

# Identificación de la caja RH híbrida en el fenotipo Rh negativo de sujetos del valle de México

Héctor Alfredo Baptista-González,<sup>a\*</sup> Fany Rosenfeld-Mann,<sup>b</sup> Rocío Trueba-Gómez,<sup>b</sup> Elba Reyes-Maldonado<sup>c</sup> y Luis A. Jiménez-Zamudio<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Coordinación de Hematología Perinatal, Subdirección de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Perinatología, SSA. Medicina Transfusional y Banco de Sangre, Fundación Clínica Médica Sur, México D.F., México

<sup>b</sup>Coordinación de Hematología Perinatal, Subdirección de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Perinatología, SSA. México D.F., México

<sup>c</sup>Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 7 de enero de 2010

Aceptado: 19 de enero de 2010

## RESUMEN

**Introducción:** La prevalencia de los alelos del gen RhD y RhCE depende de la mezcla génica. Nuestro objetivo fue determinar el mecanismo molecular predominante en sujetos RhD negativo residentes en el valle de México de acuerdo con el fenotipo de RhCE. **Métodos:** Se seleccionaron hombres y mujeres RhD negativo, y mediante el método de PCR-RLFP con PstI se identificó la caja Rh híbrida.

**Resultados:** Se incluyeron 216 sujetos. Los fenotipos del RhD fueron cdeee en 179 casos (82.8%), Ccdee en 15 (11.6%), ccdEe en siete (3.2%), CcdEe en cuatro (1.9%) y CcdEE en uno (0.5%). En cinco casos no amplificó la caja RhD híbrida (2.3%), 21 casos fueron heterocigotos (9.7%) y 188 casos homocigotos (87%). La condición homocigota de la caja híbrida RhD fue más frecuente en aquellos con fenotipo cdeee (87%). La frecuencia alélica del gen de la caja RhD híbrida fue de 0.928. La frecuencia del haplotipo Rhcc es mayor en los sujetos bajo la condición homocigota para la caja RhD híbrida ( $\chi^2 = 4.658$ ,  $p < 0.05$ ).

**Conclusiones:** En la población del valle de México, la delección del gen RhD es el mecanismo molecular principal para generar la condición RhD negativo y depende de la mezcla blanca-europea.

## Palabras clave:

Gen RhD, caja híbrida RhD, antígeno RhD, antígeno RhCE, grupo sanguíneo RhD negativo

## SUMMARY

**Background:** The prevalence of the RhD and RhCE gene alleles is related to the ethnic mixture. The aim of this report is to describe the predominant molecular mechanisms in RhD negative subjects residents from Mexico's valley according to the phenotype of RhCE.

**Methods:** Blood samples from RhD negative women and men were studied. The RhD/RhCE phenotype was identified by hemagglutination and Rh hybrid box by PCR-FRLP with PstI.

**Results:** 216 subjects were included. The RhD phenotypes were cdeee in 179 cases (82.8%), Ccdee in 15 cases (11.6%), ccdEe in seven (3.2%), CcdEe in four (1.9%), and CcdEE in a single subject (0.5%). In five cases, RhD hybrid box was not amplified (2.3%), 21 cases were hemizygotes (9.7%), and 188 cases homozygotes (87%), for RhD hybrid box. The homozygote condition was more frequent in those individuals with phenotype cdeee (87%). The allelic frequency of RhD hybrid box was 0.928. The frequency of Rhcc haplotype was higher in those subjects homozygotes for RhD hybrid box ( $\chi^2 = 4.658$ ,  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** In this population, RhD gene deletion is the main molecular mechanism to generate to RhD negative condition and this depends on the European mixture.

## Key words:

Gene RhD, RhD hybrid box Rh-Hr, RhD antigen, RhCE antigen, Rh negative blood group

## Introducción

El grupo sanguíneo Rh es uno de los sistemas eritrocitarios más complejos, pues a la fecha se han identificado al menos 50 antígenos y su variabilidad antigénica no está

representada por la diversidad serológica.<sup>1</sup> El gen RhD codifica para la proteína RhD y el gen RhCE para la proteína RhCE que expresa los antígenos C, c, E y e.<sup>2</sup> Estos dos genes son altamente homólogos (alrededor de 97 %) y se ubican en el brazo corto del cromosoma 1, en la región 34 de la banda 11

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Héctor Alfredo Baptista-González. Coordinación de Hematología Perinatal, Subdirección de Investigación Clínica, Torre de Investigación, Instituto Nacional de Perinatología, Montes Urales 800, Col. Lomas Virreyes, Del. Miguel Hidalgo, 11000 México D.F., México. Correo electrónico: baptista@infosel.net.mx

(1p34.11). Están orientados en posición opuesta, enfrentados en su posición 3' y separados por el gen SMP1, sin relación funcional con los genes del Rh.<sup>3</sup> El gen RhD está flanqueado por dos secuencias de ADN de aproximadamente 9000 pares de bases (pb) que terminan en la región 5' y 3', en las llamadas cajas Rh (superior o *upstream* e inferior o *downstream*). Las cajas Rh comparten más de 98 % de homología y contienen una región de identidad de 1463 pb, altamente homóloga, con excepción de una inserción poli-T de 4 pb.<sup>3</sup>

La ausencia de expresión de la proteína RhD identifica al fenotipo de los sujetos como RhD negativo. La delección del RhD es el mecanismo dominante en sujetos RhD negativo de origen europeo caucásico,<sup>4</sup> y ocurre por el entrecruzamiento de la caja superior e inferior, formando una nueva estructura: la caja Rh híbrida. El punto de ruptura se localiza en la región de identidad de las cajas del Rh y se explica por un entrecruzamiento desigual con otros elementos de alta homología. La caja Rh híbrida es idéntica en su terminación 5' a la caja Rh superior y en su terminación 3' a la caja Rh inferior.<sup>3</sup> La presencia homocigota de la caja Rh híbrida ocurre en más de 99 % de la población RhD negativo de origen caucásico.<sup>2</sup> Los restantes mecanismos moleculares que generan la condición RhD negativo incluyen la formación del pseudogen RhD $\psi$ ,<sup>5</sup> presente en cerca de la mitad de la población de origen negro africano, y otro grupo heterogéneo que involucra diversas variantes del gen híbrido RhD-CE está presente hasta en 90 % de la población RhD negativo de origen asiático.<sup>5,6</sup>

El sistema Rh posee ocho haplotipos conocidos, los cuales se forman mediante una serie de eventos de duplicación, mutación y recombinación (Figura 1). El haplotipo *cDe* es la forma ancestral y más común en población africana negra. Los haplotipos *CDe* y *cDE* son más frecuentes en población

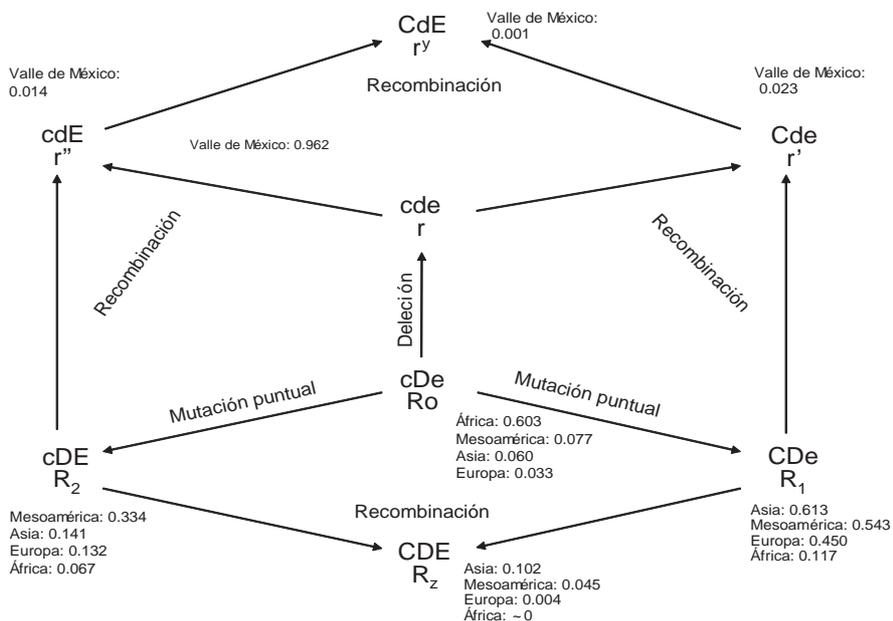
mesoamericana.<sup>7</sup> Por delección o inactivación de *cDe* se forma el haplotipo *cde*. Este último alelo, mediante recombinación con el haplotipo *CDe* forma el alelo *Cde* y con el alelo *cDE* forma *cdE*; finalmente de la recombinación de los haplotipos *Cde* y *cdE* forma el alelo *CdE*, cuya prevalencia es extremadamente baja debido a su reciente desarrollo evolutivo.<sup>8,9</sup>

La presencia de la condición RhD negativo aparece en la población mesoamericana como una evidencia del mestizaje<sup>7</sup> y varía de 0 a 3 % en la población mexicana.<sup>10</sup> Esto es resultado del flujo de genes provenientes de la colonización europea, la africana negra relacionada con los esclavos traídos a México y en menor medida, la de grupos orientales, especialmente chinos y japoneses. En términos generales, la distribución de los antecedentes étnicos africano negro, indígena y europeo caucásico para la República Mexicana es de 0.106, 0.562 y 0.377, respectivamente.<sup>7</sup>

Bajo esta perspectiva, la prevalencia de los alelos del gen RhD y RhCE y haplotipos de las proteínas RhD y RhCE son dependientes de la mezcla génica diversa, que en nuestro caso conforman al grupo mestizo-mexicano. Así, el objetivo de este informe es describir los mecanismos moleculares predominantes para generar la condición RhD negativo en su concurrencia con los diversos fenotipos del RhCE, en un grupo de residentes del valle de México con grado variable de mestizaje.

## Métodos

Se seleccionaron mediante un modelo de muestreo no probabilístico discrecional a sujetos RhD negativo reclutados como donadores de sangre del Servicio de Medicina



**Figura 1.** Evolución de los alelos del Rh en el humano. Los números representan la frecuencia alélica para distintos grupos étnicos. Las líneas el sentido en que se continuó el cambio en el polimorfismo y el mecanismo molecular participante. Modificado de Carrit<sup>1</sup> y Tax,<sup>2</sup> con datos de Long,<sup>3</sup> Tiburcio<sup>4</sup> y Lisker.<sup>5</sup>

Transfusional y Banco de Sangre de Médica Sur, y de pacientes RhD negativo atendidos en el Instituto Nacional de Perinatología, para constituir un banco de ADN.

Se incluyeron consecutivamente a los sujetos RhD negativos, independientemente de la condición de edad o sexo. Se excluyeron los sujetos en quienes aplicaron los criterios de transfusión eritrocitaria reciente, antecedente de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, citopenia de origen inmune y exposición reciente a inmunosupresores. Se eliminaron las muestras donde la recolección de ADN leucocitario fue insuficiente, inadecuada o no rastreable. Se registraron como variables de resultado al mecanismo molecular de generación de la condición RhD negativo (deleción del gen u otro mecanismo). Como variable dependiente a la expresión fenotípica del RhD y como variable concurrente a la condición del fenotipo RhCE.

A partir de la punción venosa se recolectaron las muestras de sangre en un tubo con EDTA como anticoagulante. Se conservó la rastreabilidad de la muestra manteniendo confidencial el nombre del sujeto de estudio. Las muestras fueron procesadas en el Instituto Nacional de Perinatología para la extracción y conservación del ADN y desarrollo de las pruebas moleculares. Se identificaron las muestras mediante un número consecutivo sin los datos del sujeto, para ser integradas al banco de ADN. La identificación del fenotipo de los sujetos de estudio se realizó en el Servicio de Medicina Transfusional y Banco de Sangre del Hospital Médica Sur.

Para definir la condición fenotípica del sujeto como RhD positivo o negativo, se identificó el antígeno RhD, mediante el método de aglutinación eritrocitaria en tubo con una mezcla de anticuerpos monoclonales contra el antígeno RhD (Immucor Gamma, Laboratorios Licon, S.A.), incluyendo el control del RhD (Control Rh-Hr Gamma clone, Immucor Gamma, Laboratorios Licon, S.A.). Para la determinación de los antígenos C, c, E y e, se utilizaron anticuerpos específicos de origen monoclonal (Immucor Gamma, Laboratorios Licon, S.A.). La identificación de estos antígenos se llevó a cabo por aglutinación en gel en un sistema automatizado (Procesador DIANA). Como parte del control de calidad se incluyeron eritrocitos con fenotipo conocido, positivos o negativos para el antígeno a identificar (células control).

La extracción de ADN se realizó con un reactivo comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche®). El ADN obtenido se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se evaluó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa a 1 %. La estrategia de amplificación para establecer la presencia de segmentos específicos de la caja RH híbrida que identifica a los sujetos RhD negativo generados mediante el mecanismo de deleción gen RhD, se aplicó la técnica de PCR-RFLP propuesta por Wagner.<sup>3</sup> El producto de PCR fue digerido con enzima de restricción *Pst*I y sometido a electroforesis en gel de agarosa a 1 %. Se empleó un marcador de peso molecular de 50 pb que genera 15 fragmentos desde 50 a 750 pb (DNA Molecular Weigh Marker XIII). Se utilizaron controles de sujetos heterocigotos obligados para RhD. En la identificación de las secuencias específicas de la caja híbrida Rh, las opciones de los resultados se definieron como negativos cuando no se evidenció la caja híbrida del Rh; la segunda

opción fue heterocigoto, es decir, se apreciaron la caja Rh híbrida y la caja Rh inferior; finalmente homocigoto, cuando únicamente se observó la caja híbrida.

Para estimar el tamaño de la muestra se consideró la prueba de la hipótesis para una proporción de población, con número esperado de 203 sujetos RhD negativo, más 15 % de las muestras para reponer las posibles pérdidas.

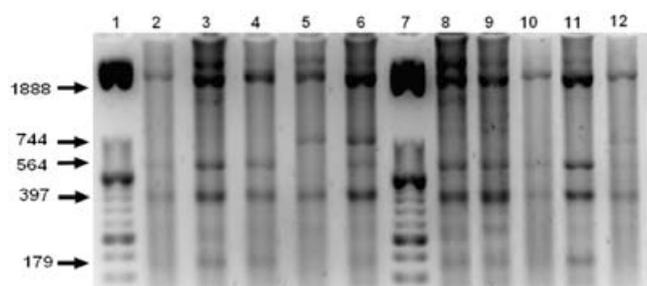
El protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Perinatología. Las muestras de ADN genómico fueron conservadas en un banco de ADN perteneciente al proyecto "Identificación de los fenotipos poco frecuentes del sistema Rh en sujetos del valle de México y creación de un banco de ADN".

## Resultados

Para conformar la población motivo de estudio se efectuó la identificación fenotípica de un total de 2692 sujetos RhD negativo. De esta población se seleccionaron 573 sujetos incluidos en el banco de ADN. Al describir la frecuencia en la distribución de fenotipos de las muestras de sujetos RhD negativo incluidas, el fenotipo *ccdee* se presentó con mayor frecuencia, en 529 casos (92.3 %); se identificaron otros cuatro fenotipos que fueron *Ccdee*, *CcdEe*, *ccdEe* y *CcdEE*, con 28, 5, 19 y un solo caso, que representaron 4.9, 0.9, 1.7 y 0.2 % de la frecuencia global (datos no mostrados). Para ajustar el tamaño muestral se seleccionaron de manera aleatoria 246 casos para ser analizados. Posterior a este proceso de muestreo se determinó la concentración e integridad del ADN y se eliminaron 20 muestras, para finalmente estudiar 216 sujetos.

Para la amplificación de las secuencias específicas de la caja híbrida del gen RhD, las opciones de los resultados se definieron como negativo para la caja Rh híbrida al amplificarse tres bandas de 1888, 744 y 397 bp, sin detectar la secuencia específica que reconoce a la caja híbrida y que traduce la existencia de otros mecanismos distintos a la deleción del gen RhD que establecen la condición RhD negativo. La segunda opción fue heterocigoto, donde coexistieron dos mecanismos para generar la condición molecular de RhD negativo (RhD híbrida/otro mecanismo). Se amplificaron cinco bandas con 1888, 744, 564, 397 y 179 bp, correspondientes a la caja híbrida y la caja RhD inferior; la diferencia entre ambas condiciones es de dos bandas de 564 y 179 pb. Finalmente homocigoto, cuando únicamente se amplificó la caja híbrida, donde la amplificación del ADN de los sujetos con doble dosis de caja Rh híbrida (RhD híbrida/RhD híbrida) amplificaron cuatro bandas de 1888, 564, 397 y 179 bp. No apareció la banda de 744 pb de la caja RhD inferior (Figura 2).

Los fenotipos identificados en los sujetos RhD negativo fueron en orden de frecuencia *ccdee* en 179 casos (82.8 %) y 15 sujetos con fenotipo *Ccdee* (11.6 %). Los fenotipos con menor ocurrencia fueron *ccdEe* en siete casos (3.2 %), *CcdEe* en cuatro sujetos (1.9 %) y *CcdEE* en un solo caso (0.5 %). En el estudio de la caja híbrida del Rh en sujetos RhD negativo, se documentó con una frecuencia observada de cinco casos negativos para la amplificación de la caja Rh híbrida (2.3 %),



**Figura 2.** Amplificación del producto de PCR bajo el corte de la enzima de restricción PstI en sujetos Rh negativo. Carriles 1 y 7, marcador de peso molecular 250 bp (XIII, Roche). Carriles 2, 3, 4, 8, 9 10 y 11, homocigoto a la caja híbrida. Carril 5, homocigoto para caja superior (híbrido/híbrido). Carriles 6 y 12, heterocigoto para caja híbrida.

en 21 casos fueron heterocigoto (9.7 %) y en 188 homocigotos (88 %). La presencia de la condición homocigota de la caja híbrida Rh ocurrió con mayor frecuencia en los sujetos con fenotipo *ccdee* (87 %), misma que disminuyó cuando se presentó en la condición heterocigota (57 %) y en 40 % de los casos negativos para la caja híbrida coincidieron en el fenotipo *ccdee*; la proporción restante se presentó en aquellos con los fenotipos *Ccdee* y *ccdEe* (Cuadro I).

La ocurrencia de los haplotipos RhCC, RhCc y Rhcc fue de 0.005, 0.133 y 0.862, respectivamente. La frecuencia del haplotipo Rhcc resultó significativamente mayor en aquellos sujetos bajo la condición homocigota para la caja Rh híbrida ( $\chi^2 = 4.658$ ,  $p < 0.05$ ). Para el caso de los haplotipos RhEE, RhEe y Rhee, la frecuencia génica fue de 0.001, 0.058 y 0.941, respectivamente. No se observó diferencia en las frecuencias observadas para el haplotipo Rhee y la homocigocidad para la caja Rh híbrida (Cuadro II). La frecuencia alélica para RhC, Rhc, RhE y Rhe fue de 0.072, 0.928, 0.030 y 0.970, respectivamente. Nuevamente se observó que la frecuencia observada para Rhc fue significativa en aquellos con homocigocidad de la caja híbrida ( $\chi^2 = 7.463$ ,  $p < 0.05$ ), sin mostrar diferencias estadísticas para la frecuencia observada del alelo RHe. La frecuencia alélica del gen de la caja Rh híbrida es de 0.928 y de los distintos alelos que no corresponden a la caja Rh híbrida es de 0.072 (Cuadro II).

**Cuadro I. Fenotipo del sistema Rh y amplificación de la caja híbrida del gen RhD**

Fenotipo del sistema Rh (n = 216)	Amplificación de la caja híbrida RhD n (%)		
	Homocigoto (190/88.0)	Heterocigoto (21/9.7)	Negativo (5/2.3)
<i>ccdee</i> (179/82.8)	165 (87.0)	12 (57.0)	2 (40.0)
<i>Ccdee</i> (25/11.6)	16 (8.0)	7 (33.0)	2 (40.0)
<i>ccdEe</i> (7/3.2)	4 (2.0)	2 (10.0)	1 (20.0)
<i>CcdEe</i> (4/1.9)	4 (2.0)		
<i>CCdEE</i> (1/0.5)	1 (<1.0)		

## Discusión

En el estudio de la delección del gen RhD, la caja Rh híbrida puede ser identificada por dos diferentes estrategias, una es amplificando toda la caja Rh híbrida, metodología técnicamente demandante.<sup>3</sup> La otra estrategia es identificando la diferencia de nucleótidos entre la caja Rh superior e inferior.<sup>3</sup> En este esquema complementario la variación en las secuencias de las cajas del Rh probablemente sea paralela a los alelos del RhD.<sup>11</sup> Bajo el mecanismo de delección del gen RhD, se han evidenciado más de cuatro polimorfismos de la caja Rh híbrida, indicando que los eventos de delección del RhD son independientes de la prevalencia de la delección del Rh.<sup>11</sup>

En la comparación de la frecuencia de los mecanismos moleculares y etnicidad, se observa que la delección del gen RhD predomina sustancialmente en los sujetos de origen caucásico europeo en más de 96 %, seguido de los grupos orientales y la población mexicana que se informa en este reporte, con ocurrencia en alrededor de 80 % y en menor medida en la población negra africana, con 18.3 %.<sup>4</sup> Los otros dos grupos de mecanismos muestran mayor variabilidad. La presencia del pseudogen RhD $\psi$  es predominante en la población negra africana,<sup>12</sup> y en menor ocurrencia en orientales continentales o isleños (9 a 27.7 %), y mucho menos frecuente en los europeos caucásicos (1.2 %); no se encontró en ningún caso de nuestra serie.

La muestra de sujetos RhD negativo evaluada en el presente proyecto proviene de una población de mezcla génica elevada. La población indígena mesoamericana es del

**Cuadro II. Frecuencias fenotípicas y alélicas para RhCE de acuerdo con la cigocidad de la caja híbrida del gen RhD**

Haplotipo y alelos del sistema Rh (n 216)	Homocigoto (190/88.0)	Heterocigoto (21/9.7)	Negativo (5/2.3)
<b>Haplotipo RhCc*</b>			
RhCC (1/0.005)	1 (0.005)		
RhCc (29/0.133)	20 (0.106)	7 (0.333)	2 (0.400)
Rhcc (186/0.862)	169 (0.889) <sup>†</sup>	14 (0.667)	3 (0.600)
<b>Haplotipo RhEe**</b>			
RhEE (1/0.001)	1 (0.005)		
RhEe (11/0.058)	8 (0.043)	2 (0.095)	1 (0.200)
Rhee (204/0.941)	181 (0.952) <sup>‡</sup>	19 (0.905)	4 (0.800)
<b>Alelos</b>			
C (31/0.072)	22 (0.057)	7 (0.166)	2 (0.200)
c (401/0.928) <sup>f</sup>	358 (0.943)	35 (0.834)	8 (0.800)
E (13/0.030)	10 (0.026)	2 (0.047)	1 (0.100)
e (419/0.970) <sup>§</sup>	370 (0.974)	40 (0.953)	9 (0.900)

Equilibrio de Hardy-Weinberg: \*  $\chi^2$  0.0013,  $p$  0.908. \*\*  $\chi^2$  3.51,  $p$  0.060.

<sup>†</sup> Frecuencia del haplotipo Rhcc y homocigocidad de la caja Rh híbrida:  $\chi^2$  4.658,  $p < 0.05$ .

<sup>‡</sup> Frecuencia del haplotipo Rhee y homocigocidad de la caja Rh híbrida:  $\chi^2$  0.929,  $p > 0.05$ .

<sup>f</sup> Frecuencia del alelo Rhc y homocigocidad de la caja Rh híbrida:  $\chi^2$  7.463,  $p < 0.05$ .

<sup>§</sup> Frecuencia del alelo Rhe y homocigocidad de la caja Rh híbrida:  $\chi^2$  0.655,  $p > 0.05$ .

grupo sanguíneo O y RhD positivo, y la prevalencia de la condición RhD negativo es prácticamente nula o menor a 1 %.<sup>7</sup> En México, la migración europea, principalmente de España, continuó hasta principios de siglo XIX, con un componente negro que ha prevalecido desde el siglo XVI.<sup>13</sup> Hasta el siglo pasado, los grupos indígenas nativos de México mantenían muchas de sus características autóctonas y su variación genética puede atribuirse a la carga genética, adaptación, selección natural y posiblemente, a la mezcla interétnica en ciertas áreas.

En cuatro informes distintos que incluyen población del valle de México, es constante documentar que entre 60 y 80 % de los casos se limita a los fenotipos CCDee, CcDEe y CcDee.<sup>7,10,13,14</sup> Al calcular las frecuencias cromosómicas para RhD y RhCE, debido a que una proporción elevada de sujetos originalmente incluidos son *cde*, es posible que se trate de poblaciones con alto grado de mezcla no indígena.<sup>7</sup> En grupos mestizos, a pesar de la variabilidad en la calidad metodológica de los diferentes informes, la frecuencia fenotípica de *cde* es similar a lo observado en los grupos indígenas señalados anteriormente, lo que indica el carácter híbrido de la población.<sup>7</sup> En el estudio de un poblado de Texas, Estados Unidos, se pudo documentar la existencia de las mismas frecuencias fenotípicas que las señaladas para el valle de México, con un modelo trihíbrido de 62 % española, 30 % amerindia y 8 % africana, como evidencia de la heterogeneidad de la estructura genética mestiza mesoamericana.<sup>15</sup> En el cálculo de las frecuencias fenotípicas del sistema Rh en 730 individuos mexicanoamericanos de Arizona, se observó una fuerte influencia de mezcla poblacional española y amerindia, pero sin impacto de genes africanos.<sup>14</sup> Estos antecedentes apoyan el origen europeo del fenotipo *ccdee*, de la condición RhD negativo y de la delección del gen RhD identificado en la población del valle de México, como una evidencia de alta mezcla génica.

En conclusión, para poblaciones no europeas la mestizo-mexicana, caracterizada por su amplia variabilidad genética, el mecanismo molecular principal mediante el cual se genera la condición RhD negativo es por la delección del gen RhD en 88 % de los casos. Estos resultados deberán ser considerados en la estrategia molecular para el diagnóstico prenatal o la determinación de la cigocidad al RhD paterna de la gestante RhD negativo.<sup>16,17</sup>

## Agradecimientos

Este material formó parte de la tesis doctoral del programa en Ciencias Químico-biológicas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, y fue financiado con fondos federales en el proyecto 212250-07241 del Instituto Nacional de Perinatología y de la Fundación Clínica Médica Sur.

## Referencias

1. Daniels G, Castilho L, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, et al. International Society of Blood Transfusion Committee on terminology for red blood cell surface antigens: Macao report. *Vox Sang* 2009;96:153-156.
2. Van Kim CL, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev* 2006;20:93-110.
3. Wagner FF, Flegel WA. RhD gene deletion occurred in the rhesus box. *Blood* 2000;95:3662-3668.
4. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RhD positive haplotypes in d negative europeans. *BMC Genet* 2001;2:10.
5. Westhoff CM. Review: The Rh blood group d antigen... Dominant, diverse, and difficult. *Immunohematology* 2005;21:155-163.
6. Wagner FF, Ladewig B, Angert KS, Heymann GA, Eicher NI, Flegel WA. The dau allele cluster of the rhD gene. *Blood* 2002;100:306-311.
7. Lisker R, Ramírez E, Briceño RP, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four mexican urban centers. *Hum Biol* 1990;62:791-801.
8. Carritt B, Kemp TJ, Poulter M. Evolution of the human Rh (rhesus) blood group genes: A 50 year old prediction (partially) fulfilled. *Hum Mol Genet* 1997;6:843-850.
9. Daniels G. Human blood groups. Second edition. Malden, MA: Blackwell Science; 2002.
10. Grunbaum BW, Selvin S, Myhre BA, Pace N. Distribution of gene frequencies and discrimination probabilities for 22 human blood genetic systems in four racial groups. *J Forensic Sci* 1980;25:428-444.
11. Wagner FF, Moulds JM, Flegel WA. Genetic mechanisms of rhesus box variation. *Transfusion* 2005;45:338-344.
12. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, et al. The presence of an rhD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the rh d-negative blood group phenotype. *Blood* 2000;95:12-18.
13. Tiburcio V, Romero A, De Garay AL. Gene frequencies and racial intermixture in a mestizo population from Mexico city. *Ann Hum Biol* 1978;5:131-138.
14. Long JC, Williams RC, McAuley JE, Medis R, Partel R, Tregellas WM, et al. Genetic variation in Arizona Mexican Americans: Estimation and interpretation of admixture proportions. *Am J Phys Anthropol* 1991;84:141-157.
15. Cerda-Flores RM, Kshatriya GK, Bertin TK, Hewett-Emmett D, Hanis CL, Chakraborty R. Gene diversity and estimation of genetic admixture among Mexican-Americans of Starr County, Texas. *Ann Hum Biol* 1992;19:347-360.
16. Grootker-Tax MG, Maaskant-van Wijk PA, van Druenen J, van der Schoot CE. The highly variable Rh locus in nonwhite persons hampers rhD zygosity determination but yields more insight into rh-related evolutionary events. *Transfusion* 2005;45:327-337.
17. Tax MG, van der Schoot CE, van Doorn R, Douglas-Berger L, van Rhenen DJ, Maaskant-vanWijk PA. Rhc and rhc genotyping in different ethnic groups. *Transfusion* 2002;42:634-644.