

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de medicina



**“Prevalencia de antígeno de superficie eritrocitaria y
variante de un solo nucleótido en el sistema sanguíneo
Diego a”**

POR

Dra. Gabriela Montzerrad Cruz Robledo

Como requisito parcial para obtener el grado de médico
especialista en Patología Clínica



UANL

APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE TESIS

Título de tesis: **"Prevalencia de antígeno de superficie eritrocitaria y variante de un solo nucleótido en el sistema sanguíneo Diego a"**

A blue ink signature of Dr. Erik Alejandro Díaz Chuc, written in a cursive style.

Dr. Erik Alejandro Díaz Chuc

Director de tesis

Coordinador de enseñanza en Posgrado del departamento de Patología Clínica

A blue ink signature of Dr. Sergio Ayala de la Cruz, written in a cursive style.

Dr. Sergio Ayala de la Cruz

Coordinación de investigación del departamento de Patología Clínica

A blue ink signature of Dra. Paula Cordero Pérez, written in a cursive style.

Dra. Paula Cordero Pérez

Coordinadora de laboratorio de unidad de Hígado

A blue ink signature of Dr. Jorge Martín Llaca Díaz, written in a cursive style.

Dr. Jorge Martín Llaca Díaz

Jefe de departamento de Patología Clínica

A blue ink signature of Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez, written in a cursive style.

Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de estudios de posgrado



UANL

**“Prevalencia de antígeno de superficie eritrocitaria y
variante de un solo nucleótido en el sistema sanguíneo
Diego a”**

Este trabajo fue realizado en el área de banco de sangre del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y el laboratorio de biología molecular del departamento de Unidad de hígado en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Erik Alejandro Díaz Chuc.

Dr. Erik Alejandro Díaz Chuc

Director de tesis

Coordinador de enseñanza en Posgrado del departamento de Patología Clínica

Agradecimientos:

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León, al Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y la secretaria de salud por permitirme desarrollarme en esta nueva etapa de vida a nivel profesional.

Agradecida con el departamento de patología clínica, con el jefe de área el Dr. Jorge Martin Llaca Díaz por permitirme la oportunidad de crecer profesionalmente, y desarrollar este proyecto de tesis.

A la Dra. Paula Cordero Pérez por abrirme las puertas de su laboratorio y hacerme sentir parte del equipo, a la Dra. Diana Rodríguez por el apoyo en cada actividad realizada.

Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón por seguirme apoyando y seguirme enseñando de la vida.

A mis profesores Dr. Erik Díaz, Dr. Sergio Ayala y Dr. Erik Sanmiguel por el tiempo brindado y la enseñanza de esta hermosa especialidad médica de patología clínica.

A mi amigo y compañero de residencia Salvador Sánchez, hiciste el camino divertido y leve, gracias por escucharme y apoyarme admiro tu optimismo y dedicación.

A la química Vero Frías por sus palabras de aliento a la Licenciada Lupita Aguirre por las risas y las charlas, a los químicos de laboratorio central que siempre estuvieron ahí para enseñar y resolver dudas, compartiendo su tiempo y conocimiento.

A mis amigas Laurita y Valeria por apoyarme en este camino, por las risas, las desveladas y la compañía, no saben lo importantes que son para mí, quisiera agradecer con mucho cariño a la QCB. Diana Medellín quien con sus pláticas complicidad, amistad y apoyo contribuyo a la conclusión de la especialidad, quien se desvelo conmigo para sacar este proyecto adelante y hacer recolección de muestras, te quiero mucho.

A mi familia por nunca dejarme sola, a mi Madre por los consejos, el apoyo que siempre me das, las pláticas nocturnas y ese amor que solo tu sabes darme, te admiro y estoy muy orgullosa de ti madre mía, eres la mejor de todo el mundo; a mis hermanos Vero y Emilio “todos para uno y uno para todos”. A Gustavo Cruz González mi padre, espero que estes orgulloso, un abrazo al cielo, gracias por enseñarme a nunca darme por vencida.

A mi novio Gustavo por la ayuda, por escuchar, por los abrazos, por ir y venir conmigo. Y a Dios por la vida, las enseñanzas y por la conclusión de este proyecto.

“Un país sin investigación es un país sin desarrollo”.

Margarita Salas

“La ciencia y la vida cotidiana no pueden ni deben separarse. La ciencia,
para mí, da una explicación parcial de la vida”

Rosalinda Franklin

“La vida es una unión simbiótica y cooperativa que permite triunfar a los
que se asocian”

Lynn Margulis

“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la
humanidad y es la antorcha que ilumina al mundo. La ciencia es el alma
de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso.”

Luis Pasteur

“No debemos tener miedo a equivocarnos, hasta los planetas chocan y
del caos nacen estrellas”

Charles Chaplin

Contenido

Agradecimientos:	i
Lista de abreviaturas	v
Lista de tablas:.....	vii
Lista de figuras	viii
Resumen.....	ix
Abstrac:	X
Introducción	- 1 -
Antecedentes y marco teórico:	- 2 -
Antígenos de superficie eritrocitaria:	- 2 -
Sistema Sanguíneo Diego a (Dia)	- 2 -
Sistema Sanguíneo Kell:.....	- 5 -
Sistema sanguíneo Rh (Rhesus).....	- 7 -
Genética de los grupos sanguíneos.....	- 12 -
Genética de Sistema Diego:	- 12 -
Genética de sistema sanguíneo Kell	- 12 -
Genética del RH.....	- 13 -
Variantes genéticas de un solo nucleótido:	- 14 -
Objetivo general.....	- 17 -
Objetivos particulares	- 17 -
Hipótesis:	- 18 -
Justificación	- 19 -
Materiales y métodos:.....	- 20 -
Criterios de inclusión	- 20 -

Criterios de exclusión:	- 21 -
Criterios de eliminación:	- 21 -
Fenotipo de donadores de sangre.	- 21 -
Extracción de DNA	- 22 -
Genotipificación mediante ensayos taqman de discriminación alélica para la búsqueda de variantes genéticas	- 24 -
Análisis estadístico	- 26 -
Resultados:	- 26 -
Fenotipo de donadores:	- 26 -
Genotipificación mediante ensayos taqman de discriminación alélica para la búsqueda de variantes genéticas	- 30 -
Sistema sanguíneo Diego a (Dia)	- 31 -
Sistema sanguíneo Kell (K)	- 31 -
Sistema sanguíneo Rh (C/C, E/e).....	- 32 -
Discusión:	- 34 -
Conclusión:	- 36 -
Referencias.....	- 37 -

Lista de abreviaturas

ISBT: Sociedad Internacional de Transfusión sanguínea

SNV: Variantes de un solo nucleótido

EHRN: Enfermedad hemolítica del Recién Nacido

Rh: Rhesus

RhAG: Proteína Rh Asociada a Glicoproteína

RhD: Proteína para Rh de D

RhCE: Proteínas para Rh CE

AA: Aminoácidos

P: Brazo corto de cromosoma

q: Brazo largo del cromosoma

Kb: Kilo bases

Pb: Pares de bases

RPBI: Residuo peligroso biológico Infeccioso

°C: grados Celsius

mL: mililitro

µL: microlitro

rpm: revoluciones por minuto

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ng: nanogramos

dL: decilitro

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

CAT: Tecnología de Aglutinación en Columna

Di^a: sistema sanguíneo Diego a

Di^b: sistema sanguíneo Diego a

AGH: Antiglobulina humana

SLC4A1: Portador de soluto Familia 4 miembro 1

Cl⁻/HCO₃⁻: Transportador de aniones Cloro/Bicarbonato

K: antígeno K mayúscula, antígeno que pertenece al sistema sanguíneo Kell

k: antígeno k minúscula, antígeno que pertenece al sistema sanguíneo Kell

Ko: Antígeno Kell Nulo

Thr: Treonina

Met: Metionina

Pro: Prolina

Leu: Leucina

Ala: Alanina

Pro: Prolina

Xg: gravedades

Lista de tablas:

Tabla 1: Antígenos de superficie eritrocitaria dentro del sistema Diego	- 3 -
Tabla 2: Antígenos de superficie eritrocitaria Sistema sanguíneo Kell	- 6 -
Tabla 3: Nomenclaturas en el Rh	- 10 -
Tabla 4: Frecuencias fenotípicas eritrocitarias en población mexicana	- 11 -
Tabla 5: Fenotipos para Rh, K y Dia.....	- 29 -
Tabla 6: Frecuencias para alelos y genotipo para las variantes rs2285644 c.2561C>T(Dia), rs876058 c.578 C>T(Kell), rs609320 c.307C>T(RH):	- 31 -

Lista de figuras

Figura 1: Banda 3 el intercambiador de aniones.....	- 4 -
Figura 2: Estructura de la proteína Kell.....	- 5 -
Figura 3: Estructura proteica de las proteínas Rh	- 9 -
Figura 4: Cromosoma 17	- 12 -
Figura 5: Cromosoma y Gen de KELL.....	- 13 -
Figura 6: Estructura del gen RH	- 14 -
Figura 7: Clasificación de las variantes de un solo nucleótido.....	- 15 -
Figura 8: Tarjeta de DG Gel® Rh Pheno+Kell y DG Gel® Coombs.	- 22 -
Figura 9: Placa para ensayos taqman.....	- 24 -
Figura 10: Protocolo de amplificación para sondas taqman	- 25 -
Figura 11: Gráfico de determinación alélica	- 25 -
Figura 12: Prevalencia de grupo sanguíneo ABO en donadores del norte del país.....	- 27 -
Figura 13: Prevalencia de RhD en población del norte del país	- 28 -
Figura 14: Prevalencias de antígenos de superficie eritrocitaria Rh, K y Dia.....	- 30 -
Figura 15: Relación de fenotipo con genotipo (rs2285644) para Dia positivo.....	- 32 -
Figura 16: Mapa de calor para el fenotipo C/c y E/e con la variante rs609320.....	- 33 -

Resumen

En el proceso de la donación sanguínea, la tipificación de grupos sanguíneos es algo que se realiza habitualmente; en la medicina transfusional existen sistemas sanguíneos responsables de reacciones transfusionales de graves a moderadas (Diego, Rh y Kell), estos grupos pueden presentar variantes genéticas de un solo nucleótido que estén relacionadas con su expresión sobre la membrana eritrocitaria, y ser causantes de estas reacciones transfusionales, por esta razón el uso de biología molecular dentro de un banco de sangre podría facilitar la búsqueda de unidades sanguíneas compatibles en pacientes, el objetivo de este trabajo es determinar la prevalencia del antígeno Diego y su variante genética de un solo nucleótido (DI*01/*02 – rs2285644). Material y métodos: Se realizó la extracción de material genético (ADN) de leucocitos que se encuentran en la capa denominada como buffy coat que se encuentra en las bolsas sanguíneas posterior al fraccionamiento de la sangre. La extracción de ADN se extrae con el Kit QIAGEN Purigene® Blood Core Kit C, seguido a esto se procedió al análisis de las variantes genéticas mediante el ensayo taqman de discriminación alélica. Nuestra hipótesis es que la prevalencia de la variante de un solo nucleótido de Diego es superior a lo previamente descrito 5%. El análisis estadístico fue descriptivo en las variables de fenotipo y genotipo, las variables cuantitativas se describieron por media, desviación estándar y rango intercuartil, la distribución normal o no normal por prueba de Shapiro-Wilk. Las variables categóricas se describieron en porcentajes, al igual que se evaluaron la concordancia entre fenotipo y genotipo por Kappa de Cohen.

Abstrac:

Blood donation is a routine procedure in transfusion medicine. Several blood group systems such as Diego, Rh, and Kell are responsible for moderate to severe transfusion reactions. These blood groups may present single nucleotide genetic variants that affect antigen expression on the erythrocyte membrane and may contribute to transfusion reactions. For this reason, the implementation of molecular biology techniques in blood banks could facilitate the selection of compatible blood units for patients.

The objective of this study is to determine the prevalence of the Diego antigen and its associated single nucleotide variant (DI*01/*02 – rs2285644).

Materials and Methods: Genetic material (DNA) will be isolated from leukocytes present in the buffy coat layer obtained from blood bags after component separation. DNA extraction will be performed using the QIAGEN Purigene® Blood Core Kit C. The analysis of genetic variants will then be carried out using a TaqMan allelic discrimination assay. Our working hypothesis is that the prevalence of the Diego single nucleotide variant is higher than the previously reported 5%.

Statistical Analysis: Phenotypic and genotypic variables will be described using descriptive statistics. Quantitative variables will be reported as mean, standard deviation, and interquartile range; normality will be assessed using the Shapiro–Wilk test. Categorical variables will be expressed as percentages, and concordance between phenotype and genotype will be evaluated using Cohen’s Kappa coefficient.

Introducción

Este trabajo se llevó a cabo en banco de sangre del hospital universitario “Dr. José Eleuterio González”. Nuestra población de estudio fueron donadores del norte del país, a los cuales se les realizó fenotipo y genotipo para de esta manera hacer una relación genotipo-fenotipo.

La relevancia de esta investigación radica en que hasta el momento no existen estudios con este enfoque en población nacional, lo cual es una limitante actualmente.

En los bancos de sangre actualmente el uso de técnicas moleculares es de suma importancia, ya que permiten un mejor manejo transfusional de una población.

La implementación de estas técnicas dentro de un banco de sangre permite mejorar la terapia transfusional de cada receptor de sangre, más inducida con menor riesgo de complicaciones en aquellos que se requiera; a nivel internacional estas técnicas permiten identificar donantes portadores de fenotipos poco comunes, para de esta manera disminuir reacciones adversas a la transfusión principalmente en donadores multitransfundidos.

Este trabajo es el antecedente de un estudio poblacional que permite a través de técnicas moleculares conocer las necesidades de cada región a nivel transfusional, conocer como es que se comporta la población mexicana para mejorar el manejo de los pacientes y el entendimiento de los grupos sanguíneos dentro de México.

Antecedentes y marco teórico:

Antígenos de superficie eritrocitaria:

Los antígenos de superficie eritrocitaria son sitios inmunogénicos específicos que se encuentran dentro de la membrana eritrocitaria, los cuales son regulados por genes únicos u homólogos estrechamente ligados. Actualmente existen 47 sistemas sanguíneos determinados por 52 genes, estos sistemas pueden ser proteínas, glicoproteínas o glicolípidos los cuales poseen diferentes funciones: Transportadores de membrana (Diego y Kidd), receptores y moléculas de adhesión (Duffy, Lutheran), glicoproteínas reguladoras del complemento (Cromer, Knops), componente estructural (Diego, Gerbich) o componentes de glucocálix (MNS). Estos antígenos eritrocitarios pueden generar una reacción inmunitaria de importancia al hacer uso de hemocomponentes, las cuales pueden poner en riesgo la vida del receptor, por esto es importante conocer sobre los sistemas eritrocitarios de mayor relevancia clínica (*Avent, et al, 2000, ISBT, 2025*).

Sistema Sanguíneo Diego a (Dia)

El sistema sanguíneo fue descubierto en 1952 en una mujer que venezolana cuyo producto sufrió enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), se concluyó que estos eran causados por aloanticuerpos. Así pues, el sistema sanguíneo toma el nombre del producto que fallece después de 3 días por anemia hemolítica grave (*Soyano, 2014*). Este sistema sanguíneo es identificado por la ISBT como el número 010 y un símbolo de DI (*Wu, et al 2002 y Begat et al, 2015*), posee 23 antígenos los cuales se enlistan a continuación en la tabla 1 (*González, 2024*).

ISBT	Antígeno	Nombre del antígeno
DI1	Di ^a	Diego a
DI2	Di ^b	Diego b
DI3	Wr ^a	Wright a
DI4	Wr ^b	Wright b
DI5	Wd ^a	Waldner a
DI6	Rb ^a	Radelber a
DI7	WARR	Warrior
DI8	ELO	ELO
DI9	Wu	Wulfsberg
DI10	Bp ^a	Bishop a
DI11	Mo ^a	Moen a
DI12	Hg ^a	Hughes a
DI13	Vg ^a	van Vugt
DI14	Sw ^a	Swan
DI15	BOW	Bowyer
DI16	NFLD	NFLD
DI17	Jn ^a	Nunhart
DI18	KREP	KREP
DI19	Tr ^a	Traversu
DI20	Fr ^a	Froese
DI21	SW0	SW1
DI22	DISK	DISK
DI23	DIST	DIST

Tabla 1: Antígenos de superficie eritrocitaria dentro del sistema Diego: Se observan los diferentes antígenos dentro del sistema Diego, hasta el momento 23 antígenos, siendo los de mayor relevancia clínica los primeros 2 (DI1 Y DI2), el resto de los antígenos son extremadamente raros (*ISBT, 2024*)

El antígeno es transportado por una proteína intercambiadora de aniones (Cl⁻/HCO₃⁻), la Banda 3 que es la proteína integral más abundante del eritrocito, que interactúa con el citoesqueleto de los glóbulos rojos, las mutaciones dentro de esta proteína integral modifican la morfología de los hematíes (*Jarolim et al, 1998*) (Figura 1). Dentro de esta banda puede haber variaciones en los aminoácidos (AA) que son los encargados de la expresión del antígeno El antígeno Di^a /Di^b, el

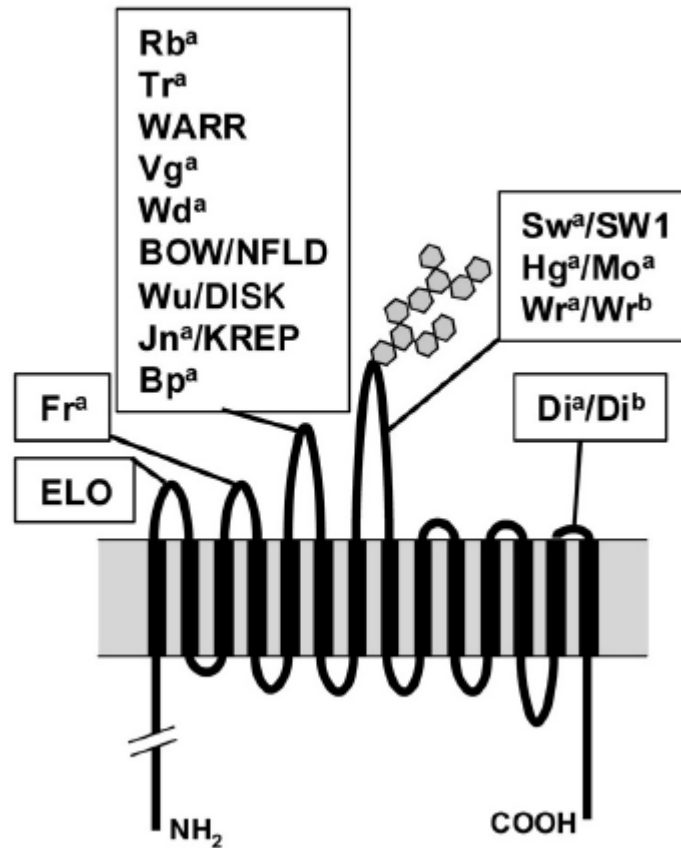


Figura 1: Banda 3 el intercambiador de aniones: Antígeno Dia/Dib representados en dentro de la Banda 3, se muestran los antígenos del sistema Diego y su ubicación (Melland, tomado de Manual AABB 20ed, capítulo 12).

segundo se localiza en el 100% de la población europea, por el contrario, con el antígeno Diª, el cual fue llamado de ascendencia mongola (Xu *et al*, 2011; Flores *et al*, 2014).

El estudio de este sistema tiene dos importancias, clínica y antropológica, este antígeno es responsable de EHRN y reacciones transfusionales graves principalmente Diª, en Guatemala se reporto que 3.5% de los pacientes transfundidos poseían anticuerpos anti-Diª, lo que pone en riesgo a esta población en la siguiente transfusión, este tipo de anticuerpo es IgG (IgG1 y IgG3) el cual puede atravesar la barrera placentaria, responsables de EHRN (Góngora *et al*, 2018), el antígeno Diª causa reacciones transfusionales tardías y leves que pueden llegar a pasar inadvertidas, a diferencia del antígeno Diª este antígeno

es de alta prevalencia en la mayoría de las población (*ISBT, 2025*), por esta razón el estudio del antígeno Di^a proporciona información antropología, ya que se ha observado que hay diferencias significativas entre poblaciones, este antígeno se encuentra en una prevalencia menor al 1% en población europea (*Fu et al, 2022*), en estados unidos específicamente Texas la prevalencia fue de 2.6-4%, población oriental (12%) y en población de Sudamérica (54%) (*Fu et al, 2022; Soyano et al, 2014*). Sin embargo, actualmente la prevalencia en población mexicana sigue sin definirse, existen muchas discrepancias en bibliografía actual.

El otro sistema de importancia por reacciones transfusionales graves y en EHRN se encuentra el sistema sanguíneo Kell.

Sistema Sanguíneo Kell:

Es uno de los sistemas sanguíneos más importan involucrados en la EHRN y en generar reacciones transfusionales graves después del Rh, este es una glicoproteína tipo 2 que posee 732 aminoácidos, está unida por un puente disulfuro con otra proteína Xk la cual consta de 44 AA que pasa a través de la membrana 10 veces como se observa en la figura 2 (*Lee et al, 2000*).

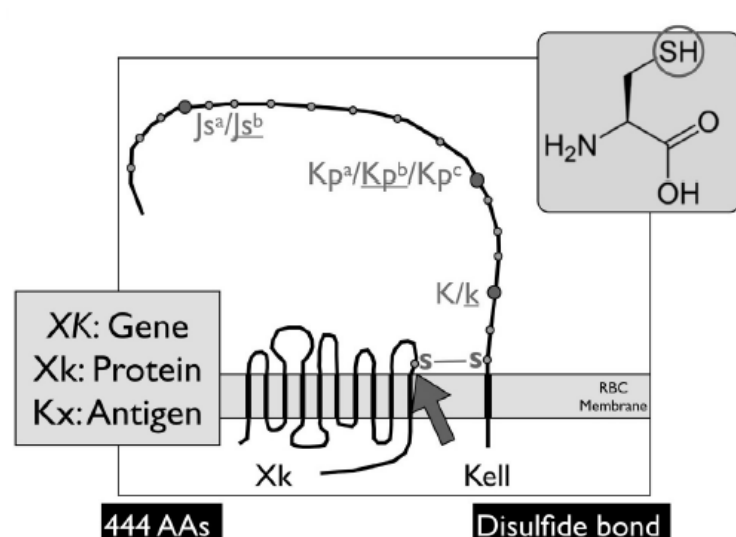


Figura 2: Estructura de la proteína Kell: Se observa la interacción con las proteínas Xk y Kell que se une a través de un puente disulfuro, la ausencia de Xk genera el fenotipo de McLeod, generando alteración en los eritrocitos (*AABB 20 ed cap.12*).

La ISBT le asigno el numero 006, posee 38 antígenos de superficie eritrocitaria los cuales se enumeran en la tabla 2, la combinación fenotípica más frecuente es K- k+ en el 91% de caucásicos y 98% en africanos, mientras que el fenotipo invertido K+k- ocurre en un 0.2% en población caucásica y muy raramente en población africana (*González, 2024*), con lo anterior es importante señalar que algunos fenotipos de Kell son mas comunes en ciertos grupos raciales o étnicos que en otras poblaciones por ejemplo U^{Ia} ocurre en el 2.6% de los finlandesas, este antígeno se presenta en menos del 1% en otras poblaciones (*Lee et al, 1995*).

ISBT	Antígeno	Nombre del antígeno
K1	K	Kell
K2	k	Cellano
K3	Kp ^a	Penny
K4	Kp ^b	Rautenberg
K5	Ku	Peltz
K6	Js ^a	Sutter
K7	Js ^b	Matthews
K8	Kw	Kw
K9	Kl	Class
K10	U ^{Ia}	Karthula
K11	K11	K11
K12	K12	K12
K13	K13	K13
K14	K14	K14
K15	K15	K15
K16	K16	K16
K17	K17	K17
K18	K18	K18
K19	K19	K19
K20	K20	K20
K21	K21	K21
K22	K22	K22
K23	K23	K23
K24	K24	K24
K25	VLAN	VLAN
K26	TOU	TOU
K27	RAZ	RAZ
K28	VONG	VONG
K29	KALT	KALT
K30	KTIM	KTIM
K31	KYO	KYO
K32	KUCI	KUCI
K33	KANT	KANT
K34	KASH	KASH
K35	KELP	KELP
K36	KETI	KETI
K37	KHUL	KHUL
K38	KYOR	KYOR

Tabla 2: Antígenos de superficie eritrocitaria Sistema sanguíneo Kell: Se observan los 38 antígenos reportados de los cuales 10 son de baja frecuencia. Los de mayor relevancia clínica son los primeros K1 y K2. (*ISBT, 2024*).

El antígeno K es el causante de aloinmunización en pacientes K negativos al no realizar una adecuada compatibilización de sangre. En la EHRN esta sensibilización ocurre cuando el antígeno K está presente en los eritrocitos fetales y la madre carece del antígeno, quien después del primer embarazo genera anticuerpos IgG, anti-K, que son los causantes de la enfermedad hemolítica y supresión de la eritropoyesis fetal (*Llano, cap 14, 2012*).

Este sistema se considera uno de los más polimórficos esto se debe al cambio de aminoácidos dentro de las proteínas que forman el sistema sanguíneo, por ejemplo en el caso de KEL4 expresa arginina, KEL3 expresa triptófano, KEL21 expresa glutamina, estas modificaciones dentro de la proteína generan que la expresión del antígeno sea diferente, lo que el uso de un concentrado eritrocitario diferente al fenotipo del receptor podrá generar una aloinmunización, complicando así la siguiente transfusión (*Lee et al, 2000*), la ausencia de las proteínas del sistema Kell se traducen fenotípicamente como Ko o null, es decir carecen de cualquier antígeno de este sistema eritrocitario (*Yu et al, 2001*).

La falta de expresión de la proteína Kx origina el fenotipo McLeod, se asocia con una morfología anormal del eritrocito (acantolíticos), trastornos neurológicos (correa, arreflexia y deterioro cognitivo) y musculares (distrofia muscular y miocardiopatía) (*Lee et al, 2000*) que se caracteriza por la ausencia de antígeno Kx y niveles notablemente bajos de antígeno Kell, por el contrario en el fenotipo Ko donde se observan niveles normales de Kx (*Lee et al, 2000*).

Finalmente describir el antígeno Rh es de vital importancia clínica para comprender los fenotipos clínicamente significativos en la EHRN y en reacciones transfusionales graves.

Sistema sanguíneo Rh (Rhesus)

La ISBT lo identifica con RH y asigna el número 004, este sistema fue descrito por primera vez en 1940 por Landsteiner y Wiener al observar que la sangre de una mujer embarazada aglutinaba con el 80 % de muestras compatibles en ABO

(*Avent et al, 2000*). Es el sistema sanguíneo más polimórficos, e inmunogénicos seguido del sistema ABO, consta de 49 antígenos, de entre los cuales resaltan C, E, c, e, D y d que hace referencia a la ausencia de antígeno D (*Westhoff, 2004*), este sistema se expresa en la membrana del eritrocito por 3 proteínas (RhD, RhCE y RhAG), la proteína Rh Asociada a Glicoproteína (RhAG) debe estar presente para dirigir los antígenos Rh a la membrana del eritrocito y posee el 35% de similitud con la secuencia primaria de aminoácidos de las otras dos proteínas del Rh, la ausencia del RhAG se traduce en Rh nullo, el cual es la ausencia de las proteínas Rh y de sus antígenos en la membrana eritrocitaria, este fenómeno es raro solo existen 60 casos reportados, estos pacientes pueden desarrollar anemia hemolítica crónica, fragilidad osmótica (*Le Van et al 2006*).

La proteína RhCe y RhD comparten 41 aminoácidos (AA) similares en su estructura proteica y varían en 30 a 35 AA entre ambas, estas poseen 417 AA que se organizan en 12 dominios transmembrana, la proteína del RhD es responsable de la expresión del antígeno D, y la RhCE de los antígenos C/c y E/e que involucra al 2° y 4° bucle extramembrana como se puede apreciar en la figura 3. (*Avent et al, 2000, Westhoff, et al 2004*).

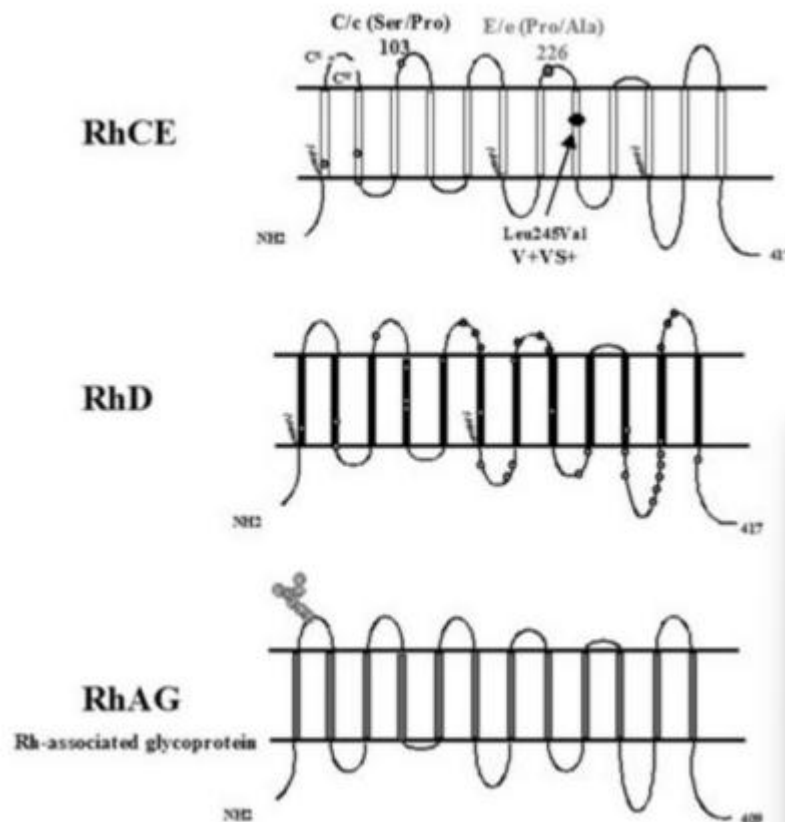


Figura 3: Estructura proteica de las proteínas Rh: Se observa la estructura proteica de las 3 proteínas que forman parte del sistema Rh, así como el cruce transmembrana y los bucles que son responsables de la identificación para cada antígeno dentro del sistema Rh, segundo bucle de la porción proteica de RhCE C/c, 4 bucle para antígeno E/e, así como el cambio de aminoácido al que se ha observado asociación (*Whesthoff 2004*).

La proteína de RhD es una proteína muy variable, a la cual se le relaciona con la EHRN, esta proteína puede tener alteraciones en su expresión y es por ello que se denomina a su vez como D débil y D parcial, su importancia radica en la capacidad que tienen para generar aloanticuerpos y generar reacciones transfusionales, la primera variación de D se traduce como una disminución de sitios antígenicos para D, y la segunda con sustitución de AA en al menos uno de los bucles de la superficie de membrana en eritrocitos lo que generara una proteína incompleta, muchas veces esto se observa con una disminución de aglutinación (0-2+) (*Sandler et al, 2017*), una mala clasificación de

hemocomponentes pone en riesgo al receptor en caso de ser D negativo. Por esta razón es importante conocer las variaciones de antígenos existentes en una población, para de esta manera mejorar la terapia transfusional y disminuye las reacciones transfusionales graves (Muñiz, 2022).

La fenotipificación es una herramienta útil para la adecuada identificación de hemocomponentes lo que permite disminuir los riesgos asociados a una transfusión sanguínea, con el objetivo de unificar términos se desarrollaron dos lenguajes la nomenclatura de Weiner y la de Fisher y Race (tabla 3), siendo la primera la más utilizada esta nos permite describir la presencia o ausencia de los antígenos dentro del sistema Rh (Alvarado, et al, 2020).

Fisher y Race	Weiner
Rr positivo	
D ⁺ Ce	R ₁
D ⁺ cE	R ₂
D ⁺ ce	R ₀
D ⁺ CE	R _z
Rh negativo	
Ce	R
Ce	r'
cE	r''
CE	r _y

Tabla 3: Nomenclaturas en el Rh: En la presente table se puede observar las diferencias entre ambas nomenclaturas y se observa que dentro de la nomenclatura de Weiner se hace referencia a la presencia del antígeno D con una R mayúscula y la ausencia de antígeno D con r minúscula (Thierry, 2020, pp.333).

La adecuada clasificación de los componentes sanguíneos disminuye considerablemente las reacciones a la transfusión sanguínea y evita la aloinmunización, se sabe que aproximadamente el 77% de los donadores son D+ y 33% son D negativo, la fenotipificación de los eritrocitos a trasfudir desde la primera vez que se emplean hemocomponentes debe ser parte del tratamiento de cada receptor de unidades sanguíneas (Muñiz, 2022), esto disminuye la

probabilidad de aloinmunización, la tasa de este efecto en pacientes multitransfundidos oscila de 2.6% al 60 %, estudios demuestran que el realizar la fenotipificación extendida de cada unidad sanguínea y receptor disminuye la aloinmunización de 5 al 33% dependiendo de la patología de cada paciente (*Kulkarni, et al. 2020, Muñiz, 2022*), por ello la importancia de conocer el fenotipo dentro de una población.

En México la prevalencia para los antígenos de superficie eritrocitaria se muestra en la siguiente tabla, estudio realizado en el 2007 en siglo XXI (IMSS) en población del centro de la república mexicana (tabla 4).

Rh Positivo	Donadores	Pacientes	Rh Negativo	Donadores	Pacientes
R1R1 (CCDee)	26.4	31.69	rr (ccdee)	2.64	4.30
R2R2 (ccDEE)	6.93	7.8	r'r (Ccdee)	0.16	0.32
R1R2 (CcDEe)	26.07	28.03	r'r' (CCdee)	0.16	0.16
R1r (CcDee)	17.73	10.51	ryr (ccdEe)	0.3	0
R2r (ccDEe)	7.5	8.76			
R1Rz(CCDEe)	3.79	5.41			
R2Rz(CcDEE)	3.8	1.27			
RzRz(CCDEE)	2.3	0			
Ror (ccDee)	1.56	1.27			

Tabla 4: Frecuencias fenotípicas eritrocitarias en población mexicana: En esta tabla podemos apreciar la prevalencia para los fenotipos Rh con la clasificación de Weiner, donde se observa que existe una mayor prevalencia de D positivos que de D negativos, así como la diferencia en las frecuencias para cada fenotipo dentro del Rh. (*tomado de Alcazar, et al. 2007*)

Todas las técnicas dentro de banco de sangre para la adecuada clasificación de hemocomponente emplean el principio de hemaglutinación, muchas veces estas técnicas son insuficientes para la adecuada clasificación de componentes sanguíneos, ya que existen alteraciones en la genética de los antígenos de superficie eritrocitaria que pueden modificar la expresión de cada antígeno, como ya se mencionó anteriormente en el antígeno D es un muy buen ejemplo de este fenómeno ya que las modificaciones puntuales en el material genético (*Sandler, et al, 2017*) genera cambios en las proteínas, es por esto que el estudio genético de cada sistema sanguíneo es importante.

Genética de los grupos sanguíneos

Genética de Sistema Diego:

Es codificado por el gen SLC4A1, se encuentra en el cromosoma 17q12q-21 y consta de 20 exones que abarca 18 Kb de ADN la alteración puntual dentro de la cadena dentro del exón 19 (figura 4).

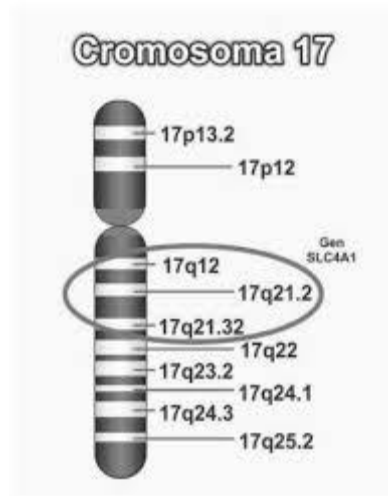


Figura 4: Cromosoma 17: Se observa localización de gen SLC4A1, responsable de codificar el antígeno Diego (tomado de internet <https://docs.bvsalud.org>, 2025).

Genética de sistema sanguíneo Kell

El gen para XK se localiza en el cromosoma X en una porción pequeña de 82 Pb y está organizado en 3 exones, el gen KEL es más complejo este abarca 21.5 kb en el cromosoma 7q33 y su secuencia codificante está organizada en 19 exones cuyo tamaño varía de 63 a 283 pb (figura 5). Se han detectado deleciones en KX así como deleciones puntuales en el exón 2 que provoca un desplazamiento del marco de lectura (Lee et al, 2000).

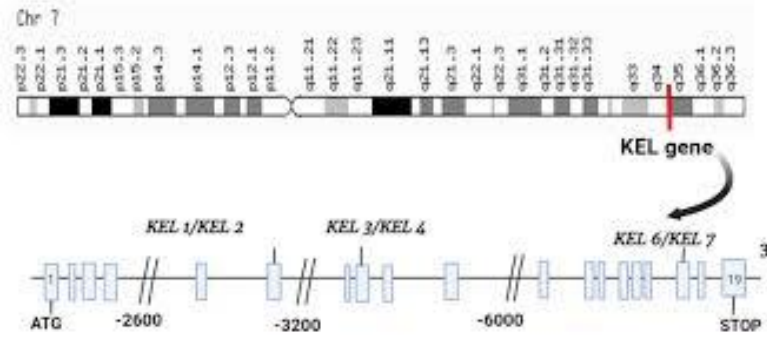


Figura 5: Cromosoma y Gen de KELL: Se muestra el cromosoma 7 y el gen de KEL marcando las regiones responsables de cada fenotipo dentro de este sistema sanguíneo (*tomado de internet www.researchgate.net, 2025*)

El fenotipo de McLeod puede estar dado por deleciones del gen XK por completo lo que causa enfermedad granulomatosa crónica, retinosis pigmentaria y distrofia de Duchenne, o solo puede verse afectado un trozo pequeño encargado de codificar el gen KX lo que genera un desplazamiento del marco de lectura causando un codón de terminación prematuro.

Genética del RH

El gen del Rh se encuentra localizados en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36-p34) contiene los genes RHD Y RHCE (figura 6) que se disponen en tándem, estos genes son homólogos estructuralmente en un 97% cada uno tiene 10 exones y abarca una secuencia de 75 Kb, el gen para RHD esta flanqueado por dos secuencias altamente homologas de 9 Kb denominada caja Rhesus la cual se asocia con la deleción del gen en un 40% de la población (*Wagner, et al, 2000*), la otra proteína RhAG es responsabilidad del gen RHGA el cual se encuentra en el cromosoma 6, no es polimórfico pero las mutaciones en este gen son responsables del Rh null (*Westhoff, et al 2004*).

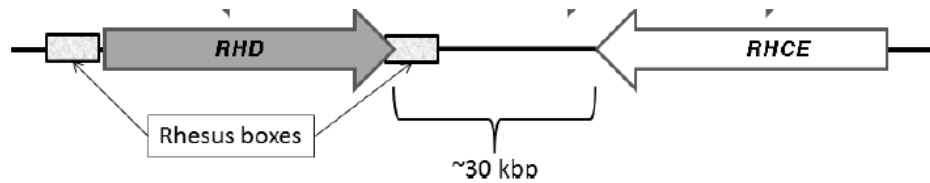


Figura 6: Estructura del gen RH: Se observa la presencia de los dos genes RHD Y RHCE separados por 30 kb, se observan las cajas Rhesus que flanquean el gen RHD que son responsables de deleciones a nivel de este gen (tomado de Thierry, et al 2020).

A inicios de los años 90's se logro clonar el gen de RHCE y RHD, esto permitió identificar los cuatro alelos diferentes del RHCE (C/c, E/e) (Avent et al, 2000).

El antígeno D ha sido el más estudiado, revelando alteraciones genéticas por ejemplo, en población africana el D negativo esta definido por la presencia de un pseudogen RHw, (Wagner, et al, 2000, Daniels, 2009) es un gen hibrido entre el RHD (exón 1, 2 y del 8-10) Y RHCE (exón 4-8) lo que causa un RhD negativo y un antígeno c débil (Daniels, 2009), en la población vasca hay una alta frecuencia de Rh D negativo, en comparación al resto de la población europea.

El estudio del genoma y el reconocimiento de las variaciones dentro del mismo da pie al estudio de las poblaciones y su migración, así que diversos grupos de investigación se han encargado de estudiar las Variantes de un solo nucleótido (SNV), las cuales son responsables de los polimorfismos de cada grupo sanguíneo mencionado hasta el momento.

Variantes genéticas de un solo nucleótido:

Las variantes de un solo nucleótido son un cambio en el ADN en una sola base o posición de nucleótidos en la secuencia del genoma.

Estas a su vez se clasifican en:

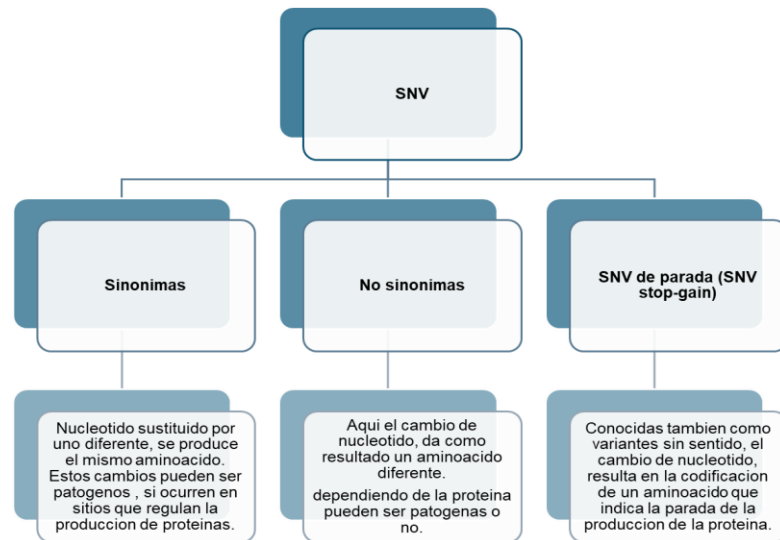


Figura 7: Clasificación de las variantes de un solo nucleótido: Se explican los tres tipos de variantes genéticas que se describen hasta el momento, se puede observar que cada una puede o no modificar la expresión de la proteína, así como detener su producción. (Hamad,2025)

Las variantes de un solo nucleótido se encuentran en regiones codificantes y no codificantes de proteínas, regiones intergénicas, menos del 10 % de las variantes genéticas de riesgo se encuentran en regiones codificantes de las proteínas el resto se localiza en zonas intergénicas e intrónicas (Hecun, 2020).

Polimorfismos de un solo nucleótido ocurren al menos en 1% de la población, son la causa más común de variación genética y se encuentran en 300 bases dentro del genoma humano (Hamad, 2025). Estas variaciones en el genoma contribuyen a la enfermedad o a la expresión de ciertos rasgos fenotípicos. Dentro de estos sistemas sanguíneos las variantes más estudiadas son: rs2285644 c.2561G>A(Di^a), rs8176058 c.578 G>A(Kell), rs609320 c.307C>G(RH), cada uno relacionado con la expresión fenotípica en cada sistema sanguíneo.

El SNV para el sistema Diego (Di^a) rs2285644 localizado en el gen SLC4A1 se encuentra descrito que esta variante permite la expresión del antígeno a dentro de este sistema sanguíneo, lo que genera la sustitución de aminoácido prolina (Pro) por leucina (Leu) (Halawani et al, 2024), se ha reportado la prevalencia del antígeno Dia en diversas poblaciones con una marcada diferencia entre las mismas en japoneses se reporta 12%, en indios Chippewa 11%, en chinos 5%,

hispanos 1%, polacos 0.47%, Petit y colaboradores hacen una aportación interesante al publicar un análisis de la migración de población por expansión del imperio mongol, de esta manera contribuyen con una afirmación relevante para la medicina transfusional, lograr la identificación de la variante dentro de ciertas poblaciones permite garantizar la seguridad transfusional (*Petit et al, 2019*). Como se menciona anteriormente este polimorfismo no sigue patrones divergentes como otros antígenos modulados por selección natural, lo que coloca a esta variante como clave para comprender la genética del sistema por su relevancia antropológica, su importancia transfusional y su valor como marcador para estudios de variabilidad poblacional (*Waskow et al, 2020*).

El estudio de la variante de Kell la variante rs8176058 localizado en el cromosoma 7 un cambio de Treonina (Thr) a Metionina (Met) y permite la diferenciación del antígeno k al K mayúscula dentro del exón 6, sin embargo, no es la única variante descrita para este sistema dos variantes más ayudan a definir el antígeno de superficie eritrocitaria como rs8176059 que define la expresión de Kp^a o Kp^b y rs8176038 que otorga la diferencia para Js^a/Js^b (*Reid et al, 2011*), la variante rs8176059 difieren dentro de una población brasileña identificada con descendencia europea y africana, lo que sugiere que esta SNV puede funcionar como un marcador de estructura poblacional (*Waskow et al, 2020*).

En cuanto a la variante para Rh rs609320 que se encuentra en el cromosoma 1, esta SNV genera un cambio de aminoácido Alanina (Ala) por Prolina (Pro) y esta bien relacionada con el antígeno E/e (*Haffener et al, 2025*), no es la única variante descrita dentro de este sistema Perry y su grupo de investigadores en el 2012 demuestran que la prevalencia del antígeno C (rs676785) en población asiática es mayor que la europea y africana encontrando diferencias a la vez dentro de estas poblaciones (*Perry, et al, 2012*).

El estudio de las SNV se ha implementado en la EHRN, con el objetivo de disminuir los riesgos para el feto, así se ha demostrado que esta patología no solo es causada por el antígeno D, sino también por C/c, E/e y otros sistemas de

importancia clínica como Kell, Duffy, Diego Kidd, Colton y MNS e incluso se recomienda la genotipificación del feto ante la sospecha de EHRN, recomendando un tamizaje a partir de la semana 10 de gestación con una precisión de 99.9% (McGowan, *et al*, 2024), de esta manera poder evitar complicaciones.

Objetivo general

Determinar la prevalencia de la variante genética rs2285644 en antígeno de superficie eritrocitaria Diego a en donadores del norte del país.

Objetivos particulares

- Identificar la prevalencia los antígenos de superficie eritrocitaria de relevancia clínica Kell (K1) y Rh C/c/E/e por medio de pruebas de fenotipo por aglutinación en matriz de gel con antisueros.
- Conocer la prevalencia de las variantes genéticas que determinan la expresión de los antígenos de superficie eritrocitario Kell (K1) Diego a (Di^a) y Rh C/c/E/e por medio de ensayos taqman de discriminación alélica.
- Relacionar la expresión del fenotipo con las variantes encontradas por medio de ensayos taqman de discriminación alélica.

Hipótesis:

La prevalencia de la variante Diego a se expresa en más del 5% de la población del norte del país.

H0: prevalencia Di^a (rs2285644)= 5%

H1: prevalencia Di^a (rs2285644)≠ 5%

Justificación

El sistema sanguíneo Diego es un sistema de relevancia clínica en la medicina transfusional, en Latinoamérica este sistema sanguíneo es responsable de reacciones transfusionales de moderadas a graves y enfermedad hemolítica del recién nacido y el feto que pueden poner en riesgo la vida de sus portadores, sin embargo, actualmente no se conoce la prevalencia de este antígeno eritrocitario en regiones de nuestro país.

Conocer su prevalencia permitirá identificar de mejor manera las necesidades transfusionales en la población, disminuyendo la cantidad de efectos adversos asociados., realizando el fenotipo expresado en donadores del Banco de Sangre del Hospital Universitario y compararlo con la presencia de variantes genéticas por medio de ensayos taqman de discriminación alélica.

Materiales y métodos:

Este es un estudio prospectivo, observacional y descriptivo. Se llevo a cabo en el hospital Universitario desde marzo del 2025 a septiembre del 2025, se obtuvieron las muestras de los donadores de sangre del Banco de sangre del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González.”

Para poder ingresar al estudio era importante que el donador contara con los criterios estipulados en NORMA oficial mexicana NOM-253-SSA1-2012 para poder ser un donador apto.

Una vez que se determinó que una persona era adecuada para la donación, se explicó el protocolo, se les pedio que leyeran el consentimiento informado (documento en anexos), si este documento no se firmó el donador era excluido del estudio, si el consentimiento fue firmado, se continuo con el proceso habitual de donación, los componentes sanguíneos se obtuvieron de manera habitual, es importante señalar que posterior al fraccionamiento de sangre se obtiene una capa leucoplaquetaria residual que es rica en leucocitos en la práctica habitual esta capa se considera desecho y se da destino final como Residuo de Producto Biológico Infeccioso, sin embargo para nuestro protocolo fue esta capa la que nos proporcionó el material genético a analizar.

No se procesaron muestras sin el uso de material de protección adecuado, guantes, lentes, bata y con una serología infecciosa negativa para: *Treponema Palladium*, *Tripanosoma Cruzi*, HIV 1, 2, VHC, VHB y Brucella.

Criterios de inclusión

Donadores que aceptaron el participar en el protocolo de investigación y fueron seleccionados en banco de sangre con los criterios de aceptación estipulados en la NORMA oficial mexicana NOM-253-SSA1-2012, para la disposición de la sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos, en su punto 6, y la Guía Nacional de Selección de Donantes emitida por el Centro Nacional de la

Transfusión Sanguínea, la versión 2.0 con fecha 21 octubre del 2022; se incluyeron de manera aleatorizada a quienes cuenten con los siguientes datos:

- Hombres y mujeres
- Procedencia de la zona noreste de México (padres y abuelos procedentes de la zona noreste de México)
- Aceptación de consentimiento informado

Criterios de exclusión:

Cualquier persona que no fuera apta para donar de acuerdo con los criterios establecidos en los documentos antes descrito.

Quienes no aceptaron el uso de su muestra para el análisis ya que se encuentren aceptados como donadores (consentimiento informado).

Criterios de eliminación:

Aquellos de los que no se pudo completar el proceso de extracción o fraccionamiento que impidan acceder a la capa leucoplaquetaria.

Donadores con los que no se pudo realizar fenotipificación o extracción de material genético.

Fenotipo de donadores de sangre.

Se realizó el fenotipo para los sistemas sanguíneos Diego, Kell y Rh de los donadores aceptados a partir de muestras obtenidas de las mismas bolsas de las que se obtuvo el material genético de cada donador con el objetivo de evitar errores de identificación, se colocaron en tubos de ensayo de vidrio los eritrocitos obtenidos de cada bolsa, a estos eritrocitos se les realizó 3 lavados con solución salina al 0.9%, hasta observar un sobrenadante transparente, asegurándonos que ya no hay hemlisis de los eritrocitos.

Estos eritrocitos lavados son los que se emplearon para la realización del fenotipo, se realizó una suspensión de eritrocitos al 1 % con DG Gel Sol® (fabricada por Grifols) para el fenotipo de Rh y Kell se empleó la tecnología de

aglutinación en columna (CAT) con las tarjetas DG Gel® Rh Pheno+Kell- Griffols (Rh [D, C, E, c y e] y Kell [K]) (figura 8A), se colocaron 50 µL de suspensión de eritrocitos al 1% en cada columna, se centrifugo a 990 rpm por 9 minutos (128 xg) y se procedió a la lectura del fenotipo.

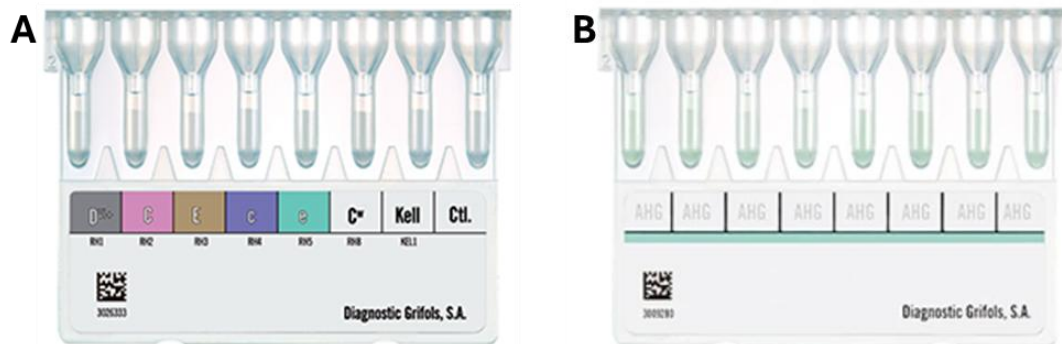


Figura 8: Tarjeta de DG Gel® Rh Pheno+Kell y DG Gel® Coombs: (A) Imagen de tarjeta empleada para el fenotipo de Rh + Kell, fue positivo cuando los eritrocitos no bajan al fondo de la columna (4+), fue negativo cuando cayó al fondo de la columna. Se usó una tarjeta por donador. (B) tarjeta de antiglobulina humana que se empleó para fenotipo de Di^a se empleaba una columna para cada muestra es decir en una tarjeta se evaluaron 8 donadores diferentes (*Imágenes tomadas de Licon.com*).

Para la identificación de Diego a (Di^a) se empleó la tarjeta de antiglobulina humana (figura 8B) DG Gel® Coombs se colocó 50 µL de eritrocitos lavados con 25 µL de anti-Di^a (Anti-Di^a coombs reactive) se incubó por 15 minutos a 37°C una vez que se cumplió el tiempo se tomó la tarjeta y se centrifugó a 990 rpm por 9 minutos, se procedió a la lectura del fenotipo, se tomó como positivos (1+, 2+, 3+ y 4+ en la tarjeta de AGH (antiglobulina humana)).

Extracción de DNA

Se obtuvieron 15 ml de este Buffy coat (capa leucoplaquetaria), una vez que se obtuvo la muestra se homogenizó bien y de ahí se tomaron 3 mL de sangre los cuales se procesaron con Kit de extracción QIAGEN Purigene® Blood Core Kit C (Cat. No. 158389) se agregaron 9 mL de lisis de rojos se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos, cada 5-10 minutos se realizó una homogenización de la muestra, una vez concluido el tiempo se realizó la centrifugación a 3000 rpm

durante 20 minutos, se decantó el material en recolectores de RPBI rojos, sólidos y se agregó nuevamente 7 ml de lisis de rojos, se dejó incubar 20 minutos, se homogenizo cada 5-10 minutos y posterior centrifugación a 3000 rpm por 20 minutos, nuevamente se decantó el sobrenadante y se agregó 3 ml de solución de lisis de blancos, se dejó reposar 24 horas y con vortex se deshizo el botón celular hasta observar una mezcla homogénea de tal manera que el botón celular no se observó. A cada muestra se le colocó 15 µL de enzima RNAsa A, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, posteriormente se incubó a 4°C por 10 minutos, se agregó 1 mL de solución de precipitado de proteína se realizó vortex vigoroso por 20 segundos, se incubó 20 minutos a 4°C, se centrifugo por 20 minutos a 3500 rpm.

En un tubo nuevo debidamente identificado se vertió el sobrenadante del tubo anterior con cuidado sin tocar el pellet café que se formó al fondo del tubo 1, posterior a la centrifugación, se agregó 3 mL de isopropanol puro, frio (4°C), se invirtió el tubo 50 veces gentilmente hasta que se vio el DNA como hilos, se centrifugo por 15 minutos a 3500 rpm, al fondo del tubo se observó el pellet de DNA, se decanta el sobrenadante y se deja secar por unos 30 a 60 minutos, una vez que se observó el tubo seco, se agregó etanol al 70% el cual se requirió frio con ayuda del vortex se resuspendió el botón y se centrifugo a 3500 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar 30 minutos, una vez que se observó seco el tubo se agregó 300 µL de hidratación de ADN, se realizó vortex y se resuspendió hasta que se homogenizo la muestra se colocó el material en tubos eppendorf de 1.5 mL y se almaceno a 4°C hasta su uso (1 semana) en caso de requerir más tiempo previo a su uso se resguardo a -20°C.

Genotipificación mediante ensayos taqman de discriminación alélica para la búsqueda de variantes genéticas

Se realizó con diluciones seriadas del material genético hasta lograr una concentración de 10 ng/dL, todas las muestras que se obtuvieron se cuantificaron mediante espectrofotometría, para verificar pureza del material genético (rango de 1.7-2.0 en relación A260/A280).

Una vez que la concentración del material genético no supero los 10 ng/dL. Se continuo con la preparación de la placa la cual fue de 96 pozos, en cada uno de los pocillos se colocaron 5 µL de muestra (ADN de donadores) y en 10 espacios se colocó agua libre de contaminación estos pozos sin muestra fueron los controles negativos de la placa (figura 9).

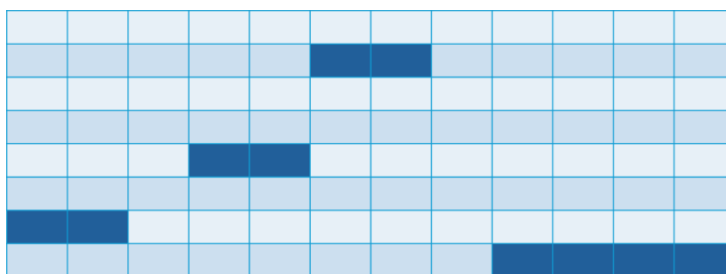


Figura 9: Placa para ensayos taqman: Esta es una imagen representativa del diseño para cada placa de ensayos taqman, este mismo diseño se respetó para cada sonda con las 291 muestras que se analizaron. Los espacios en azul claro representan la muestra de ADN de donadores y los espacios en azul oscuro representan los controles negativos dentro de la placa.

Cuando la placa estaba completa se dejó reposar por una noche, al día siguiente se preparó la mezcla de reacción que cuenta con genotiping (appliedbiosystems taqMan™ Genotiping), agua y la sonda de interés, las sondas que se emplearon fueron: rs2285644 c.2561G>A(Di^a), rs8176058 c.578 G>A(Kell), rs609320 c.307C>G(RH), es importante señalar que parte del manejo de la mezcla de reacción era cuidarla de la luz, ya que la exposición a la luz prolongada puede inactivar a las sondas. Se colocó 5 µL de mezcla de reacción en cada pozo hasta completar los 96 pozos, se realizó una centrifugación de la

placa por 20 segundos a 2000 rpm solo para que todo el mix de reacción se coloque en el fondo de pocillo.

Una vez lista la placa se colocó en el termociclador con el diseño siguiente temperatura de desnaturalización inicial 2:00 minutos a 50°C, desnaturalización 10: 00 min a 95°, fase de hibridación 0:15 a 95°C, fase de elongación 1:00 a 60°C (figura 10). Una vez concluido el proceso de amplificación, se leyó la placa en un fotómetro de microplacas (QuantStudio3), que nos expresará el resultado en un gráfico de puntos que permitió hacer la determinación alélica dentro de esta población (figura 11).



Figura 10:Protocolo de amplificación para sondas taqman: Se observan los distintos ciclos a los que se somete el material genético para el proceso de amplificación para la técnica de sondas taqman, este protocolo se realizó para cada sonda taqman estudiada rs2285644 c.2561C>T(Di^a), rs876058 c.578 C>T(Kell), rs609320 c.307C>T(RH).

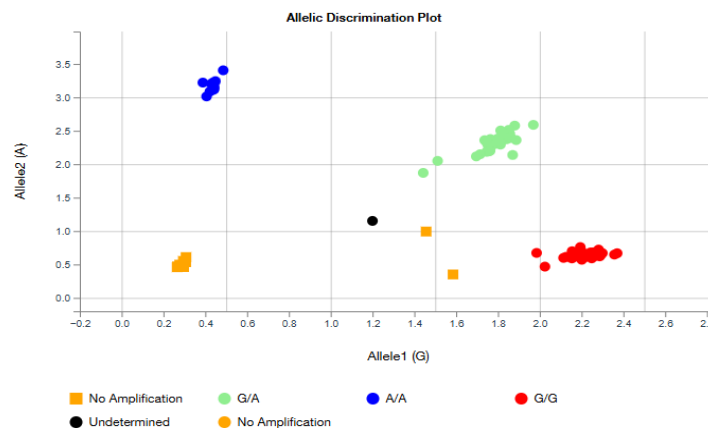


Figura 11: Gráfico de determinación alélica: Este es un gráfico representativo de cómo es que se observó el análisis de los datos al finalizar la lectura de la placa, donde se observan los alelos mayores y menores al igual como la heterogeneidad de la población estudiada.

Análisis estadístico

Se empleó para el análisis estadístico la prueba de exacta de Fisher, se realizó análisis de valores esperados, cálculo de FDR y pruebas pos-hoc para la prueba exacta de Fisher, estos análisis se llevaron a cabo en el programa: software RStudio, 2023.9.1.494, R versión 4.04.5 (2021-03-31) y la recolección de datos se realizó en: Microsoft Excel versión Windows 11.

Resultados:

Este estudio se realizó en el hospital universitario “Dr. José Eleuterio González” de marzo 2025 al septiembre del 2025. Se recopilaron 291 muestras de donadores sanos quienes habitan al norte del país.

Parte de los requisitos era contar con al menos 1 miembro de la familia de los donadores que fuera originario del norte del país, se evaluaron 2 generaciones. Nuestra N final fue de 291 donadores de los cuales fueron 78 mujeres y 213 varones, 91.4% de los donadores eran originarios del norte del país (Nuevo León, Coahuila, San Luis Potosí, Durango, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas) y 8.5% del resto de la república.

Los donadores contaban con una edad de 18 a 65 años, de acuerdo con lo estipulado por la NORMA oficial mexicana NOM-253-SSA1-2012.

Fenotipo de donadores:

Los fenotipos se obtuvieron a partir de técnica de aglutinación por columna, se emplearon eritrocitos lavados de cada donador, con una posterior suspensión de eritrocitos con DG GEL solución, se evaluaron los antígenos de los grupos sanguíneos Kell (K), Diego a (Di^a) y Rh (E, C, e, c), cada donador se identificó con su grupo ABO y su RhD.

De los 291 donadores evaluados obtuvimos los siguientes grupos sanguíneos, a los cuales también se les calculo la prevalencia por grupo sanguíneo ABO, se obtuvieron los siguientes grupos sanguíneos: A1: 56 donadores (19.24%), A2: 17 (5.84%), A1B: 5 (1.71%), A2B: 1 (0.34%), B: 24 (8.24%), O: 188 (64%) (figura 12). En cuanto Rh D positivo: 274 (94.15%), RhD negativo: 17 (5.8%) (figura 13).

Sistema ABO en poblacion del norte del pais

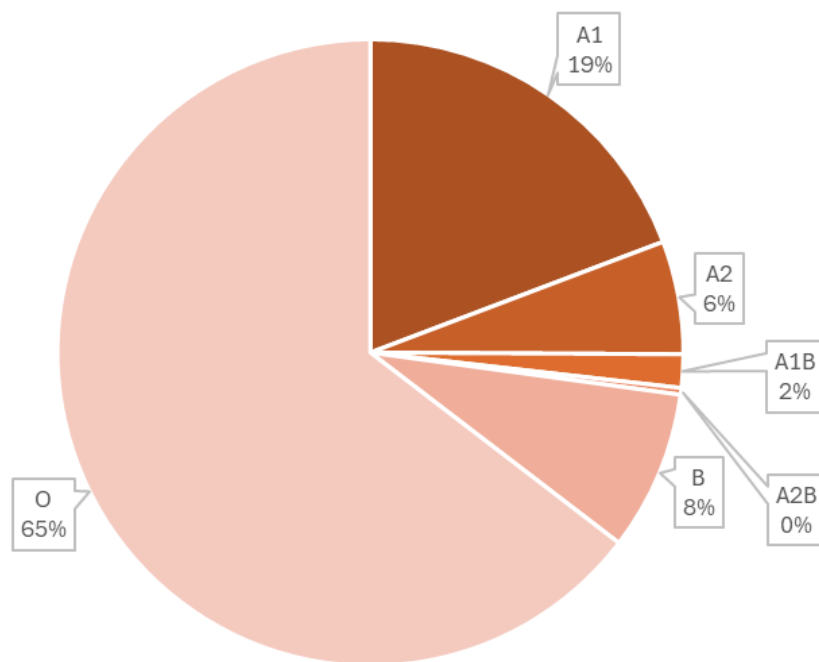


Figura 12:Prevalencia de grupo sanguíneo ABO en donadores del norte del país: Se observa en la gráfica de pastel la prevalencia del grupo ABO obtenido en la población estudiada (291 donadores), la prevalencia mayor fue la de O con una prevalencia del 64%, seguido de A1: 19.24% en comparación con el resto de los grupos sanguíneos.

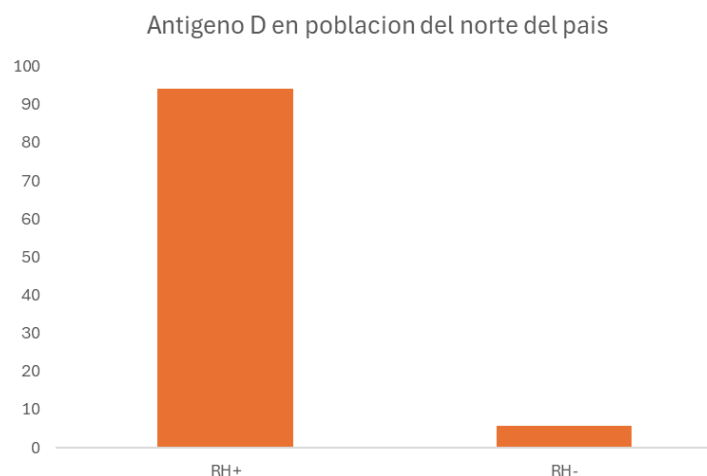


Figura 13:Prevalencia de RhD en población del norte del país: En esta gráfica se aprecia la prevalencia del RhD en población del norte del país, donde se observó una mayor prevalencia del antígeno D positivo de 94.15% en comparación con los negativos que son del 5.8%.

Para la determinación del resto de los sistemas sanguíneos se evaluaron con las tarjetas DG Gel® Rh Pheno+Kell y DG Gel® Coombs se obtuvieron los datos de acuerdo con la aglutinación de las tarjetas y se vacio la inforacion en una base de datos realizada en Excel Microsoft 365 se empleo windos 11, de esta manera se asigno el tipo sanguíneo para Rh E/e, C/c empleando la nomenclatura de Weiner, esto nos permitio conocer la prevalencia para cada antígeno y manejar mas facilmente la información, de igual manera se coloco en esta base de datos la presencia de aglutinación para Kell (K), en cuanto a Diego a (Di^a) se evaluó con el anti-suero para el antígeno en la tarjeta de coombs, donde se observo la presencia o ausencia del antígeno con aglutinación en la columna de gel, posterior a la obtención de dato se realizó un análisis con para la conocer las prevalencias dentro de la población del norte del país para cada sistema sanguíneo que se evaluó en el presente trabajo, para Rh los resultados se muestran a continuación en la siguiente tabla 5, con una representación gráfica de los resultados en la (figura 14). La prevalencia para Rh mostró ser mayor en R1R1 (25.1%), seguido de R1r (24.7%) y R1R2 (24.4%) con una menor prevalencia para R2r (7.9%), R2R2 (6.2%), rr (5.2%), R1Rz (3.1%) y R0r (2.1%),

para K la prevalencia dentro de este grupo estudiado fue de 1.7% y para Dia fue de 9.3% en población del norte del país.

(A)

Fenotipo	Notación de Weiner	Número de donadores
CCDee	R1R1	73
CcDEe	R1R2	71
CcDee	R1r	72
ccDee	R0r	6
CCDEe	R1Rz	9
ccDEE	R2R2	18
ccDEe	R2r	23
CcDEE	R2Rz	1
CCDEE	RzRz	1
Ccdee	rr	15
Ccdee	r'r	1
ccdEe	r''r	1

(B)

Fenotipo	Numero de donadores
K	5
Di ^a	27

Tabla 5: Fenotipos para Rh, K y Dia: En las siguientes tabla se muestra el fenotipo que se encontró en cada donador, **(A)** En la tabla se hace una relación con la nomenclatura de Weiner, se colocó el número de donadores encontrados en la población, es importante señalar que a pesar de que los primeros tres fenotipos dentro de esta tabla son los de mayor prevalencia, entre estos mismos hay diferencias de antígenos, R1R1 carece del antígeno E característica que comparte con R1r, sin embargo para el antígeno c hay una diferencia entre estas dos mientras el primero carece del antígeno R1r cuenta con él. **(B)** se observa los fenotipos encontrados para K y Di^a dentro de nuestra población.

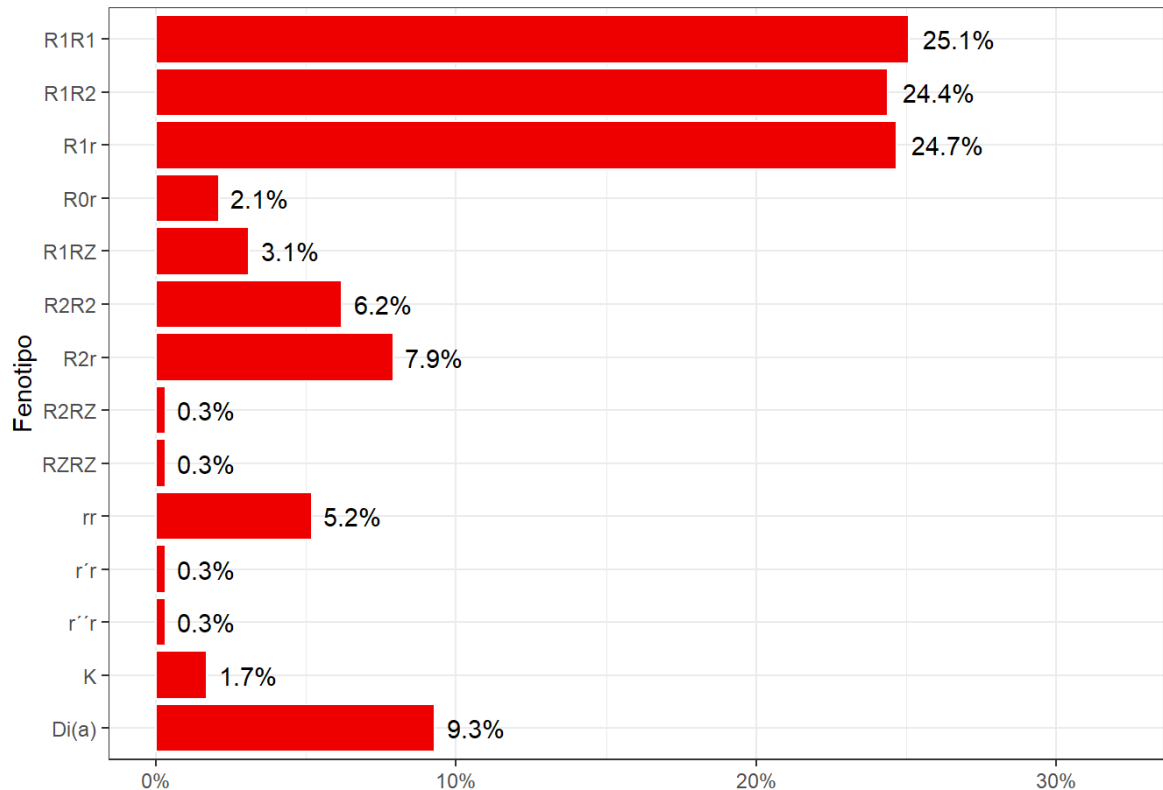


Figura 14: Prevalencias de antígenos de superficie eritrocitaria Rh, K y Dia: En la presente gráfica se observan las prevalencias para cada antígeno de superficie eritrocitaria dentro de nuestra población, para Rh el antígeno con mayor prevalencia en población del norte del país es R1R1 y los de menor prevalencia R2RZ, RZRZ, r'r, r''r, la prevalencia para K es de 1.7% y para Di^a es de 9.3%..

Genotipificación mediante ensayos taqman de discriminación alélica para la búsqueda de variantes genéticas

La búsqueda de variantes genéticas de un solo nucleótido se realizó mediante ensayos Taqman con las variantes rs2285644 c.2561G>A(Di^a), rs876058 c.578 G>A(Kell), rs609320 c.307C>G(RH), los datos se recolectaron en Excel Microsoft 365 se empleo windos 11, una vez generada la información de la base de datos se realizó el análisis en el software RStudio, 2023.9.1.494, R versión 4.04.5 (2021-03-31) con prueba exacta de Fisher para relacionar el genotipo con el fenotipo. Se calculó la frecuencia para cada alelo y para cada genotipo dentro de

nuestra población (tabla 6), Se realizó el análisis estadístico para cada variante con prueba exacta de Fisher.

(A)

Gen	SNV	Alelos	Frecuencia (n)
RHCE	rs609320	C	75.4% (439)
		G	24.6% (143)
KEL	rs8176058	G	100% (582)
		A	0
DIEGO	rs2285644	G	96.4% (561)
		A	3.6% (21)

(B)

Gen	SNV	Genotipo	Frecuencia (n)
RHCE	RS609320	CC	57.7 % (168)
		CG	35.4% (103)
		GG	6.9% (20)
KEL	rs8176058	GG	100% (291)
		GA	0
		AA	0
DIEGO	rs2285644	GG	92.8% (270)
		AG	7.2% (21)
		AA	0

Tabla 6: Frecuencias para alelos y genotipo para las variantes rs2285644 c.2561C>T(Dia), rs876058 c.578 C>T(Kell), rs609320 c.307C>T(RH): Se observa la frecuencia para cada variante (A) se observa la frecuencia para cada alelo de las variantes estudiadas dentro de población del norte del país n:291 personas. (B) Se observan las frecuencias de los genotipos estudiados, es importante señalar que en población del norte del país no se encuentra para el sistema sanguíneo Kell donadores homocigotos para A A, ni heterocigotos para G A, para el sistema sanguíneo Diego a, no se observa en nuestra población homocigoto para A A.

Sistema sanguíneo Diego a (Dia)

Para la variante rs2285644, la cual corresponde al sistema sanguíneo de Diego a (Di^a) mostro que la población del norte del país es homocigota para el alelo mayor (G G) que define la ausencia del antígeno a en este sistema sanguíneo, en los donadores heterocigotos (A G) se observa una frecuencia del 77.8% de antígeno a positivo, no se observa homocigoto para el alelo A A. Esto es significativo ya que el análisis de exactitud de Fisher otorga un valor de $p < 2.2 \times 10^{-16}$ y un odds ratio: infinito (IC: 95%) (figura 17).

Sistema sanguíneo Kell (K)

Para el antígeno Kell (rs8176058) no se encontró evidencia de alelos menores dentro de esta población ya que todos los donadores eran homocigotos para el alelo mayor (G G).

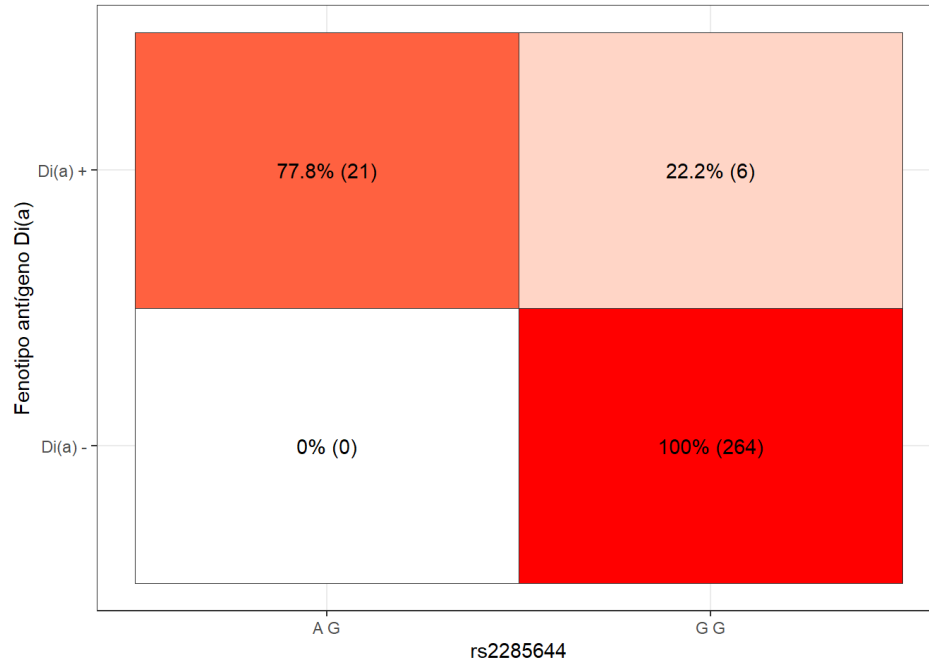


Figura 15: Relación de fenotipo con genotipo (rs2285644) para Dia positivo: Se observa un mapa de calor para la variante rs2285644, en nuestra población no hay presencia de población homocigota para el alelo menor (A A), sin embargo, podemos observar donadores heterocigotos para esta variante (A G) que son los que presentan el antígeno de superficie eritrocitaria Dia positivo.

Sistema sanguíneo Rh (C/C, E/e)

Se evaluó la frecuencia de la variante para Rh (rs609320) y se relacionó con el fenotipo encontrado para Rh (C/c) y (E/e) se realizaron dos mapas de calor para la variante rs609320, para de esta manera determinar su relación con el fenotipo de los 4 antígenos de superficie eritrocitaria dentro del sistema sanguíneo Reshus figura 16.

Para el análisis de la variante rs609320 que es responsable de la expresión de antígenos dentro del sistema Rh se observó lo siguiente hay una relación entre la expresión del antígeno cc y la expresión del genotipo C C, como se conserva en la figura 16A, mientras que se aprecia una mejor relación entre la misma variante y la expresión del fenotipo E/e, ya que la presencia del genotipo C C

define al fenotipo e y la expresión del genotipo G G define la expresión del fenotipo E como se aprecia en la figura 16B.

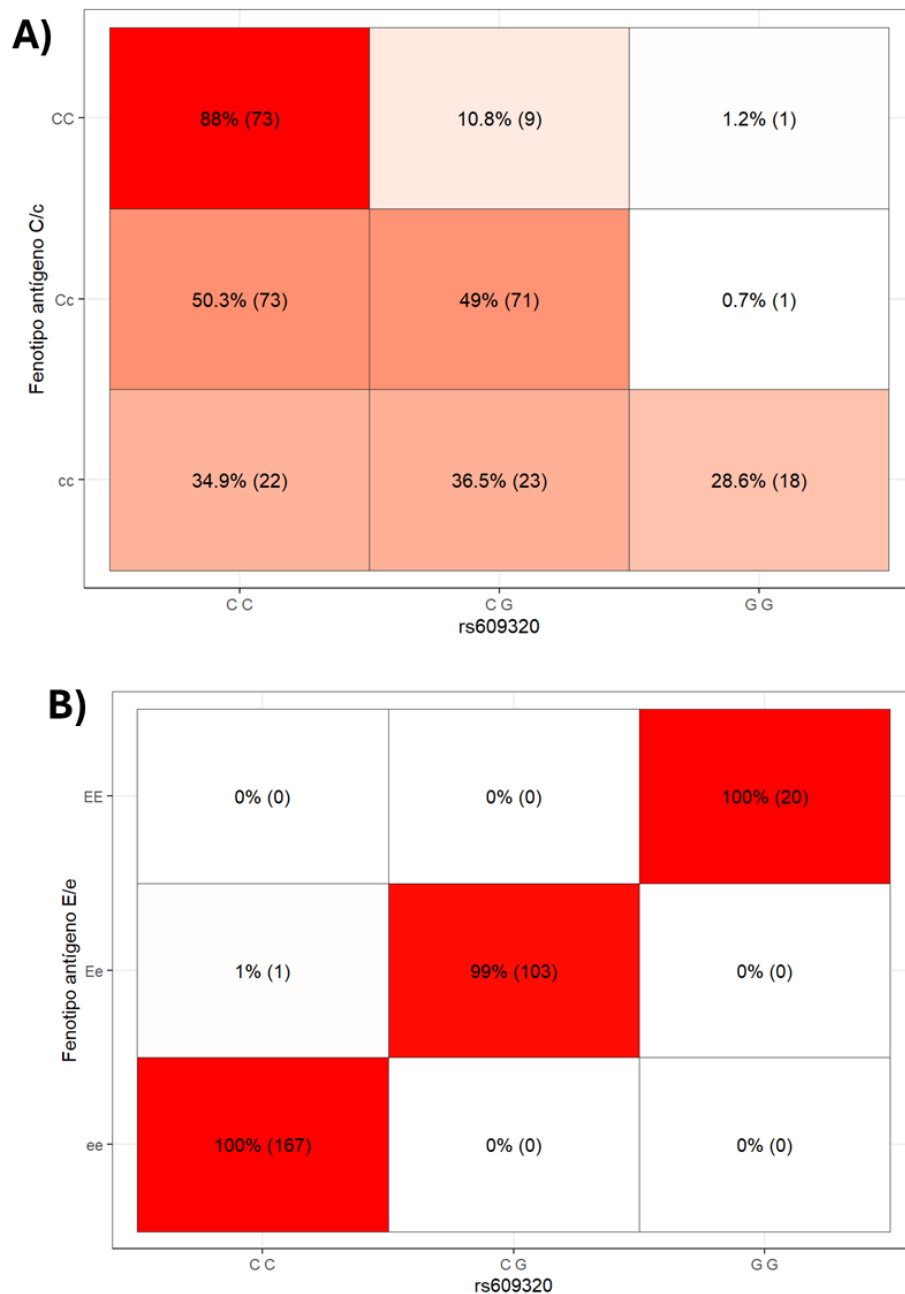


Figura 16: Mapa de calor para el fenotipo C/c y E/e con la variante rs609320: A) Se observa la relación de la variante con el antígeno C/c donde se observa una asociación entre el genotipo C C y la expresión del antígeno cc, **B)** Se observa la asociación de la variante con la expresión del antígeno E/e, donde la expresión del genotipo si define la expresión del fenotipo $p < 2.2 \times 10^{-16}$.

Discusión:

Este estudio demuestra la prevalencia del antígeno Diego (Di^a) en población del norte del país y es la primera caracterización que se realiza en nuestra población, se estudiaron donadores del Hospital universitario “Dr. José Eleuterio González”, la prevalencia de este antígeno en esta población fue del 9.3% la cual es superior al 5%, lo que permite aceptar la hipótesis alterna, esto demuestra que al norte del país existe una prevalencia mayor del antígeno de superficie eritrocitaria Di^a , lo que hace importante su identificación en donadores dentro de nuestro hospital como parte un fenotipo extendido.

Para conocer la prevalencia de la variante asociada a este sistema (Di^a) la variante rs2285644 del gen SLC4A1 mostro una frecuencia alélica 3.6% para el alelo menor (A) y de 96.4% para el alelo mayor (G) con una frecuencia genotípica de 92.8% para G G y 7.2 para A G, sin encontrarse donadores homocigotos para A, este patrón genotípico es determinante para la expresión del fenotipo de Di^a , posee una asociación estadística de $p < 2.2 \times 10^{-16}$ por prueba exacta de Fisher, lo que apoya el uso de la genotipificación en bancos de sangre que podría ahorrar costos y mejorar la terapia transfusional, dando así inicio al uso de la medicina de precisión.

En un estudio realizado en ecuador se observa que la prevalencia del antígeno Di^a es muy variable dentro de la población latina e incluso dentro de una región en específico ya que la prevalencia reportada dentro de población ecuatoriana va de 25% a 8% (Góngora et al , 2018), en población brasileña la prevalencia dentro de nativos es de 11.8 -6.8% (Rodrigues et al, 2020) y en población europea menos del 1% (Fu, et al, 2022) Esto solo refuerza la importancia de conocer el antígeno dentro de las diferente áreas geográficas de México, para de esta manera conocer una prevalencia de antígeno dentro de toda la población mexicana.

En cuanto al sistema Kell su prevalencia dentro de la población del norte del país es de 1.7%, la variante asociada al sistema Kell la rs8176058 no se identificó en nuestra población lo que sugiere que en población mexicana específicamente al

norte del país no existe esta variante. La prevalencia del antígeno K en población europea, asiática reportada es de 8-9%, asociada a la variante rs8176058 (A) al contrario con su alelo alternativo que define el antígeno k el cual es superior al 90% (*Owaidah et al, 2020, Reid 2011*), estas leves diferencias de lo reportado y lo encontrado dentro de nuestra población sugiere que esta variante es de muy baja frecuencia en población mexicana, lo que quizás se vea evidenciado con una muestra mayor de la población estudiada.

Finalmente, en cuanto a la prevalencia de los antígenos del sistema Rh, los fenotipos mas frecuentes fueron R1R1 (CCDee) 25.1%, R1r (CcDee) 24.7%, R1R2 (CcDEe) 24.4%, en nuestra población contamos con una prevalencia de 5.2% del fenotipo rr este fenotipo es D negativo, la variante perteneciente a esta sistema es la rs609320 la cual es determinante para la expresión del antígeno E/e con un valor de p de $<2.2 \times 10^{-16}$ la frecuencia alélica para C 75.4% y para G 24.6%, la frecuencia para su genotipo fue de C C 57.7% el cual se asocia con la expresión del fenotipo e, para el fenotipo E su genotipo es G G la frecuencia dentro de esta población es de 6.9%, y los heterocigotos G C 35.4% lo que determina la expresión Ee, esta variante no presenta una relación con el antígeno C/c esta determinado por la variante rs676785 que ofrece una asociación reportada para el antígeno C de 68% y 80% para c (*Ristovska et al, 2022*).

La identificación por genotipo en banco de sangre marca la importancia al momento de uso de unidades sanguíneas en el manejo de la transfusión intra uterina, ya que la adecuada identificación del fenotipo del producto y el conocimiento inmunológico de la madre permitirán el uso correcto de unidades sanguíneas por ejemplo en el caso de una madre con anti c y el feto posee un genotipo RHCE*c, permite la identificación de unidades sanguíneas que carezca de antígeno c (*Reid, 2009*), mejorando el manejo transfusional del producto.

El uso del genotipo tanto del receptor como del donador permiten una mejor selección de las unidades sanguíneas a transfundir, lo que disminuye la posibilidad de generar aloinmunización (*Wu et al, 2002*), en general los genes

dentro de los grupos sanguíneos son polimórficos y con distribución alélica diferente dentro de cada población y grupo étnico por esto la importancia de este tipo de estudios dentro de cada población (*Flores et al 2014*).

Conclusión:

El antígeno Dia la prevalencia es mayor a lo esperado que era del 5%, esto reafirma la importancia clínica de este antígeno dentro de población del norte del país.

El uso de técnicas moleculares dentro de un banco de sangre es de vital importancia para la identificación adecuada del fenotipo sanguíneo ya que las técnicas habituales de fenotipo pueden ser imprecisas y aumentar el riesgo de aloinmunización.

Es necesario el estudio de nuestra población para definir cual es el comportamiento de las prevalencias reales de sistema sanguíneo dentro de población mexicana, este conocimiento podría impulsar iniciativas para la identificación de grupos sanguíneos raros, lo que facilitaría la identificación de donadores para las necesidades específicas de cada paciente.

Las limitaciones de este estudio fueron el tamaño de la muestra lo que pudo dificultar la identificación de variantes de muy baja frecuencia, de igual manera el estudio de más variantes podría ser un ejercicio que enriqueciera el presente trabajo que es el primero realizado en población mexicana del norte del país, lo que podría ser un antecedente importante para conocer la diversidad genética dentro de los grupos sanguíneos.

Referencias

1. Alcaraz-López, J. L., Bonilla-Zavala, R., Luna-González, J., Montes-Ledesma, M., Sánchez-Huerta, R., & Chávez-Durán, M. Á. (2007). Investigación en el trabajo diario de inmunohematología. Fenotipos eritrocitarios y protocolo para encontrar sangre compatible en pacientes con aloanticuerpos antieritrocitos. *Gaceta médica de México*, 143(S2), 23-27.
2. Alvarado, D. X. A., Sánchez, C. A. P., & Gallegos, M. D. N. (2020). Determinación de antígenos del sistema abo, rh (DVI+, DVI-, C, c, e, E, CW) kell y coombs directo por microaglutinación en técnica de gel en pacientes pediátricos. *RECIMUNDO: Revista Científica de la Investigación y el Conocimiento*, 4(4), 30-39.
3. Avent, N. D., & Reid, M. E. (2000). The Rh blood group system: a review. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(2), 375-387.
4. Bégat, C., Bailly, P., Chiaroni, J., & Mazières, S. (2015). Revisiting the Diego blood group system in Amerindians: evidence for gene-culture comigration. *PLoS One*, 10(7), e0132211.
5. Daniels, G. (2009). The molecular genetics of blood group polymorphism. *Human genetics*, 126(6), 729-742.
6. Fu, Y., Liu, Y., Yang, Z., An, Y., Su, J., Hu, S., & Luo, L. (2022). Neonatal hemolytic disease due to anti-Diegoa antibody: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 16(1), 274.
7. Góngora, F. B., & Chiriboga-Ponce, R. F. (2018). Frequency of antigens and alloantibodies of Diego system in blood. *Gac Med Mex*, 154(1), 16-21.
8. González, H. A. B. (2024). Hacia un registro nacional de donantes con fenotipos eritrocitarios poco comunes y de interés en medicina transfusional. *Revista Mexicana de Medicina Transfusional*, 16(S1), s43-46.

9. Haffener, P. E., Al-Riyami, A. Z., Al-Zadjali, S., Al-Rawahi, M., Al Hosni, S., Al Marhoobi, A., ... & Leffler, E. M. (2025). Characterization of blood group variants in an Omani population by comparison of whole genome sequencing and serology. *Transfusion*, 65(10), 1922-1934.
10. Halawani, A. J., Abdalla, S. E. B., Meshi, A., Shamlan, G., & Habibullah, M. M. (2024). Genetic background of Diego blood group in Saudi Arabia. *Journal of King Saud University-Science*, 36(11), 103571.
11. Hamad, A. (2025, abril 14). *Single nucleotide variants*. Genomics Education
12. International Society of Blood Transfusion. (s.f.). *Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology*. Recuperado el 11 de julio de 2025, de https://www-isbtweb-org.translate.goog/isbt-working-parties/rcibgt.html?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=tc
13. International Society of Blood Transfusion. (s.f.). *Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology*. Recuperado el 11 de julio de 2025, de https://www-isbtweb-org.translate.goog/isbt-working-parties/rcibgt.html?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=tc
14. Jarolim, P., Rubin, H. L., Zakova, D., Storry, J., & Reid, M. E. (1998). Characterization of Seven Low Incidence Blood Group Antigens Carried by Erythrocyte Band 3 Protein: Presented in part at the 49th Annual Meeting of the American Association of Blood Banks, Orlando, FL, October 6-10, 1996. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 92(12), 4836-4843.
15. Kulkarni, S., & Maru, H. (2020). Extended phenotyping of blood group antigens: Towards improved transfusion practices. *Global Journal of Transfusion Medicine*, 5(2), 120-125.
16. Le Van Kim, C., Colin, Y., & Cartron, J. P. (2006). Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood reviews*, 20(2), 93-110.

17. Lee, S., Russo, D., & Redman, C. (2000). Functional and structural aspects of the Kell blood group system. *Transfusion Medicine Reviews*, 14(2), 93-103.
18. Lee, S., Russo, D., & Redman, C. M. (2000, April). The Kell blood group system: Kell and XK membrane proteins. In *Seminars in hematology* (Vol. 37, No. 2, pp. 113-121). WB Saunders.
19. Lee, S., Wu, X., Reid, M., & Redman, C. (1995). Molecular basis of the K: 6,-7 [Js (a+ b-)] phenotype in the Kell blood group system. *Transfusion*, 35(10), 822-825.
20. Llano, Ó. G. 14 Enfermedad hemolítica del recién nacido.
21. McGowan, E. C., O'Brien, H., Sarri, M. E., Lopez, G. H., Daly, J. J., Flower, R. L., ... & Hyland, C. A. (2024). Feasibility for non-invasive prenatal fetal blood group and platelet genotyping by massively parallel sequencing: a single test system for multiple atypical red cell, platelet and quality control markers. *British Journal of Haematology*, 204(2), 694-705.
22. Muñiz-Díaz, E. (2022). La transfusión de hematíes de fenotipo idéntico: ¿a quién y cuándo?. *Revista Mexicana de Medicina Transfusional*, 14(S1), s85-91.
23. Nagervadze, M., Tsintsadze, I., Akhvlediani, L., Koiava, T., Tskvitinidze, S., Khukhunaishvili, R., & Koridze, M. (2021). ABO system combination with Rh, Kell and MN group in Georgian blood donors. *American Journal of Blood Research*, 11(2), 132.
24. Owaidah, A. Y., Naffaa, N. M., Alumran, A., & Alzahrani, F. (2020). Phenotype frequencies of major blood group systems (Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, P, Lewis, and Lutheran) among blood donors in the Eastern Region of Saudi Arabia. *Journal of Blood Medicine*, 59-65.
25. Perry, G. H., Xue, Y., Smith, R. S., Meyer, W. K., Çalışkan, M., Yanez-Cuna, O., ... & Lee, C. (2012). Evolutionary genetics of the human Rh blood group system. *Human genetics*, 131(7), 1205-1216.

26. Petit, F., Minnai, F., Chiaroni, J., Underhill, P. A., Bailly, P., Mazières, S., & Costedoat, C. (2019). The radial expansion of the Diego blood group system polymorphisms in Asia: mark of co-migration with the Mongol conquests. *European Journal of Human Genetics*, 27(1), 125-132.
27. Reid, M. E. (2009). Transfusion in the age of molecular diagnostics. *ASH Education Program Book*, 2009(1), 171-177.
28. Reid, M. E., & Denomme, G. A. (2011). DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfusion and apheresis science*, 44(1), 65-72.
29. Ristovska, E., Bojadjeva, T. M., Velkova, E., Dimceva, A. H., Todorovski, B., Tashkovska, M., ... & Bosevski, M. (2022). Rare blood groups in ABO, Rh, Kell systems—Biological and clinical significance. *prilozi*, 2022, 0021.
30. Rodrigues, M. M. D. O., Höher, G., Waskow, G., Hutz, M. H., Lindenau, J. D. R., Petzl-Erler, M. L., ... & Fiegenbaum, M. (2021). Blood groups in Native Americans: a look beyond ABO and Rh. *Genetics and Molecular Biology*, 44(2), e20200255.
31. Sandler, S. G., Chen, L. N., & Flegel, W. A. (2017). Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *British journal of haematology*, 179(1), 10-19.
32. Soyano, A., & de Soyano, A. M. (2014). El antígeno Diego alcanza los 60 años de edad: su descubrimiento y desarrollo. *Gaceta Médica de Caracas*, 122(1), 46-52.
33. Tanwarawutthikul, P., Intharanut, K., Mitundee, S., & Nathalang, O. (2022). RHCE* E and RHCE* e genotype incompatibility in a southern Thai Muslim population. *Asian Journal of Transfusion Science*, 16(1), 50-55.
34. Thierry P. and Franz F. (2020). The Rh System. In American Association of Blood Banks (Ed.), *Technical manual* (20th ed. Capítulo 11 The Rh System). American Association of Blood Banks
35. Vodicka, R., Bohmova, J., Holuskova, I., Krejcirikova, E., Prochazka, M., & Vrtel, R. (2021). Risk minimization of hemolytic disease of the fetus and

- newborn using droplet digital PCR method for accurate fetal genotype assessment of RHD, KEL, and RHCE from cell-free fetal DNA of maternal plasma. *Diagnostics*, 11(5), 803.
36. Wagner, F. F., & Flegel, W. A. (2000). RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 95(12), 3662-3668.
 37. Waskow, G., Rodrigues, M. M. D. O., Höher, G., Onsten, T., Lindenau, J. D. R., Fiegenbaum, M., & Almeida, S. (2020). Genetic variability of blood groups in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 43(2), e20180327.
 38. Westhoff, C. M. (2004). The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion*, 44(11).
 39. Wu, G. G., Su, Y. Q., Yu, Q., Jin, S. Z., & Zhao, T. M. (2002). Development of a DNA-based genotyping method for the Diego blood group system. *Transfusion*, 42(12), 1553-1556.
 40. Xu, X. G., He, J., He, Y. M., Tao, S. D., Ying, Y. L., Zhu, F. M., ... & Yan, L. X. (2011). 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 Sanguinis*, 100(3), 317-321.
 41. Yu, L. C., Twu, Y. C., Chang, C. Y., & Lin, M. (2001). Molecular basis of the Kell-null phenotype: a mutation at the splice site of human KEL gene abolishes the expression of Kell blood group antigens. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 10247-10252.