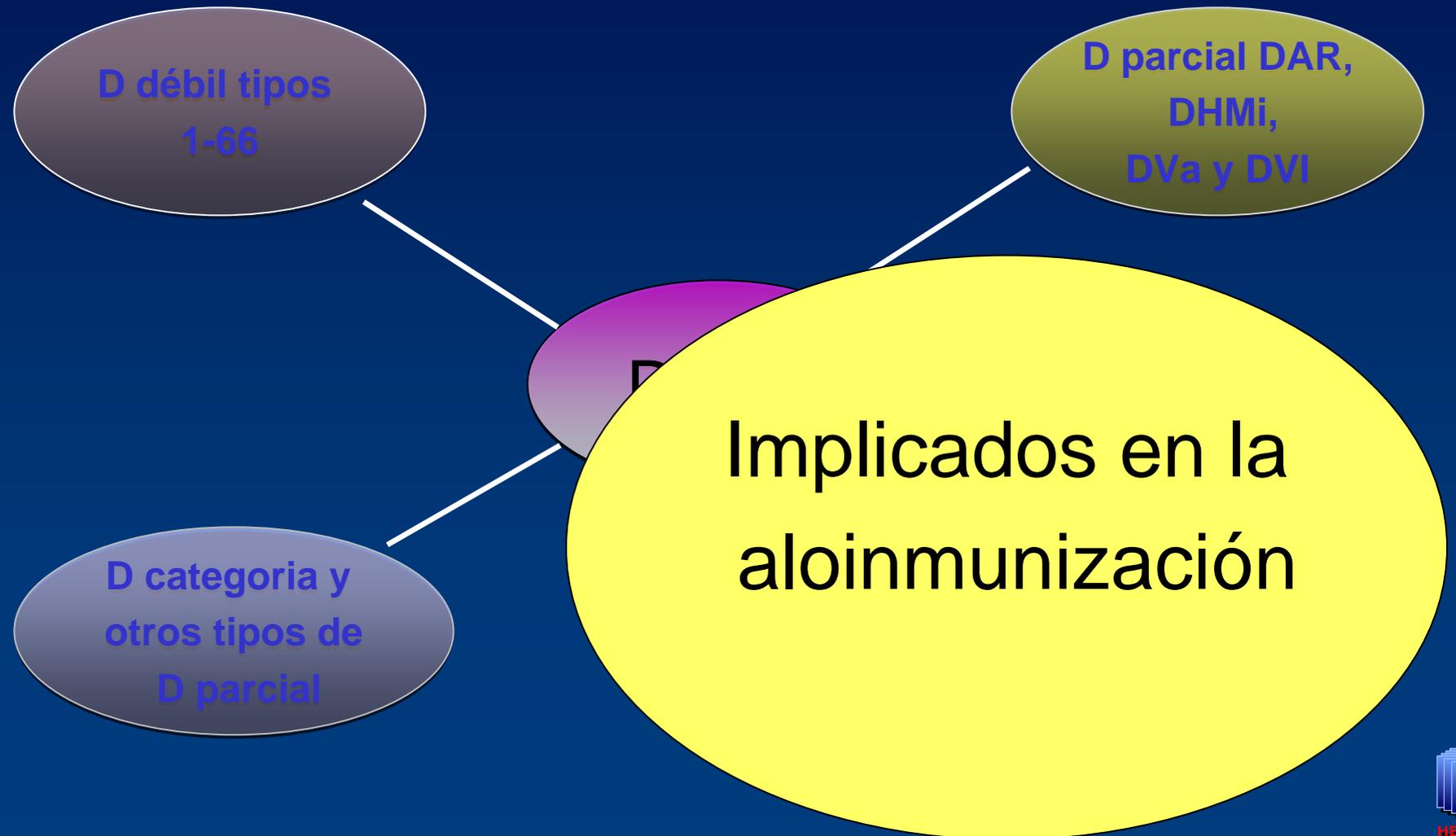
Antígeno D: positivo o negativo?



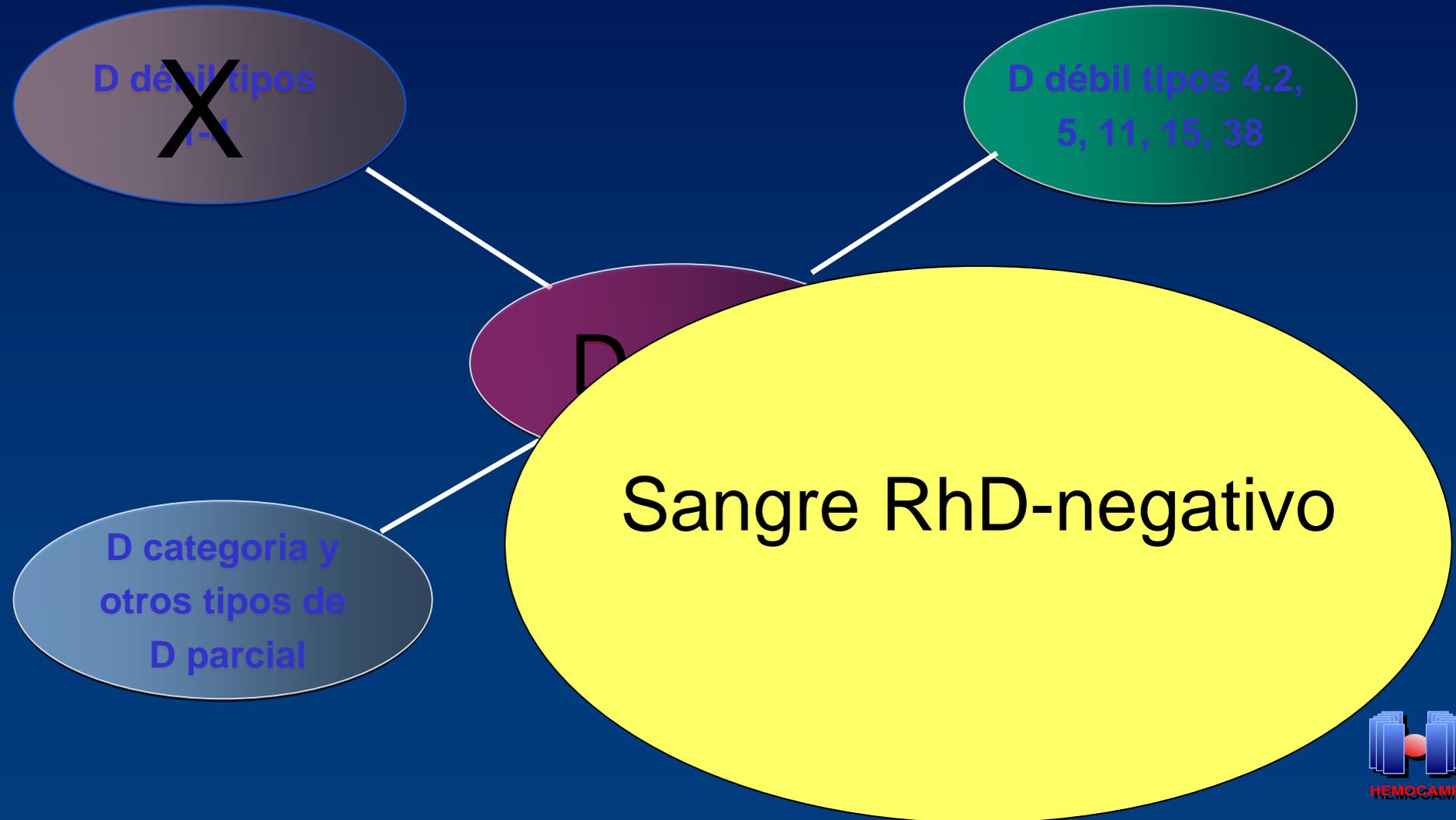
D débil, D parcial y nuevos alelos *RHD* en pacientes y gestantes



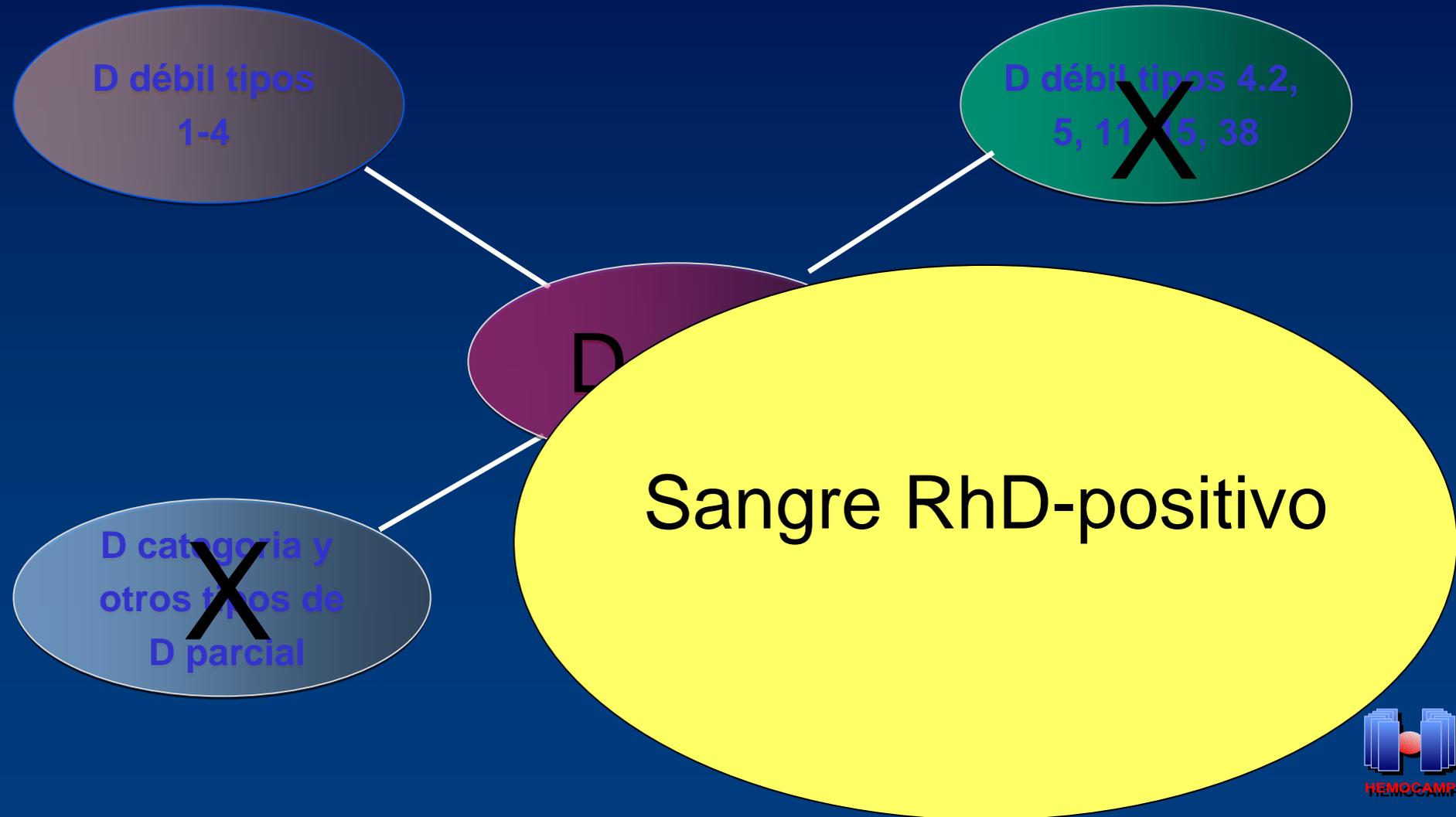
D débil, D parcial y nuevos alelos *RHD* en donantes de sangre



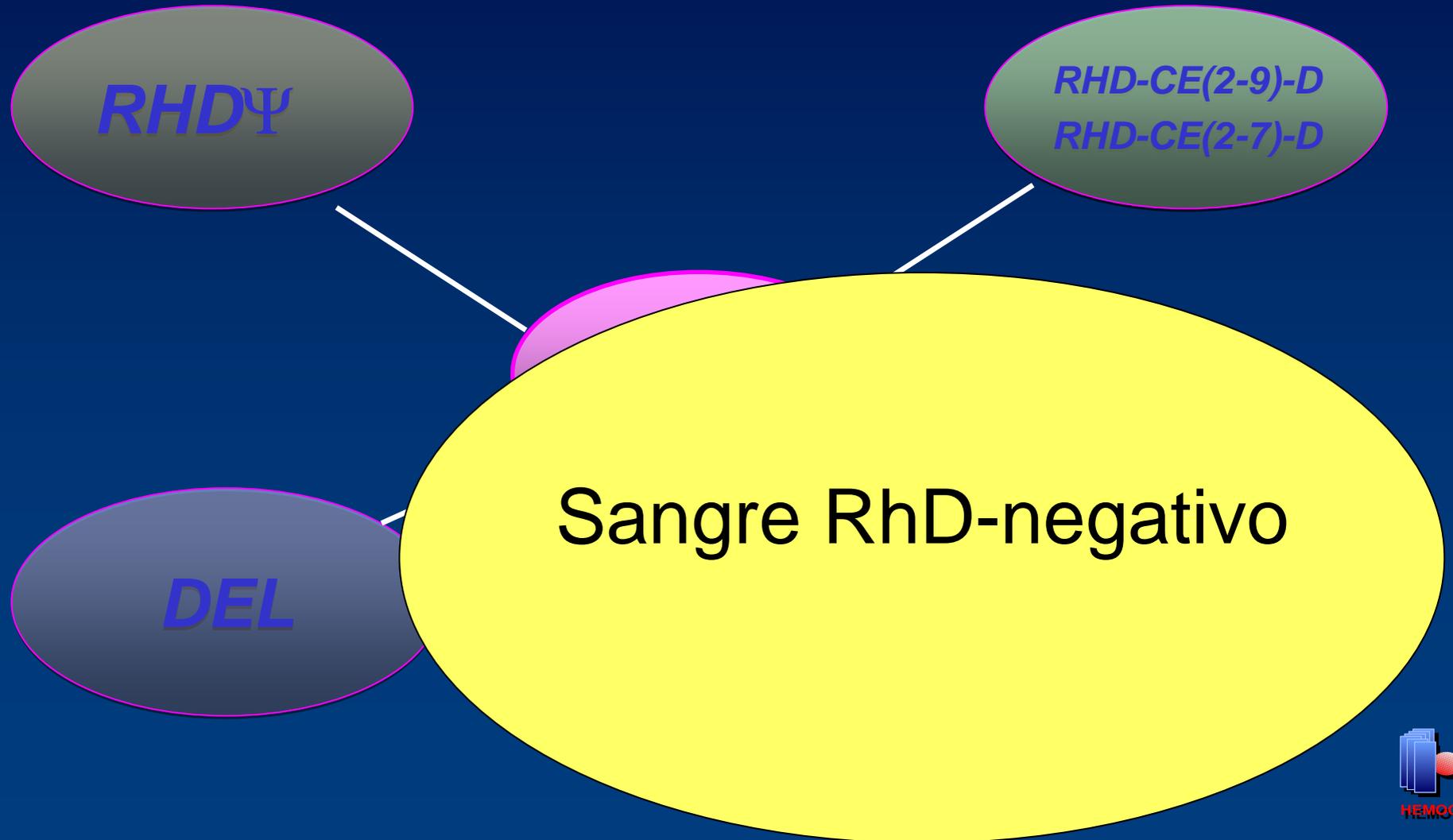
Transfusión de sangre en pacientes D débil y D parcial



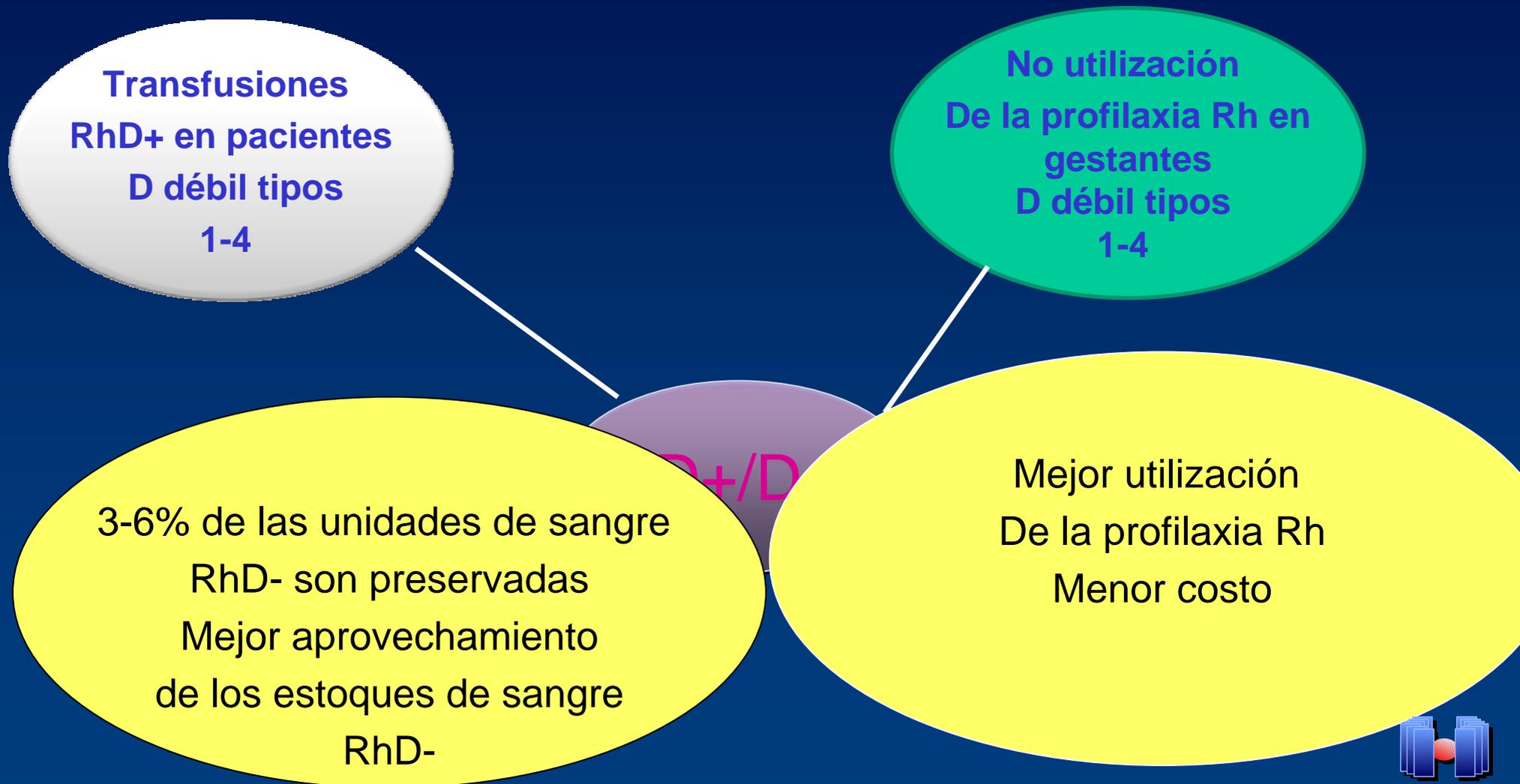
Transfusión de sangre en pacientes D débil y D parcial



Transfusión de sangre en pacientes fenotipados como D-negativo y genotipados como *RHD*⁺



Implicaciones clínicas en pacientes y gestantes



Implicaciones clínicas en donantes de sangre

Detec

**Aumento de la seguridad
transfusional**

**Reducción de la
aloimmunización**

anti-D,

Origen de los antígenos RhCE comunes

RHD

RHCE



D



ce

Prevalente en Africanos

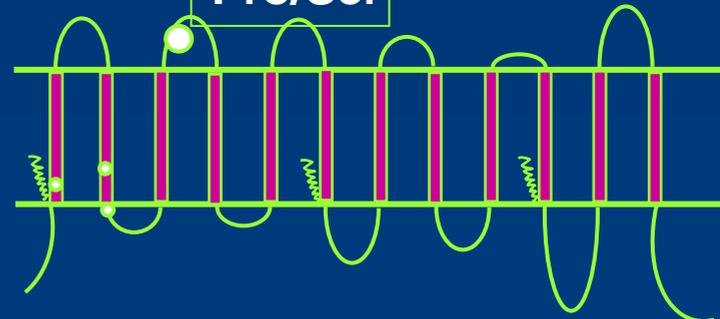
D-exon conversión

D



Ce

c/C
Pro/Ser



Origen de los antígenos RhCE comunes

RHD

RHCE

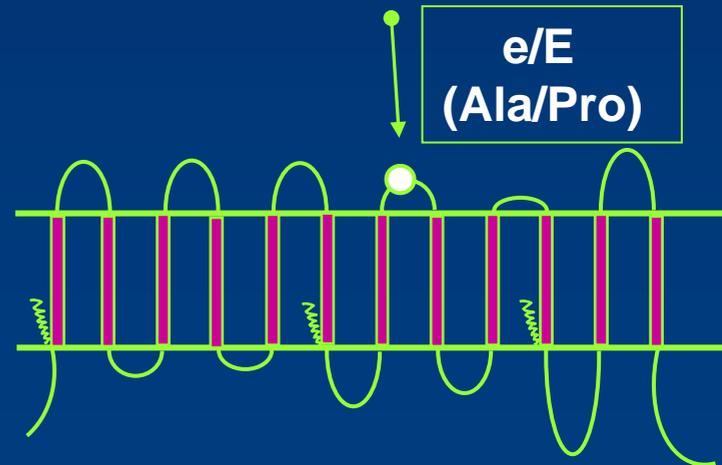


SNP



226P

e/E
(Ala/Pro)



Variantes *RHCE*

Problemas em la fenotipage del antígeno C

En Africanos, Hispánicos, y grupos étnicos mixtos con un gene híbrido *D-CE-D* específico



Fenotipo C positivo; **desarrolla anti-C**

Gene híbrido *D-CE-D* asociado a la variante e; **desarrolla anti-e**

Ese haplotipo RH es frecuente en pacientes falciformes
aproximadamente 22% Africanos

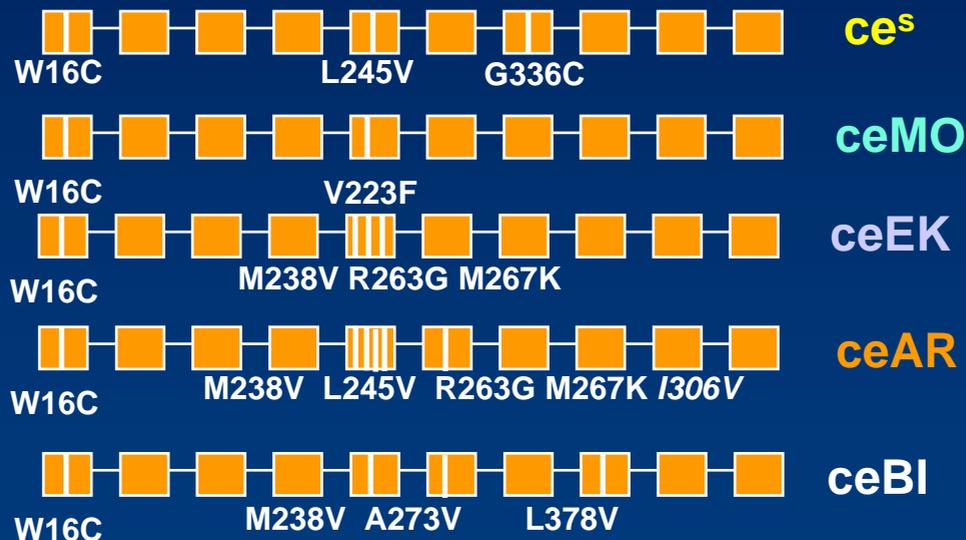
Variantes *RHCE*

Problemas en la fenotipage del antígeno e

En Africanos, Hispánicos, y grupos étnicos mixtos



Muchos genes diferentes, todos con expresión alterada del antígeno e



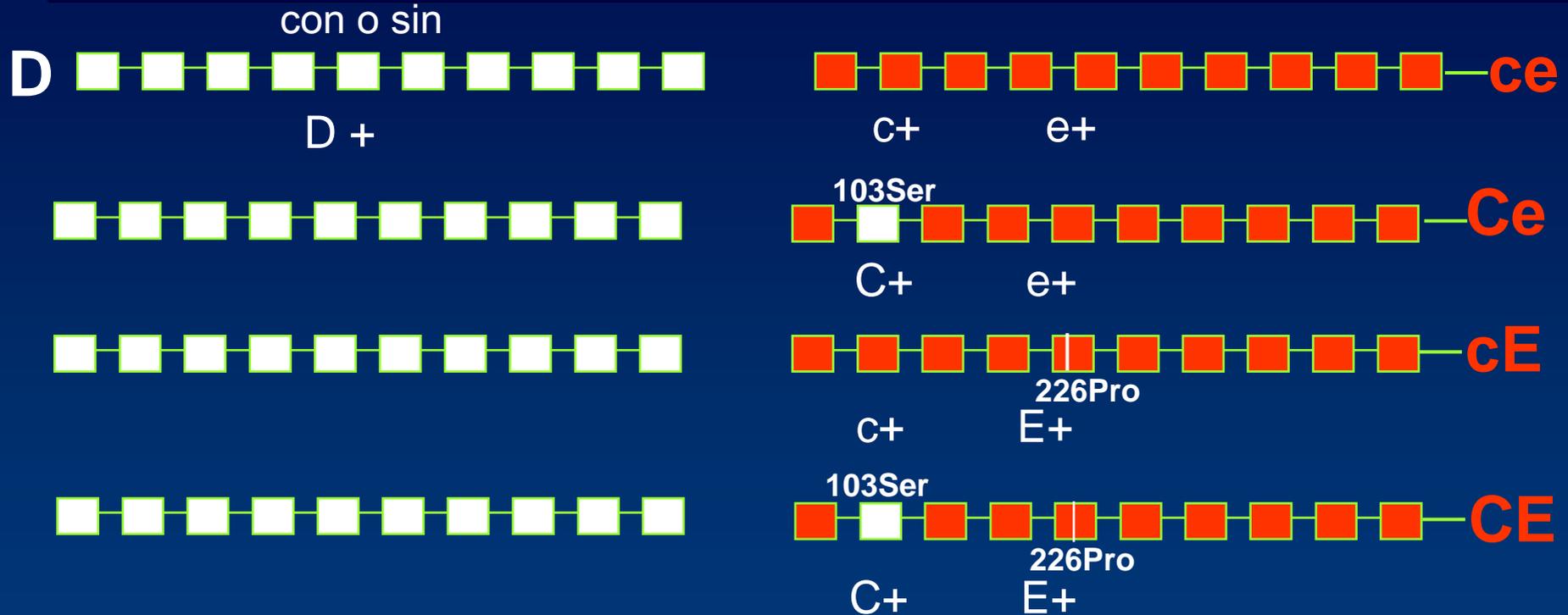
Fenotipo e-positivo

Desarrollan anti-e y/o anti-ce

Frecuentes en pacientes falciformes



“Alelos *RH* convencionales”



Alelos variantes

>100 *RHD* diferentes

>60 *RHCE* diferentes

D parcial, D débil, DEL etc.

hr^{S-}, hr^{B-}, etc

Problemas para resolver variantes *RH*



- Muchas regiones do gene deben ser analizadas
- Generalmente requiere secuenciamiento do gene entero
- Necesidad de genotipage por microarray
- Conocimiento de los cambios en lo gene que alteran los epítopes de la proteína = clínicamente significantes

Sistema Rh

Perspectivas



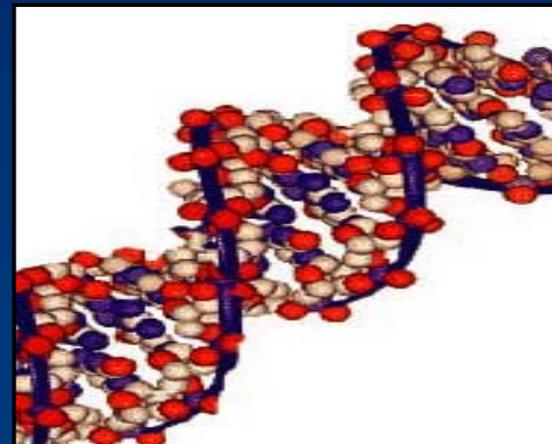
Fenotipo



aglutinación

+

Genotipo



DNA



Gracias por la atención!