

## GENOTIPIFICACION DEL SISTEMA RH EN LIQUIDO AMNIOTICO\*

CARLOS COTORRUELO, CLAUDIA BIONDI, SILVIA GARCIA BORRAS, RENE DI MONACO,  
WALTER MARTINO, AMELIA RACCA

Area Inmunología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario

**Resumen** El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del gen *RHD* en células fetales obtenidas de líquido amniótico (LA) por PCR. Se estudiaron 65 muestras de LA, 11 de madres RhD-sensibilizadas con anti-D. Se confirmó el origen fetal del ADN analizando un locus VNTR y 3 loci STR en las muestras de ADN de LA y sangre materna. En las muestras no contaminadas (n=62) se realizó la genotipificación *RHD* utilizando una estrategia de PCR multiplex que permite la obtención de 3 productos de amplificación en los fenotipos RhD+ y sólo un fragmento de ADN en los fenotipos RhD-. Se genotipificaron 54 fetos RhD+ (8 de madres RhD- sensibilizadas) y 8 fetos RhD- (3 de madres RhD- sensibilizadas). La genotipificación del ADN fetal permite diagnosticar con una única amniocentesis fetos en riesgo real de enfermedad hemolítica fetoneonatal (EHFN) y evitar la utilización de métodos invasivos en casos de fetos RhD-.

**Palabras clave:** genotipificación Rh, prenatal, enfermedad hemolítica

**Abstract** *Rh system genotyping in amniotic fluid.* The aim of this work was to determine the presence of the *RHD* gene in fetal cells obtained from amniotic fluid (AF). We studied 65 samples of AF, 11 from RhD- mothers sensitized with anti-D. The fetal origin of the DNA was confirmed with the analysis of 1 VNTR locus and 3 STR loci in DNA samples from AF and maternal blood. The *RHD* genotyping was performed in non contaminated samples (n=62) using a multiplex PCR strategy that yields 3 amplification products from RhD+ phenotypes and 1 DNA fragment from RhD- phenotypes. We genotyped 54 RhD+ fetuses (8 from RhD- sensitized mothers) and 8 RhD- fetuses (3 from RhD- sensitized mothers). Fetal DNA genotyping allows the diagnosis, from a single amniocentesis, of fetuses at real risk of hemolytic disease of the newborn. When the fetus is determined to be RhD- all invasive procedures can be avoided.

**Key words:** Rh genotyping, prenatal, hemolytic disease

La enfermedad hemolítica fetoneonatal (EHFN) es causada por anticuerpos maternos dirigidos contra el antígeno D. La profilaxis con inmunoglobulina anti-D ha disminuido considerablemente esta inmunización; sin embargo, 1 de cada 1000 recién nacidos es afectado por esta patología. Los anticuerpos maternos se forman en respuesta a una aloinmunización por el pasaje de eritrocitos incompatibles a la circulación materna. Las consecuencias clínicas de esta sensibilización pueden conducir a anemia hemolítica fetal, *hydrops fetalis*, muerte intrauterina o necesidad de parto prematuro<sup>1</sup>. En los embarazos posteriores es importante investigar la presencia en los eritrocitos fetales del antígeno D. El tratamiento de embarazadas RhD- sensibilizadas incluye procedimientos invasivos como amniocentesis seriadas y cordocentesis siendo incorporadas a este grupo, pacientes cuyos fetos son RhD-. Este abordaje implica riesgos

para la continuación del embarazo (0.5-1%) y puede aumentar la sensibilización como resultado de hemorragias materno-fetales (1-2%)<sup>2, 3</sup>.

El locus *RH* está compuesto por dos genes adyacentes y homólogos denominados *RHCE* y *RHD* que codifican los antígenos C, c, E, e y D respectivamente<sup>4</sup>. La presencia o ausencia de gen *RHD* en el ADN humano determina las bases moleculares del polimorfismo RhD+ y RhD-. Los individuos RhD+ poseen los dos genes *RH*, mientras que el fenotipo RhD- resulta de la ausencia del gen *RHD*, siendo las personas RhD- homocigotas para la delección del gen *RHD*<sup>5</sup>.

El estudio de las bases genéticas del sistema Rh permite el desarrollo de métodos de diagnóstico molecular para determinar la presencia del gen *RHD* en ADN fetal obtenido de líquido amniótico (LA). Debido a que los mismos no distinguen entre ADN fetal y materno, es necesario confirmar el origen fetal del ADN obtenido de

**Dirección postal:** Dr. Carlos Cotorruelo, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina  
Fax: (54-341) 4370765 e-mail: ccotorru@fbiof.unr.edu.ar

\* Trabajo presentado en la Sesión Interdisciplinaria, durante la reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, en Mar del Plata, noviembre 24, 2000

LA y descartar posibles contaminaciones de la muestra con ADN materno que podrían conducir a un diagnóstico incorrecto<sup>6</sup>.

El objetivo de este trabajo fue identificar fetos en riesgo de EHFN a través de la genotipificación *RHD* por PCR en células fetales obtenidas de LA.

Se estudiaron 65 muestras de LA, 54 fueron extraídas por punción directa de la membrana corioamniótica intraoperatoriamente por cesárea y 11 por punción transabdominal en los casos de pacientes sensibilizadas que lo requirieron para otros estudios. Las mismas fueron obtenidas con consentimiento previo de las pacientes. También se realizaron estudios en sangre periférica materna y sangre de cordón de los recién nacidos.

### Estudios inmunohematológicos

Se determinó el fenotipo RhD en sangre materna y de cordón por reacciones de hemaglutinación utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales. Se investigó la presencia de anticuerpos irregulares en el suero de las pacientes con *Panel Globular Selector*, título e identificación del anticuerpo implicado con *Panel Globular Identificador*<sup>7</sup>.

### Estudios moleculares

*Extracción de ADN:* Se obtuvo ADN a partir de 3 ml de LA y 500 µl de sangre materna utilizando la técnica de *salting out*<sup>8</sup>.

*Sensibilidad de marcadores genéticos VNTR y STR:* Para determinar la presencia de posibles contaminaciones se estudiaron regiones del ADN que presentan gran variabilidad alélica conocidas como loci VNTR<sup>9</sup> y STR<sup>10</sup>. Se prepararon contaminaciones *in vitro* mezclando 2 muestras de ADN de igual concentración obtenidas de una madre RhD- y de su hijo RhD+. La cantidad de ADN materno presente en estas mezclas varió desde un 1% hasta un 99%. Se estudiaron por PCR los loci apoB, CSF1PO, TPOX y TH01. Los productos obtenidos se analizaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6% teñidos con plata<sup>11</sup>.

*Determinación del origen fetal del ADN obtenido de LA:* Se analizaron los mismos marcadores genéticos en las muestras de ADN obtenidas de LA y sangre materna.

*Estudio prenatal del genotipo RHD:* Se diseñó una estrategia de PCR multiplex que permite el análisis simultáneo de dos regiones diferentes del gen *RHD* basándose en el polimorfismo de longitud del intrón 4 y en la presencia de una secuencia específica en la región 3' no codificante del gen *RHD*. Se utilizaron cebadores complementarios a secuencias nucleotídicas consenso presentes en los exones 4 y 5 de los genes *RH* que permi-

ten amplificar el intrón 4 del gen *RHCE* (1238 pb) y el intrón 4 del gen *RHD* (587 pb) y diferenciarlos por tamaño. También se utilizó un cebador 5' complementario a secuencias de ADN homólogas presentes en el exón 10 de ambos genes y un oligonucleótido cebador reverso complementario a una secuencia específica de la región 3' del gen *RHD* que permiten la obtención de un producto de PCR únicamente en individuos RhD+ (250 pb). La PCR multiplex fue realizada en cada una de las muestras de ADN obtenidas de LA.

*Sensibilidad del sistema de PCR multiplex:* Para determinar la sensibilidad de la PCR multiplex se determinó el genotipo *RHD* en las contaminaciones con distintas proporciones de ADN materno.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

*Estudios inmunohematológicos:* Se tipificaron 48 madres RhD+ y 17 madres RhD-. Se detectaron anticuerpos irregulares de especificidad anti-D en 11 pacientes RhD- con títulos entre 32 y 1024.

*Sensibilidad de marcadores genéticos VNTR y STR:* En todos los sistemas estudiados se observó una disminución de la intensidad de la banda del alelo materno no compartido con el hijo (alelo contaminante) a medida que se reduce la cantidad de ADN materno presente en las mezclas preparadas. La cantidad mínima de ADN materno capaz de ser detectada por el análisis del locus apoB fue del 5% y por los loci CSF1PO, TPOX y TH01 del 2%.

*Determinación del origen fetal del ADN obtenido de LA:* Se confirmó el origen fetal del ADN en 62 muestras de LA al analizar los loci apoB, CSF1PO, TPOX y TH01 y obtener patrones genéticos que presentan un solo alelo compartido con la muestra de ADN materno. Se detectó contaminación en 3 muestras de LA de madres RhD+.

*Estudio prenatal del genotipo RHD:* Se genotipificaron 54 fetos RhD+ (43 de madres RhD+ y 11 de madres RhD-) y 8 fetos RhD- (2 madres RhD+ y 6 con madres RhD-) (Fig. 1). La determinación molecular presentó una estricta correlación con los resultados serológicos. De las 17 madres RhD-, 11 pertenecían a embarazos de riesgo por presentar aloanticuerpos anti-D. La genotipificación del LA de las embarazadas sensibilizadas permitió identificar 3 fetos RhD- y 8 fetos RhD+ (Tabla 1).

*Sensibilidad del sistema de PCR multiplex:* En las contaminaciones con ADN materno (hasta un 95%) preparadas *in vitro* fue posible amplificar los fragmentos del gen *RHD* presente en el hijo. La cantidad mínima de ADN necesaria para detectar el gen *RHD* utilizando el sistema de PCR multiplex fue del 5%.

En este trabajo hemos aplicado una metodología de PCR multiplex desarrollada en nuestro laboratorio para determinar la presencia del gen *RHD* en el ADN fetal extraído de células de LA. Previamente determinamos la sensibilidad del análisis de 1 locus VNTR y 3 loci STR<sup>9,10</sup>

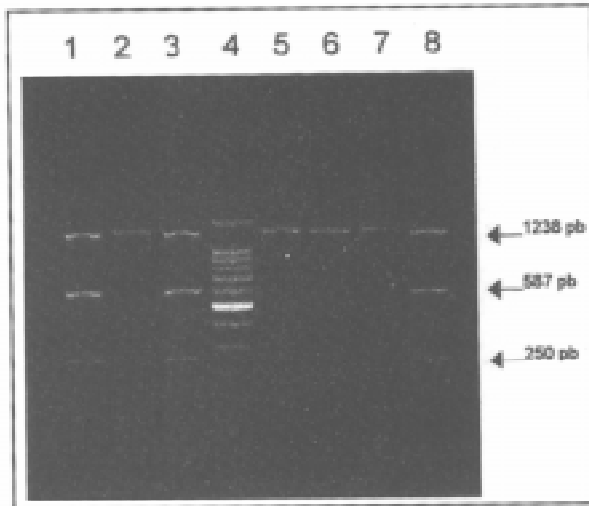


Fig. 1.— Electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de los productos obtenidos con la estrategia de PCR multiplex. Muestras sembradas en cada calle: 1) LA RhD+, 2) LA RhD-, 3) LA RhD+, 4) Marcador de peso molecular de 100 pb, 5) La RhD-, 6) LA RhD-, 7) LA RhD-, 8) LA RhD+

TABLA 1.— Genotipo *RHD* fetal de madres RhD negativas sensibilizadas y no sensibilizadas

	Madres sensibilizadas	Madres no sensibilizadas
Fetos RhD+	8	3
Fetos RhD-	3	3

para detectar contaminaciones maternas. Los resultados obtenidos indican que el estudio de estos loci es útil para determinar el origen fetal del ADN. Estos marcadores confirmaron el origen fetal de 62 muestras de ADN extraídas de LA al compararlas con las muestras maternas y obtener patrones genéticos donde se comparte un solo alelo. El análisis de 4 marcadores genéticos permitió resolver los casos de loci no informativos que surgen cuando la madre y el hijo comparten un alelo por ser la madre o ambos homocigotas o comparten por azar dos alelos de alta frecuencia en la población.

La genotipificación del antígeno D en el ADN extraído de LA coincidió con los fenotipos RhD determinados en sangre de cordón por técnicas inmunohematológicas, indicando la validez del método utilizado. La sensibilidad de la estrategia de PCR multiplex permite detectar el gen *RHD* aun en muestras altamente contaminadas. El estudio prenatal en las embarazadas sensibilizadas per-

mitió identificar 3 fetos RhD- evitando la realización de amniocentesis seriadas para el seguimiento del embarazo<sup>3</sup>. Estos resultados indican que aproximadamente el 27% (3/11) de las embarazadas sensibilizadas se benefició con la determinación prenatal del genotipo *RHD*. Un feto RhD+ podría ser afectado por la EHFN, mientras que los fetos RhD- no padecerían esta patología<sup>1</sup>.

La genotipificación *RHD* por PCR es un método sensible y exacto que permite determinar precozmente la presencia del antígeno D analizando el ADN obtenido de células fetales provenientes de una única amniocentesis de embarazadas aloinmunizadas. Este estudio evitaría la utilización de métodos diagnósticos invasivos y estrategias terapéuticas expansivas y costosas cuando el feto es RhD-<sup>1, 2</sup>. Considerando que la determinación prenatal del genotipo *RHD* disminuiría el número de pérdidas de embarazo debidas a complicaciones ocasionadas por amniocentesis y cordocentesis, proponemos su incorporación al protocolo de estudio de las embarazadas sensibilizadas.

## Bibliografía

1. Chavez GF, Mulinare J, Edmonds ID. Epidemiology of Rh hemolytic disease of the newborn in the United States. *JAMA* 1991; 265: 3270-4.
2. Judd WJ, Luban N, Ness P. Prenatal and perinatal immunohematology: Recommendations for serological management of the fetus, newborn infant, and obstetric patient. *Transfusion* 1990; 30: 175-83.
3. Morse K. Management of red cell alloimmunization in pregnancy. *Obstetric transfusion practice*. Bethesda. American Association of Blood Banks, 1993; 21-47.
4. Cartron J, Agre P. Rh blood group antigens. Protein and gene structure. *Semin Hematol* 1993; 30: 193-208.
5. Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by southern analysis. *Blood* 1991; 78: 2747-52.
6. Hessner MJ, Agostini TA, Bellissimo DB. The sensitivity of allele specific polymerase chain reaction can obviate concern of maternal contamination when fetal samples are genotyped for immune cytopenic disorders. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 327-33.
7. Walker R. Technical Manual 11<sup>th</sup> ed. Bethesda. American Association of Blood Banks, 1993.
8. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215-7.
9. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987; 235: 1616-22.
10. Hammond H, Jin L, Zhong Y, Chakraborty R. Evaluation of 13 Short Tandem Repeats loci for use in personal identification applications. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 175-89.
11. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>o</sup> edition, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.