

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1^{ra} Edición



Ebook



INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1ª Edición

Autores Investigadores

Jazmin Elena Castro Jalca

José Climaco Cañarte Velez

William Antonio Lino Villacreses

Javier Martín Reyes Baque

Augusto Leonel Durán Cañarte

Silvana Noelia Campozano Pin

Nereida Valero Cedeño

Alexander Dario Castro Jalca

Anita María Murillo Zavala

Jaime Guillermo Chele Villacreses

Podemos asegurar que con respecto al ser humano, existen numerosas diferencias individuales sanguíneas que ya han sido puestas de manifiesto, e indudablemente todavía existen otras que aún no han sido establecidas. Por el momento no puede



INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1ª Edición

AUTORES

INVESTIGADORES

Jazmin Elena Castro Jalca

Magíster en Epidemiología;
Doctora en Ciencias de la Salud;
Licenciada en Laboratorio Clínico;
Docente de la Carrera de Laboratorio Clínico;
Universidad Estatal del Sur de Manabí; Jipijapa, Ecuador

✉ jazmin.castro@unesum.edu.ec

🆔 <https://orcid.org/0000-0002-8867-8136>

José Climaco Cañarte Velez

Magíster en Gerencia y Administración de Salud;
Licenciado en Laboratorio Clínico;
Universidad Estatal del Sur de Manabí; Jipijapa, Ecuador

✉ jose.canarte@unesum.edu.ec

🆔 <https://orcid.org/0000-0002-3843-1143>

William Antonio Lino Villacreces

Magíster en Gerencia de Servicios de Salud;
Diploma Superior en Gestión de Desarrollo de los Servicios de Salud;
Licenciada en Enfermería; Universidad Técnica de Babahoyo;
Babahoyo, Ecuador

✉ william.lino@unesum.edu.ec

🆔 <https://orcid.org/0000-0001-5613-9958>

Javier Martín Reyes Baque

Magíster en Investigación Clínica y Epidemiológica;
Licenciado en la Especialización de Laboratorio Clínico;
Docente de la Carrera de Laboratorio Clínico en la
Universidad Estatal del Sur de Manabí; Jipijapa, Ecuador

✉ javier.reyes@unesum.edu.ec

🆔 <https://orcid.org/0000-0003-3670-0036>

Augusto Leonel Durán Cañarte

Doctor en Salud Pública con mención en Sistemas y Servicios de Salud;
Médico Especialista en Terapia Intensiva;
Médico Cirujano, Docente de la Universidad Estatal del Sur de Manabí,
Facultad Ciencias de la Salud, Carrera de Laboratorio Clínico;
Jipijapa, Ecuador;

✉ agosto.duran@unesum.edu.ec

🆔 <https://orcid.org/0000-0002-4967-7106>

Silvana Noelia Campozano Pin

Magíster en Biomedicina Mención
en Pruebas Especiales y Diagnóstico Biomédico;
Licenciada en la Especialización de Laboratorio Clínico;
Universidad Estatal del Sur de Manabí; Jipijapa, Ecuador;

✉ silvana.campozano@unesum.edu.ec

🆔 <https://orcid.org/0000-0001-7377-2720>

Nereida Valero Cedeño

Doctora dentro del Programa de Doctorado en Inmunología
(Inflamación Enfermedades del Sistema Inmune y Nuevas Terapias);
Magíster Scientiarum en Biología Mención Inmunología Básica;

Licenciado en Bioanálisis;
Carrera de Laboratorio Clínico
Facultad de Ciencias de la Salud;
Universidad Estatal del Sur de Manabí; Jipijapa, Ecuador

✉ nereida.valero@unesum.edu.ec

🆔 <https://orcid.org/0000-0003-3496-8848>

Alexander Dario Castro Jalca

Magíster en Seguridad y Salud Ocupacional;
Licenciado en Laboratorio Clínico;
Diplomado en Parasitología Médica;
Docente de la Carrera Laboratorio Clínico
Universidad Estatal del Sur de Manabí; Jipijapa, Ecuador

✉ alexander.castro@unesum.edu.ec

🆔 <https://orcid.org/0000-0002-5611-8492>

Anita María Murillo Zavala

Magíster en Gerencia y Administración de Salud;
Doctora en Medicina y Cirugía; Administración de Empresas;
Prevención de Riesgos Laborales;
Construcción y Obras Públicas;
Docente de la Carrera de Laboratorio Clínico;
Facultad de Ciencias de la Salud en la
Universidad Estatal del Sur de Manabí; Jipijapa, Ecuador;

✉ anita.murillo@unesum.edu.ec

🆔 <https://orcid.org/0000-0003-2896-6600>

Jaime Guillermo Chele Villacreses

Magíster en Gerencia de Instituciones de Salud;
Médico General; Docente de la Carrera de Laboratorio Clínico;
Facultad de Ciencias de la Salud en la
Universidad Estatal del Sur de Manabí; Jipijapa, Ecuador;

✉ guillermo.chele@unesum.edu.ec

🆔 <https://orcid.org/0009-0007-5771-7503>

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1^{ra} Edición

REVISORES

ACADÉMICOS

Cristóbal Josué Ávila Zambrano

Licenciado en Laboratorio Clínico
Docente Departamento de Ciencias Biológicas
de la Facultad de Ciencias de la Salud,
de la Universidad Técnica de Manabí;

✉ cristobal.avila@utm.edu.ec;

🆔 <https://orcid.org/0000-0001-7628-6541>

Faryd Llerena Toro

Licenciado en Laboratorio Clínico
de la Universidad Estatal del Sur de Manabí;
Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología
en el laboratorio del MTI
de la Universidad de Concepción – Chile;
Docente de la Facultad de Ciencias
de la Salud de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí;

✉ faryd.llerena@uleam.edu.ec;

🆔 <https://orcid.org/0000-0002-4625-0625>

Catalogación Bibliográfica

AUTORES:

Jazmin Elena Castro Jalca
José Climaco Cañarte Velez
William Antonio Lino Villacreces
Javier Martín Reyes Baque
Augusto Leonel Durán Cañarte

Silvana Noelia Campozano Pin
Nereida Valero Cedeño
Alexander Dario Castro Jalca
Anita María Murillo Zavala
Jaime Guillermo Chele Villacreces

Título: Inmunohematología e infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Descriptor: Ciencias médicas, Hematología, Infecciones por VIH; Exámenes de laboratorio.

Código UNESCO: 32 Ciencias Médicas

Clasificación Decimal Dewey/Cutter: 616.15/ C279

Área: Ciencias de la Salud

Edición: 1^{era}

ISBN: 978-9942-622-28-0

Editorial: Mawil Publicaciones de Ecuador, 2023

Ciudad, País: Quito, Ecuador

Formato: 148 x 210 mm.

Páginas: 158

DOI: <https://doi.org/10.26820/978-9942-622-28-0>

URL: <https://mawil.us/repositorio/index.php/academico/catalog/book/75>

Texto para docentes y estudiantes universitarios

El proyecto didáctico: **Inmunohematología e infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)**, es una obra colectiva escrita por varios autores y publicada por MAWIL; publicación revisada bajo la modalidad de pares académicos y por el equipo profesional de la editorial siguiendo los lineamientos y estructuras establecidos por el departamento de publicaciones de MAWIL de New Jersey.

© Reservados todos los derechos. La reproducción parcial o total queda estrictamente prohibida, sin la autorización expresa de los autores, bajo sanciones establecidas en las leyes, por cualquier medio o procedimiento.



Usted es libre de:
Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato.
Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material para cualquier propósito, incluso comercialmente.

Director Académico: Lcdo. Alejandro Plúa Argoti

Dirección Central MAWIL: Office 18 Center Avenue Caldwell; New Jersey # 07006

Gerencia Editorial MAWIL-Ecuador: Mg. Vanessa Pamela Quishpe Morocho

Dirección de corrección: Mg. Ayamara Galanton.

Editor de Arte y Diseño: Lic. Eduardo Flores, Arq. Alfredo Díaz

Corrector de estilo: Lic. Marcelo Acuña Cifuentes

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1ª Edición

Índices

Contenidos



Prólogo-----14
Introducción -----17

Capítulo I.

Grupos Sanguíneos Eritrocitarios. Importancia Clínica-----20
Descubrimiento de los grupos sanguíneos eritrocitarios -----21
Citoplasma 26
La membrana del eritrocito -----25
Localización de los antígenos de los grupos sanguíneos
en la membrana de los hematíes
Terminología de los grupos sanguíneos eritrocitarios -----30
Sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios -----30
Anticuerpos de grupos sanguíneos eritrocitarios -----32
Destrucción inmune de hematíes -----32
Mecanismo de la Hemólisis intravascular-----33
Mecanismo de hemólisis extravascular -----34

Capítulo II.

Sistemas de grupos sanguíneos Abo, Hh, Lewis, P. y los antígenos II----36
Sistema de grupos sanguíneos. Generalidades -----37
Sistemas ABO y Hh -----38
Fenotipos del sistema ABO -----40
Sistema Lewis -----46
Sistema P y antígenos relacionados-----49
Sistemas de grupos sanguíneos Rh y LW -----51
Sistema de grupo sanguíneo Rh -----51
Sistema LW -----64
Sistema de grupo sanguíneo MNS -----65
Sistemas de grupos sanguíneos Kell y XK -----67
Sistema de grupo sanguíneo Duffy -----73
Sistema de grupo sanguíneo Kidd-----74
Sistema de grupo sanguíneo Lutheran -----76
Sistema de grupo sanguíneo Diego -----77
Sistema de grupo sanguíneo Cartwright (Yt)-----78
Sistema de grupo sanguíneo Xg -----79
Sistema de grupo sanguíneo Scianna -----79
Sistema de grupo sanguíneo Dombrock -----80
Sistema de grupo sanguíneo Colton -----80
Sistema de grupo sanguíneo Chido/Rogers -----81
Sistema de grupo sanguíneo Gerbich -----81
Sistema de grupo sanguíneo Cromer -----82
Sistema de grupo sanguíneo Knops -----82
Sistema de grupo sanguíneo Indian-----83
Sistemas de grupos sanguíneos Ok y RAPH -----83

Capítulo III.

Colecciones de grupos sanguíneos. Generalidades -----85
Antígenos de baja frecuencia (serie 700 ISBT)-----86
Antígenos de alta frecuencia (serie 901 ISBT)-----87
Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos
eritrocitarios. Pruebas de compatibilidad pretransfusional -----89
Reacción antígeno-anticuerpo en inmunohematología-----89
Detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios -----95
Determinación de la especificidad de los anticuerpos-----100
Pruebas de compatibilidad pretransfusional-----103
Autoanticuerpos eritrocitarios y anemias hemolíticas autoinmunes-----106
Diferencias entre anemias hemolíticas hereditarias y anemias
hemolíticas inmunes. -----107
Diagnóstico inmunohematológico de las anemias hemolíticas
autoinmunes (AHAI) -----107
Autoanticuerpos benignos -----109
Evaluación de una PAD positiva-----109
Inmunohematología de las plaquetas y los leucocitos. -----121
Antígenos plaquetarios -----122
Tipificación de antígenos plaquetarios -----125
Técnicas para la detección de los aloanticuerpos.-----126
Métodos para diferenciar los anticuerpos específicos de los
anticuerpos anti-HLA. -----130
Técnicas de detección de autoanticuerpos. -----133
Prueba de inmunofluorescencia directa-----133
Radioinmunoanálisis-----133
Técnicas de elución de anticuerpos.-----134
Antígenos -----134
Tipificación de antígenos granulocitarios. -----137
Técnicas de detección de anticuerpos contra antígenos de
granulocitos. -----137
Dificultades de las técnicas convencionales.-----139
Repercusión clínica de los anticuerpos específicos de granulocitos.-----140
Reactivos principales de uso en inmunohematología. -----141
Reactivos hemoclasificadores policlonales-----142
Reactivos hemoclasificadores policlonales del sistema de grupos
sanguíneos ABO (anti-A, anti-B, anti-AB) -----145
Reactivos hemoclasificadores policlonales del sistema de
grupo sanguíneo Rh (anti-D) -----145
Reactivos antiglobulínicos humano-----150
Albúmina sérica bovina -----152

Referencias-----154

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1^{ra} Edición

Índices

Tablas



.....

Tabla 1. Sinopsis histórica -----	24
Tabla 2. Grupos sanguíneos -----	31
Tabla 3. Nomenclatura del sistema Rh según Fisher/Race y Wiener-----	53
Tabla 4. Fenotipos posibles dentro del sistema Rh -----	53
Tabla 5. Colecciones de grupos de sanguíneos-----	85
Tabla 6. Antígenos de baja frecuencia (Serie 700 ISBT) -----	86
Tabla 7. Antígenos de alta frecuencia (serie 901 ISBT)-----	88
Tabla 8. Panel eritrocitario para la identificación de anticuerpos eritrocitarios -----	102

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1ª Edición

Índices

Figuras



.....

Figura 1. Karl Landsteiner	22
Figura 2. Antígenos de superficie de eritrocitos y grupos sanguíneos	25
Figura 3. Estructura de un eritrocito.	27
Figura 4. Membrana del eritrocito.	29
Figura 5. Antígenos del sistema sanguíneo ABO.....	39

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1ª Edición

Prólogo



El término Inmunohematología abarca el estudio de los antígenos, los anticuerpos y las reacciones inmunológicas de todos los componentes de la sangre. Esta ciencia está íntimamente relacionada con la Medicina transfusional por cuanto esta última encuentra en ella las bases científicas de sus procedimientos y el aseguramiento inmunológico de la transfusión.

En líneas generales, la Inmunohematología, constituye una parte de la Hematología, que estudia las reacciones inmunes entre antígenos presentes en los eritrocitos (glóbulos rojos) y anticuerpos en el plasma sanguíneo. Es el área encargada de la determinación de los grupos sanguíneos y el estudio de anticuerpos contra los eritrocitos.

Esta disciplina a su vez provee las herramientas para el diagnóstico, prevención y tratamiento de la aloinmunización asociada con la transfusión de sangre, el embarazo y el trasplante de órganos y tejidos. También estudia las enfermedades autoinmunes relacionadas con las células sanguíneas y los problemas relacionados con la exclusión de la paternidad. Los avances recientes de las técnicas moleculares han permitido dilucidar la estructura y función de muchos de los antígenos de grupos sanguíneos que prometen grandes contribuciones al diagnóstico y tratamiento de enfermedades hematológicas y nuevas aplicaciones en la transfusión de sangre y el trasplante. Las investigaciones en este campo también han hecho aportes significativos en el campo de la genética humana, la antropología, la criminalística y la Medicina legal.

La Inmunohematología como parte de la hematología estudia los procesos inmunitarios que tienen lugar en el organismo en relación con los elementos sanguíneos. Uno de los aspectos más importantes es el estudio de los grupos sanguíneos, ya que están relacionados directamente con las transfusiones y la prevención de accidentes hemolíticos relacionados a éstas, ya que la incompatibilidad entre donante y receptor puede ocasionar una brusca destrucción de los eritrocitos transfundidos, con riesgos para la vida del paciente; esto ocurría con frecuencia, hasta que Landsteiner descubriera la existencia de dichos grupos hemolíticos. Gracias a los conocimientos en inmunohematología, se hace posible el trasplante de células madre hematopoyéticas.

En 1901, se llevó a cabo el descubrimiento del sistema ABO a través de los experimentos de Karl Landsteiner; para 1927 se realizó el descubrimiento de los sistemas MN y P a través de experimentos con animales; en 1939 Levine y Stetson encontraron el sistema Rh-Hr en su famoso estudio obstétrico y en esta tónica de investigaciones siguieron los descubrimientos de los siste-

mas de grupos sanguíneos y su estudio, así en 1944 a través de las técnicas de bloqueo de anticuerpos fueron encontrados los denominados anticuerpos incompletos o sensibilizantes que se estudiaron con más amplitud en 1945 gracias al empleo de la albúmina bovina. Para finales de ese mismo año se comenzaron a emplear la técnica de la antiglobulina humana directa (Coombs), y algunas enzimas proteolíticas que dieron lugar al descubrimiento de sistemas como Kell y Lewis en 1946, Duffy en 1950 y Kidd en 1951 (Estrada, 2003).

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1ª Edición

Introducción



El estudio de la salud ha sido objeto de interés de diferentes disciplinas, entre las que se encuentra la enfermería, enmarcada en las ciencias de la salud.

La salud se presenta como un recurso para mantenerse vivo, incluso cuando hay enfermedad. Se trata de un recurso dinámico que varía a lo largo del tiempo. En el presente trabajo se manifiesta la representación de la salud a partir de un conjunto de variables y componentes. Quizá el más vital de todos, el cuidado, y quienes ejercen dicha atención.

Hablar de cuidado no es nada nuevo, el interés por el cuidado ha estado siempre presente en la humanidad. Desde tiempos remotos se consideraba que esta tarea la desempeñara la mujer, por ser quien se quedaba en casa mientras los hombres salían a buscar la provisión. En el siglo XIX, la profesión de enfermería se asoció a esta práctica; desde ese momento de la historia, el cuerpo humano se convirtió en el objeto del trabajo del médico y el entorno del paciente en el lugar de la práctica de enfermería.

La profesión de enfermería abraza el concepto de cuidado, cuestión vital para la existencia de la humanidad y la relación de solidaridad entre las personas. Desde este punto de vista, el cuidado, es una actividad importante para la humanidad, porque no se trata sólo de la supervivencia, sino también de la promoción y desarrollo de todas aquellas actividades que sirven al bien común de las personas y de sus entornos comunitarios.

Es decir, el cuidado es la esencia de la profesión de enfermería, incluye actividades transpersonales e intersubjetivas para proteger, mejorar y preservar a la humanidad, ayudando a los sanos o enfermos en todas las etapas del ciclo vital. La Organización Mundial de la Salud declara en su constitución: "Toda persona tiene derecho al más alto nivel posible de salud, y la calidad de la atención constituye el objetivo del macro proyecto "saludable para todos" basado en la conciencia. y satisfacción del paciente.

El rápido progreso tecnológico y los continuos cambios sociales a los que nos enfrenta la era de la globalización están transformando las esferas política, económica y social y plantean desafíos a la profesión de enfermería; impulsando nuevos desafíos, obligando al sector sanitario a cambiar su enfoque hacia el cuidado, una atención más humana, lejos de un sistema de atención que se centra principalmente en las enfermedades, a otras enfermedades, con énfasis en la prevención y la prestación de servicios de salud más cerca de la comunidad.

El presente libro, consta de X capítulos basados principalmente en el cuidado, la gestión y calidad de atención. Es así como, el capítulo I abre con el concepto de salud, y como esta es concebida, desde diferentes juicios. Se continua con el capítulo II y III donde se desarrolla básicamente el Rol de la enfermería y el rol en la gestión enfermera.

Posteriormente, los capítulos IV y V plantean la gestión de cuidados en enfermería, con elementos claves como los niveles de organización y gestión de enfermería en la Atención Primaria en Salud.

Ya entrando en los capítulos VI y VII se desarrolla el tema de la calidad de atención en los cuidados enfermeros, la evaluación de la calidad y sus principales desafíos.

Finalmente, los capítulos VIII, IX y X se orientan más concretamente a los modelos y teorías que han servido de basa para el desarrollo, eficaz y eficiente de la profesión, así como, el liderazgo, efectividad en la gestión de cuidados, y sus principales desafíos en la actualidad.

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1ª Edición

Capítulo

I

Grupos Sanguíneos

Eritrocitarios.

Importancia Clínica



Descubrimiento de los grupos sanguíneos eritrocitarios

Existen descubrimientos científicos, que podrían considerarse pequeños y/o poco llamativos pero que cambian de manera radical la vida de las personas. Es el caso del descubrimiento de los grupos sanguíneos. Este impacto tan positivo en la medicina y por tanto en la historia de la humanidad se le debe al patólogo y biólogo Karl Landsteiner, nacido el 14 de junio de 1868 en Austria. Tras finalizar sus estudios primarios, Landsteiner se gradúa como médico en la Universidad de Viena en 1891. Para ese mismo año publicó su primer estudio sobre la relación de la dieta con la composición de la sangre. Es reconocido por realizar aportaciones a la hematología, al descubrir y tipificar los grupos sanguíneos ABO, y también por contribuir con la anatomía patológica o bioquímica. Asimismo, se le considera una pieza clave en el descubrimiento de la patogénesis y la inmunología de la poliomielitis. En el año 1930 se le concede el Premio Nobel de Fisiología o Medicina, Premio Albert Lasker por Investigación Médica Clínica por sus trabajos en la caracterización de los tipos sanguíneos ABO. Fallece el 26 de junio de 1943 de un infarto en el propio laboratorio.

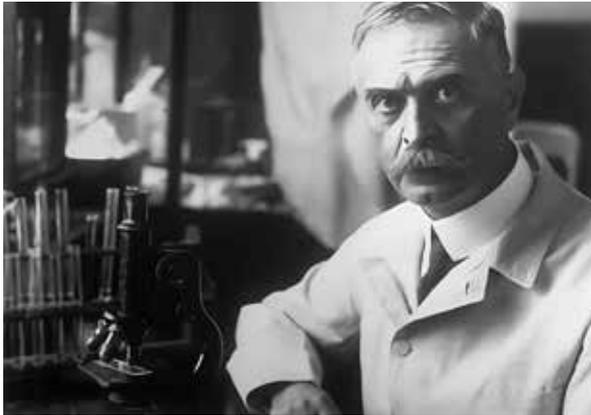
En el 1875 se reconoció que al mezclar sueros sanguíneos con hematíes de diferentes especies se observaba la presencia de hemólisis, lo que sugirió diferencias entre las diferentes especies en cuanto a la presencia de factores en su membrana ya que Landois se había dado cuenta de que cuando los hombres recibían transfusiones sanguíneas de otros animales, esa sangre de agrupaba y acababa por destruir los vasos sanguíneos.

Entre los años 1901 y 1903, Landsteiner se dio cuenta de que una reacción idéntica ocurría también con la sangre de otros seres humanos y que precisamente esa era la causa de los shocks, ictericias y hemoglobinurias que se habían dado frecuentemente en intentos anteriores de transfusiones sanguíneas. No solo eso, Landsteiner observa que había ciertas características sanguíneas que se heredaban y que podían llegar a usarse para determinar la paternidad de alguien cuando fuera dudosa. Landsteiner dedujo que los hematíes tenían en su membrana unos antígenos que reaccionaban con anticuerpos que presentaban los individuos que carecían de los mismos y describe las reacciones de aglutinación que se producían al unir hematíes con el plasma de diferentes personas. Los dividió en 3 grupos: grupo A, grupo B y grupo C (actualmente grupo O)

En fin, descubre que los eritrocitos humanos pertenecen a diversos sistemas antigénicos e identifica el sistema de antígenos sanguíneos ABO. Este

sistema incluye cuatro grupos sanguíneos: A, B, AB y O, basándose en la presencia de los eritrocitos del aglutinógeno A, B, A y B, o ninguno, respectivamente. Según el aglutinógeno que exista, en el suero se encuentra la aglutinina o anticuerpo contra el aglutinógeno que no está presente. Así, una persona con grupo sanguíneo A tiene aglutininas anti-B; si el grupo es B, las aglutininas presentes son anti-A: el grupo O tiene aglutininas anti-A y anti-B, en tanto que el grupo AB no tiene aglutininas. Por lo tanto, es posible determinar el grupo sanguíneo mediante la observación de las reacciones de los hematíes en contacto con sueros anti-A y anti-B. Si la sangre aglutina con anti-A, el grupo sanguíneo es A; si aglutina con anti-B, el grupo sanguíneo es B; si lo hace con anti-A y anti-B, el grupo sanguíneo es AB, y si no aglutina con ninguno de los dos antisueros, el grupo sanguíneo es O. La aglutinación ocurre cuando las aglutininas se unen a dos eritrocitos a la vez, lo que hace que éstos se agrupen o aglutinen. Además de la aglutinación, la unión aglutinina-aglutinógeno produce hemólisis por lesión de la membrana celular del eritrocito.

Figura 1. Karl Landsteiner



Nota. Extraído de (1).

La trascendencia clínica del sistema ABO radica en que todos los individuos presentan en el plasma anticuerpos contra los antígenos de los que se carece. Por tal motivo, si se transfunden hematíes ABO incompatibles se produce una reacción hemolítica que puede llegar a ser muy grave e incluso acabar con la vida del paciente.

Eso la diferencia del resto de los anticuerpos eritrocitarios clínicamente significativos, que son de origen inmune y no se producen hasta que no existe un contacto con el antígeno, ya sea por transfusión o durante un embarazo.

Después del descubrimiento del sistema ABO, estudios posteriores permitieron el reconocimiento de los sistemas MNS, P y Rh al inmunizar conejos con hematíes humanos, aunque los supuestos anticuerpos anti-Rh obtenidos en conejos reconocían en realidad a los antígenos del sistema LW. El resto de los sistemas de grupos sanguíneos fueron descubiertos generalmente al identificarse anticuerpos en el suero de pacientes politransfundidos o en puerpáras con recién nacidos afectados de enfermedad hemolítica. Es decir, se fueron identificando otros grupos sanguíneos como consecuencia de diferentes eventos patológicos producidos por anticuerpos eritrocitarios, tanto por la enfermedad hemolítica del feto y recién nacido (anti-D, anti-K y anti-Jka) como por reacciones hemolíticas transfusionales (anti-c, anti-e, y anti-Fya).

Por ejemplo, para 1939, Levine y Stetson, investigaron la reacción hemolítica en una mujer transfundida con hematíes del marido después de dar a luz a un hijo muerto. Detectaron en el plasma de la mujer un anticuerpo que producía aglutinación de los hematíes de su marido y del 80% de los hematíes ABO compatibles, llegaron a la conclusión de que este anticuerpo era independiente de los previamente descritos y sugirieron que la mujer se había sensibilizado durante el embarazo por un antígeno, presente en los hematíes del niño, heredado del padre.

Un año después, Landsteiner y Wiener descubrieron un anticuerpo de características similares, obtenido tras inyectar hematíes de macaco Rhesus en conejos. Pensaron que se trataba del mismo anticuerpo y por eso lo denominaron Rh. Posteriormente se vio que se trataba de anticuerpos diferentes, pero se mantuvo esta denominación.

En el año 1946, más allá de ABO y Rh, el doctor Coombs describió un nuevo anticuerpo en una mujer que había dado a luz a un recién nacido con enfermedad hemolítica. Este nuevo anticuerpo reaccionaba con los hematíes del marido y de dos de sus hijos, además de reaccionar con el 7% de los hematíes de los donantes. Se denominó anti-Kell, por aquella primera paciente en la cual se describió, la señora Kelleher.

Asimismo, se fueron describiendo nuevos anticuerpos a los que también se bautizó con el nombre del paciente en el que se detectaban: anti-Fya (sistema Duffy) y anti-Jka (sistema Kidd), ambos con transcendencia clínica.

Hasta los años 50 los grupos sanguíneos fueron definidos únicamente mediante reacciones de aglutinación. Entre 1950 y 1970, se empezó a describir la estructura y biosíntesis de los carbohidratos y proteínas de los diferentes antígenos eritrocitarios. Y más tarde, a partir de los noventa, se identificaron

los genes que codifican los sistemas ABO, Rh y, posteriormente, el resto de los grupos sanguíneos.

En el año 2018, según informe de la “International Society of Blood Transfusion”, se han descrito más de 350 antígenos eritrocitarios. La mayoría de ellos han sido agrupados en 36 sistemas, por compartir características y por tener una herencia estrechamente relacionada.

El sistema más importante después del ABO es el Rh. Aunque existen más de 50 antígenos dentro de este sistema, destaca por encima de todo el antígeno RhD, que es el que diferencia a los individuos Rh positivos de los Rh negativos que carecen de este antígeno. Su importancia radica en que tiene una enorme capacidad inmunogénica, y está implicado tanto en la enfermedad hemolítica del feto y recién nacido como en las reacciones hemolíticas postransfusionales.

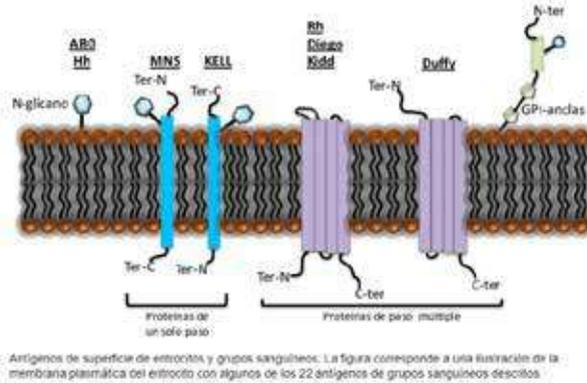
Tabla 1. Sinopsis histórica

Siglo 17	Hechos relevantes
Lower (1665)	Realiza transfusiones entre perros con éxito (el antígeno más potente no tiene anticuerpos naturales contra él, por lo que la primera transfusión nunca provoca accidentes, sí las siguientes). Hay otros anticuerpos (naturales) pero son más débiles y existen sólo en el 15% de los animales.
Dennis (1667)	Transfunde glóbulos rojos de carnero (250 ml) en un joven voluntario (humano), provocándole la muerte por aglutinación y hemólisis.
Siglo 19	
Blundel (1829)	Realiza una transfusión de sangre humana a un receptor humano (paciente obstétrica); el resultado fue la muerte del receptor por producirse aglutinación, hemólisis, cristalluria y necrosis tubular aguda.
Landois (1875)	Realiza experimentos de hemaglutinación in-vitro.
Siglo 20	
Landsteiner (1900)	Logra el descubrimiento de los “grupos sanguíneos” (hoy A,B,0). Crea Escuela Alemana de la especialidad, forma discípulos. Premio Nobel en 1930.
Landsteiner y Decastello (1902)	Agregan nuevo grupo, el AB.
Luis Agote (1914)	Introduce el uso del citrato de sodio 0.3% para la conservación de los glóbulos rojos in-vitro. Luego vendrían el ACD (Citrato Trisódico + Ácido Cítrico + Dextrosa: los glóbulos rojos a 4°C viven 21 días) y el CPDA-1 (Idem + Fosfato + Adenosina: los hematíes viven 35 días).
Londres (1921)	Nace en esta ciudad el primer “Banco de Sangre”.
Landsteiner y Levine (1927)	Descubren Sistema MN.
Landsteiner y Wiener (1940)	Descubren Factor Rh y EHRN.

Bernstein (1944)	Propone teoría para explicar la transmisión genética mendeliana de los antígenos.
Coombs	Elabora Suero Coombs (anticuerpos contra las inmunoglobulinas humanas), permitiendo la identificación de los anticuerpos de grupos sanguíneos fijados a los glóbulos rojos
Fisher y Race	Proponen nueva teoría de transmisión genética del Rh y nueva nomenclatura para sus antígenos (C-D-E y alelos).
Leslie (1991)	Comunica la transfusión de sangre grupo B enzimáticamente convertida a grupo 0, a individuos grupo 0, sin accidentes pese a haberse efectuado en forma reiterada.

Nota. Elaboración propia basada en diversos autores.

Figura 2. Antígenos de superficie de eritrocitos y grupos sanguíneos



Nota. Extraído de (2).

Los grupos sanguíneos, se pueden definir como características inmunológicas presentes en la membrana de los eritrocitos de algunos de los miembros de la especie y ausentes en otros. Estas estructuras están bajo estricto control genético, heredándose de acuerdo a las leyes de Mendel. Todos los mamíferos presentan este tipo de estructuras siendo diferentes entre sí y especialmente con seres de otras especies. Los grupos sanguíneos son características permanentes de los individuos, se nace y se muere con ellos.

La membrana del eritrocito

- Los eritrocitos. Generalidades

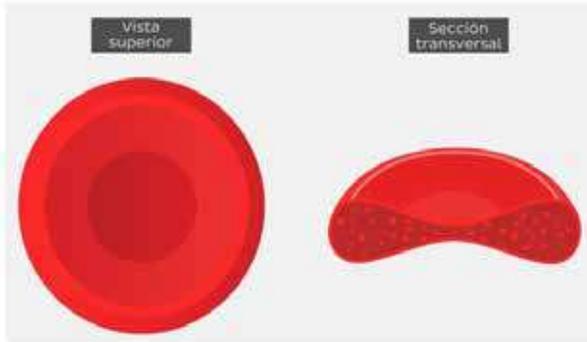
Los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes) son células anucleadas (sin

núcleo), bicóncavas y cargadas de hemoglobina que transportan oxígeno y dióxido de carbono entre los pulmones y otros tejidos. Se producen en la médula ósea roja mediante un proceso llamado eritropoyesis. Durante este proceso, los precursores eritroides (células antecesoras de los eritrocitos derivadas de células madre) son estimulados por la eritropoyetina a sufrir una serie de cambios morfológicos mediante los cuales se convierten en glóbulos rojos maduros. (1)

Estos eritrocitos maduros son liberados en el torrente sanguíneo, donde sobreviven alrededor de 100 a 120 días. Como puedes ver, los eritrocitos te brindan información sobre tu estado de salud de los últimos tres meses, ¡así que no pueden ser engañados tan fácilmente! Esta es la base científica del test de la hemoglobina glicosilada (HbA1c), practicado a las personas diabéticas cada tres meses con el fin de valorar sus niveles de glucosa en sangre. Después de 120 días, los eritrocitos envejecidos son reciclados por los macrófagos del bazo, hígado, médula ósea y ganglios linfáticos o linfonodos (sistema reticuloendotelial).

Los eritrocitos tienen un tamaño consistente de 7-8 μm , lo cual los convierte en perfectas 'reglas histológicas' en los exámenes de rutina. Sin embargo, poseen una estructura atípica en comparación con la mayoría de las células humanas. En primer lugar, los eritrocitos tienen forma bicóncava, similar a una dona, con la diferencia de que en el eritrocito hay una delgada membrana cubriendo el sitio del agujero de la dona. Esto por supuesto significa que la periferia del eritrocito es más gruesa que la parte central. Esta característica maximiza la superficie total de la membrana celular, facilitando el intercambio y transporte gaseoso. Además, los eritrocitos carecen de núcleo (son anucleados) y de cualquier otro orgánulo intracelular (también conocido como organelo intracelular), ya que todos se pierden durante la eritropoyesis. Las únicas dos estructuras celulares restantes son el citoplasma envuelto por una membrana celular.

Figura 3. Estructura de un eritrocito.



Nota. Extraído de (4)

- Citoplasma

El citoplasma de los eritrocitos está cargado de hemoglobina, una proteína que puede unirse de forma reversible (y por lo tanto transportar) a las moléculas de oxígeno y dióxido de carbono. La hemoglobina es acidófila, por lo que en consecuencia los eritrocitos se tiñen de un intenso color rojo al utilizar la técnica de tinción de hematoxilina y eosina (H+E).

- La membrana del eritrocito

Al igual que otras membranas celulares la membrana de los eritrocitos está compuesta por proteínas y una bicapa de lípidos. Tanto las moléculas proteicas como las lipídicas pueden tener unidas a ellas moléculas de hidrato de carbono, constituyendo en el primer caso las glicoproteínas y en el segundo los glicolípidos.

La doble capa lipídica es estabilizada por una armazón en el interior de la célula. El citoesqueleto está constituido por una molécula asimétrica de dos cadenas llamada espectrina la cual se une a otras proteínas entre las que figuran la actina y la ankirina. La ankirina se fija a una proteína integral (banda 3) y la actina a una proteína periférica (banda 4.1). La espectrina es una molécula filiforme que proporciona a la membrana celular su flexibilidad y solidez. El hematíe se distorciona al pasar a través de los capilares, pero inmediatamente recobra su forma biconcava. Si la espectrina se desnaturaliza el hematíe adquiere forma esférica y pierde su flexibilidad.

En la superficie externa de la membrana del hematíe se hallan siete monosacáridos diferentes. El ácido N-acetil neuroamínico (NANA) o ácido siálico.

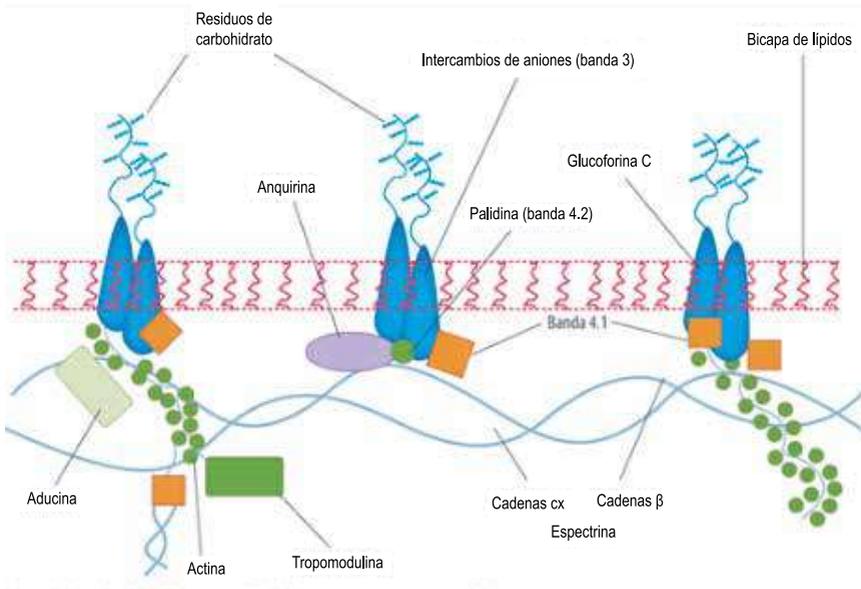
co, fucosa, galactosa, manosa, N-acetil glucosamina (NacGlc) y el N-acetil galactosamina (NacGal) . EL ácido siálico difiere de otras moléculas en que posee 9 átomos de carbono y también transporta una carga negativa. Los monosacáridos están unidos unos a otros por enzimas específicas llamadas glucosiltransferasas. Cada transferasa está bajo control genético y cataliza la transferencia de un azúcar a otro azúcar aceptor. La transferasa recibe el nombre del azúcar específico que une a la cadena de carbohidratos.

Aproximadamente el 43% de la membrana del hematíe está constituida por lípidos. El agua no disuelve ni penetra esta barrera lipídica, de este modo, el contenido celular se halla protegido de su medio externo. Los lípidos de la membrana de los hematíes están dispuestos de tal modo que las porciones hidrófilas están en contacto con las soluciones acuosas del interior y del exterior de la célula. Las porciones hidrófobas constituyen la parte interna de la membrana.

Las proteínas hidrofóbicas están localizadas en la doble capa lipídica fuera del medio acuoso y las hidrofílicas están en contacto con el plasma. Las proteínas periféricas pueden ser separadas sin alterar la membrana, mientras que las integrales solo se separan si se altera la doble capa lipídica. Las proteínas integrales más importantes son la banda 3 y las glicoforinas A, B, C y D. Estas glicoforinas están glicosiladas en varias posiciones de la superficie externa de la membrana con presencia de tetrasacáridos que contienen gran cantidad de ácido siálico. La glicoforina C se asocia con la banda 4.1 y probablemente mantiene la forma y le confiere las propiedades mecánicas a la membrana.

Entonces, como se observa en la figura siguiente la membrana del eritrocito contiene un esqueleto de proteínas actina-espectrina conectada a las proteínas integrales de la membrana, banda 3 y glucoforina C vía las proteínas puente anquirina y banda 4.1. β

Figura 4. Membrana del eritrocito.



Nota. Extraído de (5).

Localización de los antígenos de los grupos sanguíneos en la membrana de los hematíes

Los estudios de la membrana y más recientemente el clonaje de los genes de los grupos sanguíneos, han aportado información sobre la bioquímica y la localización de los antígenos de los grupos sanguíneos sobre la membrana de los hematíes y de su posible función biológica.

Los antígenos de naturaleza glúcida como los H, A, B, P, P₁, I e i están localizados sobre cadenas de oligosacáridos que están unidos directamente a los glicofingolípidos o a los dominios de las membranas asociados a la banda 3 y 4.5. Los antígenos glicoproteicos están asociados a las glucoforinas. Las glucoforinas de las membranas están constituidas por cuatro tipos diferentes de cadenas polipéptidicas designadas como α , β , γ y δ . La cadena α constituye la glucoforina A (GPA) y en ella se localizan los antígenos M y N mientras que la cadena δ caracteriza a la glucoforina B (GPB) y contiene los antígenos S, s y U. Las glucoforinas C y D están compuestas por las cadenas β y γ respectivamente y en ellas se pueden identificar los antígenos del sistema Gerbich. Otras proteínas de membrana corresponden a los restantes antígenos de los grupos sanguíneos.

Terminología de los grupos sanguíneos eritrocitarios

La terminología de los grupos sanguíneos es variable y no tiene un patrón único. En la mayoría de los sistemas el mismo término es usado para describir el gen y el antígeno con la diferencia que el gen se escribe con letra itálica. Por ejemplo, el gen *Fy^a* codifica para el antígeno *Fy^a*. Otros sistemas utilizan una sola letra, el ejemplo más típico es el sistema ABO. Los antígenos son A₁, A₂ y B, los genes son A¹, A², B y O. En otros sistemas como el Kell los alelos principales se denotan con letra itálica mayúscula y minúscula como K y k. En los sistemas Le, Lu, Fy, Jk, Di, Yt, Do, Co, Kn e In se utiliza un patrón uniforme. El primer alelo reconocido se denota con el superíndice a y el segundo con el b, ej Lu^a y Lu^b. El fenotipo se escribe Lu(a+b-) y demás combinaciones. La Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (SITS) ha adoptado una nomenclatura numérica, la cual consiste en números de 6 dígitos. Los primeros 3 números representan el sistema de grupos sanguíneos, ej. 001 ABO, 002 MNSs, 003 P, 004 Rh, etc. y los tres números restantes identifican a los antígenos, de esta forma al antígeno A del sistema ABO le corresponde el 001001, el antígeno D del Rh se denota con el número 004001. Otra serie de números se ha establecido para las colecciones así como para los antígenos de alta incidencia (la serie 900) y para los antígenos de baja incidencia (la serie 700).

Sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios

Se han descrito 271 grupos sanguíneos eritrocitarios distribuidos en 25 sistemas. Cada sistema contiene uno o más antígenos codificados por un gen o por dos o más genes homólogos. Algunos de los antígenos son específicos de la línea eritroide, mientras otros son compartidos con otros tejidos. Los sistemas de grupos sanguíneos descritos hasta el momento son: ABO, MNSs, P, Rh, Lutheran(Lu), Kell(K), Lewis(Le), Duffy(Fy), Kidd(Jk), Diego(Di), Cartwright(Yt), Xg, Scianna(Sc), Dombrock(Do), Colton(Co), LW, Chido/Rodger(Ch/Rg), Hh, Kx, Gerbich(Ge), Cromer(Cr), Knops(Kn), Indian(In), Ok y RAPH . Los antígenos que no se han asignado a ninguno de los sistemas anteriores por no cumplir con los criterios para ello, se han agrupado en 5 colecciones denominadas Cost (Cs), Er, I, Glob y LKE. El resto lo constituyen los antígenos de alta frecuencia (públicos) y los antígenos de baja frecuencia (privados) que son independientes de los sistemas y las colecciones.

Actualmente, según informa Cortés et al. (2) se han definido treinta y tres sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios de acuerdo con sus características bioquímicas, fisicoquímicas y su codificación genética. Existen algunos

antígenos que no han podido ser clasificados correctamente por lo que se les ha colocado tentativamente en el grupo de las colecciones y series mientras se demuestra su clasificación exacta para ser incluidos en los sistemas conocidos o si pertenecen a nuevos sistemas que hasta ahora se desconocen.

Los treinta y tres sistemas de grupos sanguíneos se pueden observar a continuación:

Tabla 2. Grupos sanguíneos

	Nombre del sistema	Simbolo	Nombre del gen	Localización Cromosómica
001	ABO	ABO	ABO	9q34.2
002	MNS	MNS	GYPA, GYPB, GYPE	4q31.21
003	P1PK	P1PK	A4GALT	22q11.2-qter
004	Rh	RH	RHD, RHCE	1p36.11
005	Lutheran	LU	LU	19q13.32
006	Kell	KEL	KEL	7q34
007	Lewis	LE	FUT3	19p13.3
008	Duffy	FY	DARC	1q23.2
009	Kidd	JK	SLC14A1	18q12.3
010	Diego	DI	SLC4A1	17q21.31
011	Yt	YT	ACHE	7q22.1
012	Xg	XG	XG, MIC2	Kp22.33
013	Scianna	SC	ERMAP	1p34.2
014	Dinbrock	DO	ART4	12p23.3
015	Colton	CO	AQP1	7p14.3
016	Landsteiner-Weiner	LW	ICAM4	19p13.2
017	Chidov-Rodgers	CH-RG	C4A, C4B	6p21.3
018	H	H	FUT1	19q13.33
019	XK	XK	XK	Xp21.1
020	Gerbich	GE	GYPC	2q14.3
021	Cromer	CROM	CD55	1q32.2
022	Knops	KN	CR1	1q32.2
023	Indian	IN	CD44	11p13
024	Ok	OK	BSG	19p13.3
025	Raph	RAPH	CD151	11p15.5
026	John Milton Hagen	JMH	SEMA7A	15q24.1
027	I	I	GCNT2	6p24.2
028	Globoside	GLOB	B3GALT3	3q26.1
029	Gill	GIL	AQP3	9p13.3
030	Rh-associated glycoprotein	RHAG	RHAG	6
031	Forsman	FORS	GBGT1	9q34.13
032	Junior	JR	ABCG2	4q22
033	Langereis	LAN	ABCB6	2q36

Nota. Extraído de (2).

Anticuerpos de grupos sanguíneos eritrocitarios

La mayoría de los anticuerpos eritrocitarios pertenecen a las clases de inmunoglobulinas (Igs) IgG e IgM, ocasionalmente pueden identificarse anticuerpos de la clase IgA. Los anticuerpos eritrocitarios se clasifican como aloanticuerpos, si reconocen a antígenos que no están presentes en los eritrocitos del individuo o como autoanticuerpos si reaccionan con los antígenos eritrocitarios del propio individuo. Algunos de los aloanticuerpos se clasifican como naturales, si se desconoce el estímulo antigénico que los generó. Estos aparecen en el suero de individuos que carecen de los antígenos correspondientes, como son los anticuerpos del sistema ABO. Se pueden identificar también con especificidad para otros antígenos de los grupos sanguíneos, pero en menor frecuencia. Los aloanticuerpos generalmente se producen como resultado de la inmunización con eritrocitos por las transfusiones de sangre o por el paso trasplacentario de hematíes fetales durante el embarazo o el parto. La presencia de aloanticuerpos eritrocitarios implica la selección de componentes sanguíneos carentes de los antígenos específicos para los anticuerpos identificados para evitar las reacciones transfusionales hemolíticas.

Destrucción inmune de hematíes

Los anticuerpos por sí solo no causan daño a los hematíes, si no que a partir de su unión desencadena una serie de eventos que provocan la hemólisis inmune de los mismos.

La unión de los anticuerpos a los hematíes desencadena una serie de eventos que pueden subdividirse en tres fases:

1. En la primera fase ocurre la unión de los autos o aloanticuerpos a los antígenos eritrocitarios con o sin la activación del complemento. Los factores más importantes en esta etapa son la clase de inmunoglobulina y la subclase de IgG de los anticuerpos involucrados en la reacción.
2. En la segunda etapa los eritrocitos opsonizados interactúan con los fagocitos mononucleares por los receptores para el fragmento Fc de la Igs o los receptores para el fragmento C3b del complemento.
3. En la tercera fase los mediadores inflamatorios producidos en las dos primeras actúan sobre una variedad de células causando de esta forma las manifestaciones clínicas de la hemólisis.

En dependencia la clase de Igs de los anticuerpos y el sitio de destrucción de los hematíes la hemólisis inmune puede ser intravascular o extravascular.

Mecanismo de la Hemólisis intravascular

Este mecanismo es característico de los anticuerpos de la clase IgM fijadores de complemento por la vía clásica, en especial de los anti-A y anti-B. Ocurre, por ejemplo, cuando por error se administran hematíes de grupo A o B a receptores de grupo O. La hemólisis en este caso ocurre en el sitio de administración o sea dentro del vaso sanguíneo, de ahí su nombre de hemólisis intravascular.

La fijación del complemento por los anticuerpos IgM conlleva a la destrucción de los hematíes a partir de la unión del complejo de ataque a la membrana. Debido a la activación del complemento se liberan las anafilotóxicas C3a y C5a que son las responsables de los signos y síntomas de la hemólisis intravascular. El C3a y el C5a actúan sobre los fagocitos mononucleares y los neutrófilos estimulando el estallido respiratorio y aumentan los receptores para el C3b en estas células. Las anafilotóxicas C3a y C5a activan a su vez a los neutrófilos y basófilos para la liberación de mediadores de sus gránulos como la histamina, el factor de activación plaquetario, el factor de necrosis tumoral alfa (FNT α) y las interleucinas IL-1 a la IL-6 y los sintetizados a través del metabolismo del ácido araquínódico que son los Leucotrienos y las prostaglandinas. En adición las células fagocíticas mononucleares se activan per se por la fagocitosis y por el C5a, con la secreción consecuente de los mediadores de la respuesta inflamatoria aguda que son: el FNT, IL-8, las prostaglandinas, el factor de activación de neutrófilos y el factor quimiotáctico de neutrófilos.

Estos mediadores incrementan la permeabilidad vascular que conlleva a la hipotensión y el fallo renal. La liberación de los fosfolípidos de los hematíes por la hemólisis así como la activación del complemento activan la vía extrínseca de la coagulación y contribuye a la coagulación intravascular diseminada (CID). El FNT α y las IL-1 y IL-8 activan la vía intrínseca de la coagulación y son los responsables la CID. El FNT α también decrece la producción de trombomodulina que suprime la activación de la proteína C y promueve la coagulación. La disfunción renal es debido a la hipotensión, a la presencia de estroma de los hematíes, la liberación de citocinas, en especial la IL-1 que provoca la vasoconstricción de la microvasculatura renal, y al depósito de fibrina originado por la CID.

Esta reacción ocurre con la administración de únicamente de 5 a 20ml de sangre ABO incompatible. Debe esperarse que si únicamente los eritrocitos transfundidos incompatibles son los hemolizados las cifras de hemoglobina (Hb) posteriores a la transfusión sean similares a las que las precedieron. Sin embargo, la Hb manifiesta una disminución dramática muy inferiores a las cifras antes de la transfusión. Este fenómeno se debe a fijación del complemento no solo destruye a los hematíes incompatibles sino que también son hemolizados los hematíes autólogos comportándose estos como espectadores inocentes de la inmunohemólisis.

Mecanismo de hemólisis extravascular

La hemólisis en estos casos es causada por los autos o aloanticuerpos de las clases IgG e IgA fijadores o no del complemento y los hematíes son secuestrados en el hígado o el bazo en dependencia de las inmunoproteínas presentes en los eritrocitos. Los eritrocitos recubiertos con IgG fijadora del complemento escapan a la destrucción intravascular debido a la acción de las proteínas inactivadoras del C3, los factores H e I del plasma. El C3b es unido a los eritrocitos por la acción del complemento, el cual es convertido en C3b inactivado (C3bi) por la acción de los inactivadores. El factor I actúa sobre el C3bi convirtiéndolo en C3dg que es el fragmento que se detecta sobre los hematíes en las pruebas serológicas. Los macrófagos presentan receptores para el C3b que es el receptor para el complemento 1 (RC1) y para el C3bi a través del receptor para el complemento 3 (RC3). No se han demostrado receptores para el C3dg, por lo tanto, los hematíes recubiertos únicamente por este fragmento escapan a la destrucción.

La adherencia de los hematíes con auto o aloanticuerpos de las clases IgG e IgA se realiza a través de los receptores para el fragmento Fc (RF γ y RF α) de estas inmunoglobulinas y por los receptores para el C3b y el C3bi presentes en los macrófagos. Esta interacción conlleva a la fagocitosis o la citotoxicidad de los hematíes. La fagocitosis lisa los hematíes por los radicales de oxígeno liberados como resultado del estallido respiratorio. La citotoxicidad es mediada por las enzimas lisosomales liberadas por los fagocitos. El C3b sólo no media fagocitosis, pero aumenta grandemente ésta cuando es inducida por la IgG por la adherencia a los receptores para el C3b.

Los hematíes en los que se detecta Ig G pero no C3 son predominantemente destruidos en el bazo. En los que se detecta ambos tipos de inmunoproteínas son secuestrados en el hígado y el bazo. Los macrófagos del hígado

con receptores para el fragmento C3b no son eficientes en la destrucción de hematíes con C3b unido sin inmunoglobulinas. Estos inmovilizan a los eritrocitos vía receptor C3b y posteriormente deben atrapar las células por el RFc γ .

Es conocido que los receptores para el fragmento Fc de la Ig G pueden unir tanto la IgG libre en el plasma como la unida a una célula. En el bazo la concentración de eritrocitos es alta y la de plasma es reducida, o sea, que existen pequeñas concentraciones de IgG libre. Por tanto, la destrucción de células con IgG unida es eficiente. En contraste, el hematocrito en el hígado es menor y existen mayores concentraciones de IgG libre en plasma que pueden ocupar los receptores Fc. Los receptores para el C3b no son ocupados por el C3 no activado del plasma por lo que pueden reconocer los eritrocitos con IgG y C3 unido vía receptor C3b.

Los eritrocitos recubiertos con anticuerpos de la clase IgA son secuestrados en el bazo por un mecanismo similar al de la IgG a través de los receptores para el fragmento Fc de esta inmunoglobulina (RFc α)

Ciertos anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG3 pueden causar hemólisis intravascular por fijación de complemento, pero esto es infrecuente y algunos de la clase IgA pueden activar la vía alterna del complemento.

En la hemólisis extravascular también hay producción de citocinas que son de 2 tipos, las que se producen en grandes concentraciones (valores de ng/ml en 24 horas) como la IL-8 y otras producidas en niveles menores (valores de 100 pg/ml) como la IL-1B, IL-6 y el FNT α . Este último es de presentación tardía y queda circunscrito al sitio de destrucción fundamentalmente en el bazo. Tanto la IL-1B como la IL-6 producidos por los macrófagos en respuesta a la presencia de hematíes recubiertos de IgG, aumentan sus niveles de forma progresiva hasta aproximadamente los 100pg/ml. Al ser estos 2 factores de crecimiento y diferenciación de la célula B, estimulan a la misma para la producción de aloanticuerpos y autoanticuerpos que se asocia a menudo con la hemólisis extravascular.

Uno de los aspectos característicos de la hemólisis mediada por IgG es la producción de un inhibidor de la IL-1 o receptor antagonista de la IL-1 la IL-1ra. Los niveles de esta aparecen de forma paralela a los de IL-1B a pesar de que la expresión de la IL-1 precede a los de la IL-1ra. Al parecer la producción de este antagonista es un fenómeno relacionado con el estímulo de los hematíes recubiertos de IgG, más que una respuesta autocrina inducida por la producción de IL-1. Este relativo balance entre la IL-1 y su antagonista es la causa de la variabilidad clínica de la hemólisis extravascular.

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1ª Edición

Capítulo

II

*Sistemas de grupos
sanguíneos Abo, Fh, Lewis,
P. y los antígenos II*



Sistema de grupos sanguíneos. Generalidades

El grupo sanguíneo es un sistema de clasificación de la sangre humana. Alrededor de los glóbulos rojos existen unas moléculas, los antígenos, que son diferentes en cada grupo sanguíneo. De hecho, son las responsables de que un donante y un receptor sean compatibles en una transfusión de sangre.

Existen más de 300 antígenos que pueden estar en la superficie de los glóbulos rojos y que son los que marcan los grupos sanguíneos, sea porque, o bien están, o bien no están. De grupos hay 33, pero los dos más importantes porque afectan a casi la mayoría de la población son el grupo ABO y el grupo Rh. (3)

Los antígenos se caracterizan porque estimulan la formación de anticuerpos cuando detectan que la sangre que se ha transformado, no tiene el mismo antígeno que la del propio cuerpo, de forma que este es el factor que determina quién puede dar a quién.

En fin, existen muchos grupos sanguíneos y sistemas para clasificarlos. Un sistema de grupos sanguíneos es un grupo de uno o más antígenos gobernados por un solo locus génico o por un complejo de dos o más genes homólogos estrechamente ligados que han mostrado estar fenotípica y genéticamente relacionados entre sí.

Las dos clasificaciones más importantes para describir grupos sanguíneos en humanos son los antígenos del sistema ABO y el sistema. (4)

La membrana celular de los glóbulos rojos contiene en su superficie diferentes proteínas, las cuales son las responsables de los diferentes tipos de sangre. Existen principalmente dos tipos de proteínas que determinan el tipo de sangre, la proteína A y la B. (5)

El descubrimiento del sistema ABO, la transfusión y la identificación del anticuerpo anti- D, como causante de reacción transfusional y de la enfermedad Hemolítica Perinatal, propiciaron la identificación de varios de los numerosos sistemas polimórficos de los grupos sanguíneos eritrocitarios.

- Sistema MNSs
- Sistema P
- Sistema Kelly
- Sistema Duffy
- Sistema Kidd
- Sistema Lutheran.

Los antígenos y anticuerpos de estos sistemas pueden causar enfermedad Hemolítica Perinatal. (6)

Por otro lado, se informa que los antígenos de los grupos sanguíneos ABO, Hh, Lewis, P e Ii son moléculas de carbohidratos y es el producto de las enzimas glicosiltransferasas que están codificadas genéticamente. Los antígenos se forman cuando las transferasas añaden los azúcares sobre los oligosacáridos. El azúcar añadido le confiere la especificidad antigénica a la cadena de oligosacárido, por lo que se le denomina azúcar inmunodominante. Los oligosacáridos son cadenas de azúcares unidas a proteínas (glicoproteínas), esfingolípidos (glicoesfingolípidos) o lípidos (glicolípidos). Las glicoproteínas están asociadas con las membranas de los hematíes y de otras células. Las glicoproteínas con actividad de grupo sanguíneo pueden encontrarse también de forma soluble en el plasma y las secreciones. Los glicolípidos se encuentran en forma soluble en el plasma, pero no en las secreciones.

Sistemas ABO y Hh

El sistema ABO es el primer sistema de grupo sanguíneo humano. 1900, Karl Landsteiner descubrió los antígenos A y B del sistema de grupos sanguíneos ABO y sus correspondientes anticuerpos. Se define por la presencia de los antígenos eritrocitarios (A y B), que determinan, según si están presentes o no cuatro variedades de grupos: A, B, AB y O. también se caracteriza por la presencia de anticuerpos en el suero, estos son de producción natural y corresponden a los antígenos ausentes en los glóbulos rojos (anti-A y anti-B), reacciona a temperatura ambiente y son de tipo IgM. Existen otros tipos que se producen ocasionalmente como el anti A1 y el anti H (7).

Existen cuatro genes alternantes de este sistema; A1, A2, B y O. Uno de los genes alternantes, o alelomorfos, como se les denomina, se hereda del padre y el otro de la madre. Así pues, una persona tiene siempre dos de ellos y los dos constituyen lo que se llama su genotipo. Las tres clases de suero control existentes no pueden distinguir todos los 10 genotipos. Genéticamente conocemos los grupos que podemos distinguir con el término de fenotipos. Cuando se pueden reconocer los dos genes existentes, como en los grupos A1B, A2B y el grupo O, se puede con razón llamar genotipos (3).

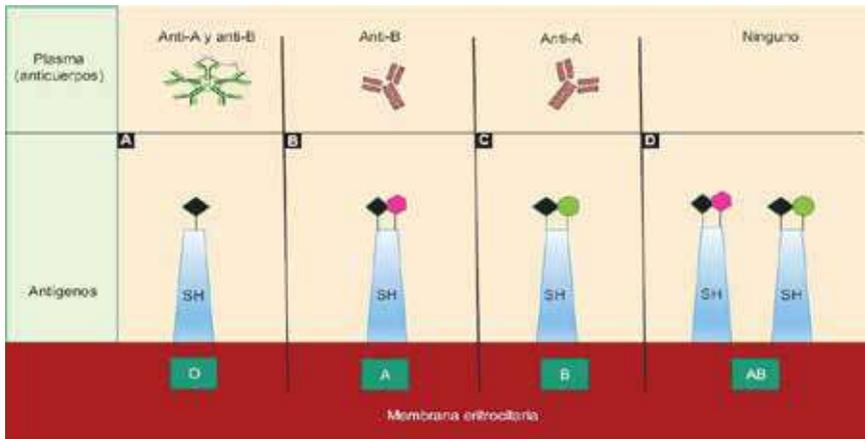
En referencia a los antígenos del sistema AB, se informa que los cuatro grupos sanguíneos de este sistema, AB, A, B y O, están determinados por la presencia o no de dos antígenos, denominados A y B en la membrana del eritrocito.

Los antígenos A y B se detectan en los eritrocitos fetales de solo 6 semanas, pero no alcanzan su máxima expresión hasta los 3 años de edad. Estos antígenos del sistema ABO no se hallan circunscriptos a los eritrocitos, sino que se encuentran también en leucocitos, plaquetas y células de tejidos. Asimismo, se encuentran sustancias activas de grupo sanguíneo en la mayoría de los líquidos orgánicos. Se dice que las personas cuyos líquidos orgánicos contienen sustancias de grupo sanguíneo son secretoras; aquellas cuyos líquidos orgánicos no contienen sustancias de grupo sanguíneo se denominan no secretoras. Los antígenos ABO también se encuentran también en las plaquetas y los linfocitos. Debido a que los antígenos ABO se demuestran en muchos de los tejidos del organismo son conocidos como antígenos de histo grupo -sanguíneos.

Este sistema tiene la característica que en el suero de cualquier individuo se demuestran los anticuerpos contra los antígenos que no posee, condición esta que solo se observa en este sistema de grupos sanguíneos.

Se considera el de mayor importancia transfusional debido a que la incompatibilidad ABO provoca hemólisis intravascular severa.

Figura 5. Antígenos del sistema sanguíneo ABO



Nota. Extraído de (12).

Los eritrocitos transportan una rica variedad de antígenos individuales. Algunos de ellos, aunque altamente inmunógenos, son tan frecuentes o tan raros que rara vez están involucrados en reacciones adversas, aunque pueden ser responsables de la inmunoacción sobre un feto o contra células trans-

fundidas. Las reacciones severas por transfusiones habitualmente se deben a incompatibilidad para los antígenos del sistema ABO. Estos antígenos son oligosacáridos y están codificados genéticamente por genes situados en loci separados (8).

Los anticuerpos antitéticos correspondientes del sistema ABO perduran por toda la vida por ello se les ha denominado anticuerpos naturales regulares, su significancia clínica radica en que son activos en un amplio rango térmico (de 4 a 37°C) son una mezcla de IgG, IgM e IgA. Cuando son IgM al entrar en contacto con eritrocitos incompatibles, producen hemólisis intravascular por su capacidad de activar el complemento hasta C9 (proteína del complemento).

Fenotipos del sistema ABO

Los fenotipos dentro del sistema ABO incluyen como se ha indicado el grupo sanguíneo A, B, O y AB que presentan una distribución variable entre los diferentes grupos raciales. Las determinaciones de este grupo incluyen el empleo de reactivos hemoclasificadores anti-A, anti-B y anti-AB para la detección de los antígenos específicos en los eritrocitos, así como la determinación de los anticuerpos séricos con el empleo de eritrocitos de fenotipo ABO conocido.

Genética y Bioquímica

Los glicosfingolípidos que portan los oligosacáridos A o B son parte integrante de la membrana de los hematíes, de las células epiteliales y endoteliales y están presentes también en forma soluble en el plasma. En las personas que poseen el gen secretor (Se) se identifican glicoproteínas con los oligosacáridos inmunodominantes A y B en la saliva, en correspondencia con el grupo ABO del individuo. Estos oligosacáridos están presentes también en la leche materna y en la orina.

Los genes de tres loci diferentes controlan la expresión de los antígenos de los grupos sanguíneos ABO. Los genes ABO que incluyen los cuatro alelos más comunes A1, A2, B y O, los genes del locus H y Se. Los genes A y B codifican para las glicosiltransferasas que producen los antígenos A y B respectivamente. El gen O no es funcional debido a que no determina ningún antígeno de grupo sanguíneo. Los hematíes de los individuos de grupo O carecen de los antígenos A y B, pero contienen grandes cantidades de sustancia H que es la sustancia precursora de los antígenos A y B. Los genes de

los loci Hh y Sese (secretor) están estrechamente ligados y se localizan en el cromosoma 19. Cada locus tiene dos alelos, los alelos h y se son amorfos. El alelo H produce una transferasa que actúa a nivel celular promoviendo la formación del antígeno H sobre el que se construyen los antígenos A y B. El gen Se es responsable de la expresión del antígeno H en las glicoproteínas de las secreciones como la saliva. El 80% de la población es secretor debido a que ha heredado el gen Se y produce el antígeno H en sus secreciones que puede convertirse en A y/o B, según el código genético del secretor. Los individuos que presentan el gen se no secretan sustancias de grupo sanguíneo en la saliva.

Los genes A y B no producen directamente los antígenos sino las enzimas glicosiltransferasas que añaden los azúcares específicos a las cadenas de oligosacáridos que se han convertido en H por la acción del gen H. Los antígenos H se construyen sobre los extremos de las cadenas de oligosacáridos precursores llamados tipo 1 y tipo 2. El carbono número 1 de la hexosa terminal β -D-galactosa (Gal) forma en las cadenas de tipo 1 un enlace con el carbono número 3 de la N-acetilglucosamina (NacGlu) preterminal, mientras que en las cadenas de tipo 2 este enlace se realiza con el carbono número 4 de la NacGlu. Las glicoproteínas de grupo sanguíneo presentes en las superficies celulares o en los fluidos corporales pueden tener cadenas de tipo 1 y cadenas tipo 2. Los glicoesfingolípidos presentes en el plasma y en las membranas de la mayoría de las células glandulares y parenquimatosas también tienen cadenas de tipo 1 y cadenas tipo 2. En cambio, los antígenos glicolípidos de los hematíes están formados únicamente por cadenas de tipo 2. Estas cadenas son transportadas por un tipo de glicoesfingolípido llamado paraglobósido.

A nivel celular, la transferasa codificada por el gen H produce una fucosiltransferasa que añade fucosa (Fuc) a la Gal terminal de las cadenas de tipo 2 mediante un enlace α 1-2). Las transferasas de los genes A y B pueden unir sus azúcares inmunodominantes únicamente cuando las cadenas de tipo 1 o 2 han sustituido un residuo por Fuc, esto es cuando se han convertido en H, de manera que los antígenos A y B sólo se producen a expensas del antígeno H. La N-acetilgalactosaminiltransferasa producida por el gen A y la galactosaminiltransferasa producida por el gen B añaden NacGal y Gal respectivamente al mismo residuo de Gal sobre el que actuó la transferasa del gen H mediante un enlace α (1-3).

Los alelos del locus ABO que dan lugar a subgrupos de A y B producen transferasas que se distinguen entre sí por su capacidad para convertir el

antígeno H. El gen O produce una proteína que no tiene actividad de transferasa. Como consecuencia los hematíes de los individuos de grupo O tienen antígeno H detectable

Biología Molecular

Los genes A y B difieren entre sí por la sustitución de siete bases que resultan en cuatro sustituciones de aminoácidos posibles en las posiciones 176, 235, 266 y 268 de las transferasas A y B. Esto demuestra la naturaleza alélica de estos genes ya que presentan una gran homología en la secuencia de nucleótidos. En los subgrupos de A el alelo A presentan otras mutaciones que resultan en la codificación de las transferasas con diferencias en la capacidad para convertir el antígeno H. Los genes A² presentan la delección de un nucleótido cerca del carboxilo terminal de la transferasa A, como resultado la glicosiltransferasa A₂ posee un dominio extra de 21 aminoácidos. Este dominio parece ser el responsable de la disminución de la actividad de la enzima y de su reconocimiento restringido por el sustrato. Se han determinado también las bases genéticas de otros fenotipos como el A₃, A_x y el cis-AB. Las secuencias de bases del gen O es similar al del gen A excepto por una delección de una base en la posición 261. Esta selección conlleva a la producción de una proteína truncada sin actividad de transferasa que caracteriza al alelo más común (O¹). El otro alelo (O²) codifica a una proteína similar a la transferasa B pero con sustituciones de nucleótidos en las posiciones 176 y 268.

Los individuos que no poseen el gen Se expresan cadenas de tipo 1 y 2 sin actividad A, B o H. Los genes H y Se codifican para fucosiltransferasas. La enzima producida por el gen H actúa primariamente sobre las cadenas de tipo 2 que predominan en los hematíes. La enzima producida por el gen Se actúa preferencialmente sobre las cadenas de tipo 1 de las glándulas secretoras. Los estudios de las secreciones de los individuos de fenotipo O_h sugieren que existen dos tipos de antígeno H. Los individuos que no poseen los genes H y Se, o sea de genotipo hh y sese, no poseen antígeno H y por lo tanto no tienen antígenos H, A y B en los hematíes y en las secreciones. Sin embargo, se han demostrado antígenos A, B y H en las secreciones de algunos individuos hh en los que se ha demostrado por estudios familiares que poseen al menos un gen Se.

Subgrupos del sistema ABO

Los fenotipos A y B se dividen en subgrupos de acuerdo a su reacción con los sueros hemoclasificadores anti-A, anti-B y anti-AB, así como con las lectinas anti-A₁, obtenida a partir de semillas de *Dolichos biflorus*, y anti-H extraída de semillas de *Ulex europaeus*. Para su clasificación es también importante la determinación de los antígenos A, B y H en la saliva y de la reacción del suero con los hematíes de fenotipo A₁, A₂, B y O. Los subgrupos de A y B muestran diferencias cuantitativas debido a que se poseen una disminución de los sitios antigénicos por hematíes. También se invocan diferencias cualitativas ya que ocasionalmente se detectan anticuerpos contra los antígenos A y B comunes. Los subgrupos más comunes se encuentran dentro del grupo sanguíneo A. Los dos subgrupos principales son A₁, A₁B y A₂, A₂B que corresponden al 80% y al 20% de los grupos A y AB respectivamente. Los genes A₁ y A₂ determinan diferentes transferasas que median diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre los fenotipos A₁ y A₂. Las distinciones serológicas entre A₁ y A₂ se realizan con los reactivos anti-A₁ y anti-H. El anti-A₁ aglutina los hematíes A₁ y A₁B, pero no los hematíes A₂ y A₂B, el reactivo anti-H aglutina los eritrocitos A₂ y A₂B y no reconoce a los hematíes A₁ y A₁B. En el suero del 1-8% de las personas de grupo A₂ y en el 22 al 35% de las de grupo A₂B se detectan aloanticuerpos anti-A₁. El anti-A₁ puede causar discrepancias en la determinación del grupo ABO y en las pruebas de compatibilidad pretransfusionales. Los anticuerpos anti-A₁ reaccionan mejor o únicamente a temperaturas inferiores a 37°C y no se consideran de importancia transfusional, a menos que sean hemolíticos a 37°C. La detección de rutina de estos anticuerpos (anti-A₁) en los pacientes o en los donantes de sangre de grupo A es innecesaria. Los restantes subgrupos de A y B se identifican solo ocasionalmente y tienen poca importancia para la transfusión. Los subgrupos de A son muy útiles para el control de los reactivos hemoclasificadores policlonales y monoclonales anti-A. La distribución de los subgrupos de A también es diferente entre los diferentes grupos raciales.

Anticuerpos del sistema ABO

Los anticuerpos del sistema ABO se reconocen como anticuerpos naturales, aunque estos se producen rápidamente después del nacimiento por exposición a través de la ingestión o inhalación de sustancias antigénicas presentes en los polisacáridos bacterianos, alimentos y el polen. Comúnmente los individuos poseen los anticuerpos anti-A o anti-B que están ausentes de sus

hematíes. Esto permite determinar el grupo ABO del individuo por la detección de estos en el suero. Los anticuerpos anti-A y anti-B se detectan alrededor de los 4 a los 6 meses de edad que se incrementan en su concentración hasta los 5 a los 10 años de edad y declinan en edades muy avanzadas. Los anticuerpos de este sistema incluyen los anti-A, anti-B y anti-AB. Este último es producido por las personas de grupo O y reacciona con estructuras comunes a los antígenos A y B por lo que no pueden separarse las actividades anti-A de las anti-B. Estos anticuerpos anti-AB son muy útiles para la detección de los subgrupos Ax y Bx ya que estos son únicamente aglutinados por los anti-AB y no por los anti-A y anti-B.

Los anticuerpos naturales anti-A y anti-B son predominantemente de la clase IgM, aunque pueden detectarse pequeñas concentraciones de IgG. Los anticuerpos anti-AB son generalmente de la clase IgG, por este motivo los recién nacidos de madres de grupo O tienen más riesgos de padecer de enfermedad hemolítica por incompatibilidad ABO que aquellos de madres de grupo A o B. Ambas clases de anticuerpos aglutinan preferencialmente los hematíes a temperatura ambiente (20-24°C) y activan eficientemente el complemento a 37°C. Los anticuerpos inmunes son de la clase IgG y se producen como respuesta a inmunizaciones trasplacentarias, a la inyección deliberada de sustancias de grupo sanguíneo para la producción de reactivos hemoclasificadores o por la transfusión accidental de hematíes ABO incompatibles.

Los anticuerpos anti-A, -B,-AB de la clase IgA están también presentes en el calostro, saliva y lágrimas.

Anti-A₁: Los anticuerpos anti-A₁ se detectan regularmente en el suero de algunos de los subgrupos de A, como un anticuerpo natural y carecen de importancia clínica a menos que aglutinen o hemolicen los hematíes a 37°C. Para fines diagnósticos es muy útil para diferenciar entre los subgrupos A₁ y A₂.

Determinación del grupo sanguíneo ABO

Para la determinación del grupo sanguíneo ABO se requiere del empleo de los reactivos hemoclasificadores anti-A, anti-B y anti-AB y de hematíes de fenotipo A₁ y B para el tipaje sérico o grupo reverso. Las determinaciones de rutina tanto en los pacientes como en los donantes de sangre deben incluir las determinaciones del antígeno en los hematíes como el grupo sérico y los resultados deben ser coincidentes. Para confirmar el tipaje ABO de una unidad de sangre ya previamente clasificada es únicamente necesario realizar el tipaje celular, así como para la determinación del grupo sanguíneo de niños

menores de 4 años de edad, donde los anticuerpos no son aún detectables. Las técnicas de determinación del grupo sanguíneo ABO incluyen los procedimientos en láminas, tubos y microplacas. Sin embargo, las técnicas de láminas no se recomiendan debido a que pueden no detectar expresiones débiles de los antígenos o anticuerpos en bajas concentraciones. En ocasiones es necesario incluir hematíes A2 para el grupo reverso cuando se sospecha la presencia de anticuerpos anti-A1. Los hematíes de grupo O deben de formar parte de las determinaciones de anticuerpos para la detección de aloanticuerpos reactivos a temperaturas ambiente que puedan interferir con las determinaciones o alerten sobre la presencia de los mismos.

Discrepancias en las determinaciones del grupo ABO

Raramente se observan discrepancias o dificultades en la determinación del grupo sanguíneo ABO. Las discrepancias se observan cuando no hay coincidencia entre el grupo celular y el serológico, por otra parte, pueden observarse expresiones débiles de los antígenos que imposibilita la determinación exacta del fenotipo. Cuando esto ocurre se hace necesario recurrir al empleo de procedimientos más complejos como son los estudios de adsorción-elución y en algunos casos hasta las determinaciones de las transferasas séricas para la confirmación del fenotipo. Algunas de las discrepancias más comunes se describen en la tabla 6.

De ser necesaria la transfusión urgente en un paciente en que no sea posible la determinación del grupo ABO rápidamente, debe transfundirse concentrado de hematíes de grupo O y de ser necesario un derivado plasmático este será de grupo AB. Deberá de extraerse una muestra de sangre al paciente previo a la transfusión para concluir los estudios de grupo ABO.

Fenotipos del sistema Hh

Aunque muchas de las características de este sistema han sido abordadas dentro del sistema ABO, es necesario precisar los hallazgos no comentados anteriormente. El sistema H tiene dos genes, H y h y un antígeno, H. La cantidad de H en los hematíes de los diferentes fenotipos es en orden decreciente la siguiente $O > A_2 > B > A_2B > A_1 > A_1B$. Los individuos que son homocigóticos para el gen h no presentan antígeno H en los hematíes y se conocen como fenotipo Bombay u Oh. Los hematíes de este raro fenotipo no son aglutinados por anti-A, -B, -AB o anti-H y presentan en su suero anti-A, -B y anti-H. Gén-

ticamente pueden haber heredado los genes A y/o B pero no son capaces de expresarse por la ausencia de la sustancia H precursora en sus hematíes. Este fenotipo se descubre cuando el mezclar el suero con hematíes de grupo O en el grupo reverso aparece una aglutinación inmediata y sus hematíes no reaccionan con anti-H obtenido a partir de la lectina de *Ulex europaeus*. El anti-H de los individuos Oh reacciona en un rango de 4 a 37°C con todos los hematíes excepto con los hematíes Oh. Los individuos de este grupo tienen que transfundirse con hematíes del mismo fenotipo.

En raras ocasiones en los individuos de grupo A₁ y A₁B pueden demostrarse anti-H, pero estos anticuerpos reaccionan únicamente a temperatura ambiente o a temperaturas más bajas y no se consideran clínicamente importantes para la transfusión.

Sistema Lewis

El sistema Lewis tiene dos genes, Le y le, y dos antígenos principales, el Le^a y el Le^b. Los antígenos del sistema Lewis se producen a partir de la misma cadena precursora de tipo 1 que los antígenos ABO solubles. A diferencia de los antígenos ABO, los antígenos del sistema Lewis no se sintetizan directamente en la membrana de los eritrocitos, sino que se expresan en los glicoesfingolípidos y son adsorbidos del plasma a los eritrocitos. Al igual que los antígenos ABO, estos antígenos se distribuyen en todos los fluidos corporales y tejidos, y son de importancia clínica en el trasplante de órganos. Al nacimiento, los antígenos Lewis no están bien expresados en los eritrocitos, por lo que los eritrocitos del cordón umbilical resultan ser Le (a-b-) (9).

Genética y Bioquímica

Los genes de este sistema están en el cromosoma 19. El gen **Le** codifica para la enzima α -4-L fucosiltransferasa, que añade fucosa en el cuarto carbono de la NAcGlu subterminal de la cadena precursora de tipo 1. Esto resulta en la producción del antígeno Le^a. En las cadenas de tipo 2 el carbono cuarto no está libre para la adición de fucosa por lo que a partir de esta cadena nunca habrá formación de los antígenos Lewis. Por esta razón los antígenos Lewis no son intrínsecos de los hematíes ya que las cadenas de la membrana de esta célula son de tipo 2.

La producción del antígeno Le^b depende de la interacción de los genes **Le**, **Se** y **H**. El gen **Se** regula la expresión del gen **H** en las secreciones, la

presencia del gen Se presupone la producción de sustancia H tipo 1. La enzima codificada por el gen Le también añade fucosa a la cadena H tipo 1 en el cuarto carbono de la NacGlu para formar el antígeno Leb. Debido a que la sustancia H es el precursor del Leb, esta tiene que estar en las secreciones por lo que obligatoriamente tiene que ser secretor el individuo que posea el antígeno Leb. De esta forma la presencia del gen Le sin el gen Se resulta en la producción de Lea. El Leb representa la presencia de ambos y la presencia de Se sin Le no codifica para antígenos Lewis. De esta forma todos los individuos no secretores son de fenotipo Le(a+b-). La absorción de sustancia Lewis del plasma es preferencialmente de tipo Leb, de esta forma los individuos que poseen los genes Se y Le expresan el antígeno Le^b y no el Le^a, pero se detectan ambos antígenos en la saliva. Las personas homocigóticas para el alelo *le* no producen sustancias Le^a o Le^b y su fenotipo eritrocitario es Le(a-b-). Los eritrocitos de fenotipo Le(a+b+) son muy raros, este fenotipo se descubre más frecuentemente cuando se usan anticuerpos monoclonales potentes.

Otros dos antígenos se reconocen en los hematíes de fenotipo Le(a-b-), estos son el Le^d y el Le^c. El primero está presente en los individuos Le(a-b-) secretores y el segundo en los no secretores. El descubrimiento de estos conllevó a la hipótesis de que el gen *le* no era amorfo si no que codificaba para alguna fucosiltransferasa, pero esta hipótesis fue rechazada posteriormente por estudios familiares. En la actualidad se conoce que el antígeno Le^c es la cadena precursora tipo 1 y que el Le^d es la sustancia H tipo 1, que son adsorbidas en los hematíes. Estos anticuerpos se han obtenido en animales por inmunización con saliva de individuos de fenotipo Le(a-b-) y no tienen importancia clínica en los humanos. Adicionalmente los hematíes de los adultos de fenotipo Le(a-b-) carecen del antígeno Le^x, el cual es un determinante común del Lea y el Leb. Serológicamente los anti-Lex se reconocen como un anticuerpo con actividad anti-Le^a y anti-Le^b debido a que este anticuerpo reacciona con todos los eritrocitos excepto con los de fenotipo Le(a-b-). El antígeno Le^x se reconoce como un precursor de los antígenos Lea y Leb y está presente en los eritrocitos del cordón umbilical.

Anticuerpos del sistema Lewis

Tanto los anti-Le^a como los anti-Le^b son anticuerpos naturales de la clase IgM. La temperatura óptima de reacción es a temperatura ambiente, aunque algún anti-Le^a puede reaccionar a 37°C. También se puede observar hemólisis in vitro por algunos anti-Le^a. Se han reportado algunas reacciones hemolíticas

por anti- Le^a no así por anti- Le^b. Se recomienda que estos anticuerpos se deban considerar de importancia clínica si son capaces de provocar hemólisis in vitro de los hematíes o si reaccionan fuertemente en la prueba de antiglobulina (Coombs) y por lo tanto se le administrará al paciente hematíes carentes del antígeno específico. De no tener disponibles hematíes compatibles, puede administrarse previo a la transfusión de estos, plasma que contenga antígenos Lewis solubles para neutralizar a los anticuerpos. Los anticuerpos de este sistema no provocan enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), ya que en su mayoría son de la clase IgM y los antígenos Lewis están muy pocos expresados en los hematíes de los recién nacidos.

Antígenos I e i

AL igual que los antígenos A, B, H y los antígenos Lewis, los antígenos I e i se derivan de los glicoesfingolípidos o de las glicoproteínas asociados a las membranas. Estos antígenos no están codificados por genes alélicos, por lo que no se les considera como un sistema de grupos sanguíneos. La actividad del antígeno i se asocia con la estructura H lineales, mientras que el antígeno I se asocia a estructuras H ramificadas. Se ha sugerido que el gen I codifica para una enzima responsable de ramificar las cadenas H y producir el antígeno I. Los eritrocitos de cordón son I – i+. Desde el nacimiento hasta los 18 meses la expresión del antígeno i decrece gradualmente y la del antígeno I aumenta hasta llegar a su máxima expresión en los eritrocitos del adulto que son I + i –. Algunos individuos adultos no desarrollan el fenotipo I + i – y se mantienen como i + I – y se clasifican como fenotipo iadulto. Al parecer esto se debe a la herencia de un patrón recesivo. En la tabla 8 se muestra los fenotipos de los antígenos Ii. El antígeno I también se demuestra en los leucocitos y en las plaquetas además de en los fluidos corporales.

Anticuerpos anti-Ii

Los anticuerpos anti-I se pueden identificar tanto como aloanticuerpos como autoanticuerpos, su rango óptimo de temperatura es inferior a 22°C. Los aloanti-I son muy pocos frecuentes debidos a que se identifican como anticuerpos naturales de las clases IgM e IgG en individuos de fenotipo iadulto y este fenotipo es extremadamente raro.

Los autoanti-I son comunes encontrarlos como aglutininas frías de la clase IgM de bajo título en la mayoría de los individuos sanos. Estos autoanticuerpos

pueden convertirse en patogénicos y provocar síndrome de aglutininas frías. La presencia de anti-I de altos títulos se asocia con la infección por *Mycoplasma pneumoniae*. La asociación de estos autoanticuerpos con enfermedades autoinmunes se describe en el acápite de Anemias Hemolíticas Autoinmunes.

Los anticuerpos anti-i son muy poco frecuente, pero se han encontrado autoanti-i potentes en el suero de los pacientes con mononucleosis infecciosa y en pacientes con cirrosis alcohólica. No se han comunicado aloanti-i. Se han descrito también anticuerpos contra antígenos compuestos como anti-IA, -IB, -IH e ILe^{bH} que reaccionan únicamente con eritrocitos que poseen ambos antígenos.

Sistema P y antígenos relacionados

Los grupos P fueron descubiertos por Landsteiner y Levine en el año 1927. Se pueden distinguir dos grupos, P-positivos y P-negativos. El antígeno P-positivo se hereda como carácter mendeliano dominante.

Originalmente este sistema contiene un solo antígeno denominado P, posteriormente es clasificado como P1. Se denomina P al antígeno presente en casi la totalidad de los eritrocitos humanos. Los antígenos P, P1^k, P2^k y LKE (Luke), antes considerados parte del sistema P, han sido asignados a la colección de antígenos globósidos. Los eritrocitos que no poseen el antígeno P1, pero presentan P, son del fenotipo P₂. El antígeno P1 está presente en los eritrocitos del 79% de los individuos blancos y en el 94% de los negros. Los antígenos P, P1 y P^k se encuentran, en los eritrocitos, plaquetas, leucocitos y fibroblastos. Los antígenos P y P^k también están en el plasma.

Varios fenotipos raros se asocian con el sistema de grupos sanguíneos P. El fenotipo P^k ocurre cuando el antígeno Pk no es convertido en P. Muy pocas personas carecen de los antígenos P1, P y P^k y se dice que estos individuos son del fenotipo p. Los eritrocitos de los fenotipos P1^k y P2^k son aglutinados por la bacteria causante de la meningitis (*Streptococcus suis*). El antígeno P es el receptor para el parvovirus B19, el cual puede ocasionar crisis aplásticas, de esta forma los individuos de fenotipo p son resistentes a la infección por este agente.

Genética y Bioquímica

Estos antígenos están bioquímicamente relacionados con los antígenos A, B, H, I, i y con los del sistema Lewis. Los antígenos de este sistema y los relacionados son producidos por transferasas específicas que añaden el azúcar inmunodominante a los glicoesfingolípidos precursores, proceso análogo al desarrollo de los antígenos A, B, H. Todos los antígenos descritos se expresan exclusivamente en los glucolípidos de los eritrocitos. Los determinantes P^k se forman cuando se agrega Gal en el enlace $\alpha(1-4)$ a los residuos de terminales Gal de la lactoseramida. Consecutivamente, esta estructura puede ser convertida a globósido P por la adición de GalNAc en el enlace $\beta(1-3)$. El P₁ se forma por la adición de Gal en un enlace $\alpha(1-4)$ a una estructura diferente denominada paraglobósido. El paraglobósido es el precursor sobre el que se construye los antígenos celulares A, B, H, I e i. El antígeno P es el resultado de la adición de NeuNAc a la galactosa terminal en $\alpha(2-3)$. Se cree que el gen responsable es independiente del sistema P.

Anticuerpos del sistema P y de antígenos relacionados

El suero de personas P₂ contiene comúnmente anti-P₁, si se aplican técnicas lo suficiente sensibles para su detección. Este anticuerpo reacciona óptimamente a 4°C pero puede ser detectado en ocasiones a 37°C. El anti-P₁ raramente se ha implicado en reacciones hemolíticas y como generalmente es de naturaleza IgM, no provoca EHRN. El antígeno P₁ muestra variaciones en su expresión entre los individuos, esto en ocasiones dificulta la detección e identificación de los mismos por lo que preferente se identifican a bajas temperaturas o con eritrocitos tratados con enzimas proteolíticas. Los individuos cuyos eritrocitos tienen P^k en lugar de P forman aloanti-P que reaccionan tanto con eritrocitos de fenotipo P₁ como P₂. La hemolisina bifásica que caracteriza a la Hemoglobinuria paroxística a frío es frecuentemente de esta especificidad. Los individuos de fenotipo p poseen en su suero un anticuerpo hemolítico de la clase IgM con especificidad anti-P₁+P+P^k, anteriormente denominado como anti-Tj^a. Este anticuerpo causa reacciones transfusionales hemolíticas (RTH) y en ocasiones EHRN cuando son de la clase IgG. Existe asociación entre la presencia de estos anticuerpos y los abortos en mujeres de fenotipo p.

Sistemas de grupos sanguíneos Rh y LW

Debido a la relación histórica que tienen estos dos sistemas desde su descubrimiento lo abordaremos en un solo acápite, aunque hoy conocemos que solo existe una asociación fenotípica entre ellos.

Sistema de grupo sanguíneo Rh

El descubrimiento del sistema Rh se le atribuye a Landsteiner y Wiener en 1940 a partir de sus experimentos con animales al inmunizar a conejos con hematíes del mono *Macacus rhesus*. Los anticuerpos obtenidos aglutinaban los eritrocitos del 85% de los individuos y se planteó que estos eran portadores del factor Rh o sea Rh positivos. Al 15% restante se les clasificó como Rh negativos.

Posteriormente se reportó que los anticuerpos anti-Rh obtenidos en conejos eran de igual especificidad a los encontrados por Levine y Stelson en 1939 en una puérpara con un hijo afectado por EHRN. De esta forma se describió el conflicto materno fetal por incompatibilidad Rh. Investigaciones ulteriores demostraron que los anticuerpos obtenidos en conejos por inmunización con hematíes del mono rhesus reconocían antígenos diferentes a lo que hoy conocemos como el antígeno RhD y se les agrupó en un nuevo sistema denominado con las iniciales de sus descubridores (LW). El sistema Rh en la actualidad es el sistema de grupos sanguíneos eritrocitarios más polimórfico en los humanos y comprende un total de 46 antígenos.

En este sentido, indica González (10) que el sistema descrito por Landsteiner y Wiener basado en experimentos con el macaco Rhesus y por Levine en pacientes entre 1939 y 1940, es el sistema de mayor importancia clínica y transfusional tras el ABO, con aparición frecuente de enfermedad hemolítica neonatal (por anti-D) y el de mayor complejidad.

Por otro lado, Vásquez et al. (11) exponen que estos antígenos se ubican sobre dos proteínas que se expresan en la membrana de los eritrocitos: Rh D (CD240D) y Rh CE (CD240CE). La primera lleva al antígeno D (Rh1) y sus variantes y la segunda a los antígenos C, E, c y e (Rh2 al Rh5) en diferentes combinaciones (CE, cE, Ce y ce) y variantes.

Su importancia hemoterápica radica en la frecuencia con que puede originar reacciones transfusionales hemolíticas (incluso mortales) y en la gravedad de muchas formas de isoimmunización Rh materno fetal con enfermedad hemolítica del recién nacido.

Genes y antígenos del sistema Rh

El locus RH está constituido por dos genes homólogos, RHD y RHCE, de 10 exones cada uno, con una extensión cercana a 60 kb de DNA genómico Cortés et al. (2). Están ubicados en el cromosoma 1, en la posición 1p34-36, y distribuidos en forma de tándem (uno a continuación del otro), pero con orientaciones opuestas (5'RHD3'-3'RHCE5'). El gen RHD está flanqueado por dos regiones de 9 kb y un 98.6% de homología denominadas "cajas Rhesus", y codifica el antígeno D y el gen RHCE codifica los antígenos CE en varias combinaciones (ce, cE, Ce, o CE). (12)

La presencia o ausencia del gen RHD en el ADN humano determina las bases moleculares del polimorfismo Rh D positivo y Rh D negativo. Los individuos Rh D positivos poseen los dos genes RH, mientras que el fenotipo Rh D negativo resulta de la ausencia del gen RHD, estos genes son heredados por los progenitores como carácter mendeliano y se expresan a partir de la sexta semana de vida intrauterina. (13)

El sistema Rh es muy complejo y hasta el momento se han descrito un total de 56 antígenos, y a nivel molecular se han definido unos 170 alelos, de manera que su estructura genómica es muy polimórfica. (14)

El antígeno D es el más inmunogénico del sistema Rh, 20 veces más potente que el c. Aproximadamente el 80% de los individuos Rh negativos que reciben sangre Rh positiva producirán anticuerpos anti-D después del primer contacto y sólo entre el 7% y el 8% de los individuos Rh negativos seguirán sin respuesta. (15)

Los principales antígenos del sistema Rh en medicina transfusional por orden de inmunogenicidad son D, c, E, e y C. (12)

Nomenclatura

Desde el descubrimiento del sistema Rh varias nomenclaturas se han propuesto en concordancia a la teoría genética que pretendía demostrar. En 1943, Fisher y Race propusieron la existencia de tres loci o genes separados, pero estrechamente ligados en haplotipos en el mismo cromosoma y heredados en grupos de tres. El haplotipo más heredado es CDe y cde, para los sujetos con Rh positivo y negativo, respectivamente. La nomenclatura de Fisher-Race (CDE), es considerada la más usada. En 1951, Wiener propuso la existencia de un solo gen complejo, con alelos que resultan en varios antígenos del Rh.

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

La terminología de los genes y proteínas del sistema Rh se relacionó con la teoría vigente en su tiempo sobre la herencia de este sistema. Adicionalmente, la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea agregó la terminación numérica para los antígenos del Rh, basándose en la nomenclatura descrita por Rosenfield. (13)

Posteriormente se unificaron estas nomenclaturas y se hicieron equivalencias, de esta manera, el haplotipo conocido como “CDe” en el sistema de Fisher y Race equivale a “R1” en el sistema de Wiener, “cDE” a “R2”, y otros, como se muestra en la tabla siguiente. La letra mayúscula “R” se utiliza cuando se expresa el antígeno D, y la letra minúscula “r” cuando el antígeno no se expresa. (16)

Tabla 3. Nomenclatura del sistema Rh según Fisher/Race y Wiener

Fisher/Race	Wiener
CDe	R ¹
cDE	R ²
CDE	R ²
cDe	R ⁰
cde	r
Cde	r ¹
cdE	r ¹⁰
CdE	r ^v

Nota. Extraído de (16).

A partir de los ocho haplotipos se pueden obtener 64 posibles combinaciones, de las cuales derivan los 18 fenotipos posibles. En medicina transfusional, estas nomenclaturas son muy útiles para comunicar el fenotipo Rh de los pacientes y donadores.

Tabla 4. Fenotipos posibles dentro del sistema Rh

Fenotipos posibles dentro del sistema Rh	Wiener
RHD (+)	RHD (-)
CcDEe	CcdEe
CcDe	Ccde
cDEe	CdEe
cDe	Cde
CDe	Cde

CDE	CdE
CcDE	CcdE
cDE	CdE
CDEe	CdEe

Nota. Extraído de (16).

Rosenfield en 1962 propuso un sistema numérico para denominar a los antígenos, pero esta notación no es práctica debido a que el número de antígenos aumenta constantemente y es difícil de relacionarlos numéricamente.

El antígeno D

El término Rh+ y Rh- hacen referencia únicamente a la presencia o ausencia del antígeno D (Rh0) en los hematíes. Este antígeno después de los A y B del sistema ABO es el de mayor importancia en la práctica transfusional. A diferencia del sistema ABO, los individuos que carecen del antígeno D, o sea los Rh-, no presentan anticuerpos anti-D naturales en el suero. La formación de estos anticuerpos se produce por exposiciones a hematíes D+ a través de las transfusiones de sangre o embarazos. La inmunogenicidad de este antígeno es tal que el 80% de los individuos RhD- producen anticuerpos anti-D con la transfusión de una unidad de sangre RhD+. Estos anticuerpos son los responsables de la EHRN en las embarazadas RhD-.

Los antígenos C, c, E, e

Después del antígeno D, los antígenos C, c, E, e son los más importantes del sistema Rh ya que están involucrados en más del 99% de los problemas clínicos relacionados con el sistema Rh. Estos antígenos están representados en todos los individuos independientes de la presencia del D, aunque su frecuencia difiere en los individuos Rh+ y Rh-. Los cinco antígenos (D, C, c, E, e) constituye la base del sistema Rh.

Genética y Bioquímica

La genética del sistema Rh ha estado sujeta a controversias. Según la teoría de Wiener existía un solo gen con alelos múltiples que determinaba la presencia de estructuras de membrana que denominó aglutinógenos. Cada aglutinógeno expresaba tres determinantes antigénicos diferentes. El individuo poseía dos aglutinógenos, uno derivado del gen materno y otro del pa-

terno, de ahí la nomenclatura Rh-hr. Fisher y Race por su parte basándose en que los antígenos C y c, y los E y e son antitéticos propusieron otra teoría. Estos investigadores describieron un sistema de tres genes estrechamente ligados en un loci o sub loci en cada cromosoma que se heredaban en bloque o haplotipo. Cada individuo hereda un haplotipo de cada parental. Ellos también introdujeron la nomenclatura DCE para designar a los alelos, que incluye el uso del "d" para reflejar la ausencia de D. Las proteínas Rh son parte de un gran complejo de membrana que incluyen las proteínas Rh (RhD, RhCcEe), las glicoproteínas asociadas, RhAG o Rh 50 y las accesorias dentro de las que se encuentran el LW, la glicoforina B (GPB), la banda 3, la glicoproteína Duffy y la integrina CD. (17)

Biología Molecular

La biología molecular demostró que ninguna de las dos teorías sobre la genética del sistema Rh es correcta. Los estudios de ADN demostraron que los antígenos del sistema Rh están codificados por dos genes altamente homólogos en el brazo corto del cromosoma 1. El gen RHD determina la presencia de una proteína que le confiere la actividad D a los hematíes. Los individuos RhD positivos poseen uno o dos genes RHD en dependencia que sean homocigóticos o heterocigóticos. Los individuos RhD negativos generalmente no presentan el gen RHD, la ausencia de este alelo explica por qué nunca se identificó el antígeno d. En individuos africanos RHD negativos es común encontrar la presencia de un gen RHD silente, que ha recibido la denominación de RHD ψ .

En el otro locus adyacente se encuentra el gen RHCE que codifica para los antígenos C, c, E y e. Los alelos de este gen son RHCE, RHcE, RhcE y Rhce. Tanto la actividad C/c como E/e reside en un solo producto polipeptídico. La gran homología entre los genes RHD y RHCE sugiere que ambos provienen de la duplicación de un gen ancestro común.

Los productos RHD y RHCE son proteínas de 416 aminoácidos que atraviesan la membrana eritrocitaria 12 veces y muestran solo cortos rizados exofaciales de aminoácidos en el exterior. Los polipéptidos son ácidos grasos acilados que no portan residuos de carbohidratos. Dentro de la membrana eritrocitaria los polipéptidos Rh forman complejos con glicoproteínas que tienen homología parcial con los polipéptidos Rh pero que están codificados en un locus del cromosoma 6. Existe una gran homología entre los productos de RHD y RHCE y entre los alelos del RHCE. Los antígenos C y c difieren entre sí

en sólo cuatro aminoácidos en las posiciones 16, 60, 68, y 103 de los cuales la diferencia entre prolina y serina en la posición 103 parece ser decisiva. Al parecer la presencia de prolina o alanina en la posición 226 distingue a E de e. El polipéptido D posee 36 aminoácidos, los que serían identificados como extraños por los individuos RhD negativos, de ahí la gran inmunogenicidad del antígeno D con respecto a los demás antígenos Rh.

Determinación del fenotipo Rh e inferencia del genotipo

En la práctica clínica se pueden utilizar los reactivos anti-D, -C, -c, -E, -e para los estudios de fenotipo Rh. En los estudios pretransfusionales de rutina es únicamente necesario la determinación del D. Los otros reactivos se utilizan cuando existen aloanticuerpos en el receptor contra alguno de estos antígenos o para estudios familiares de inferencia del genotipo. La distribución de los antígenos Rh en los eritrocitos constituye el fenotipo Rh. La determinación del antígeno Rh no siempre permite la deducción confiable del genotipo. La presunción del genotipo más probable descansa en el estudio de las frecuencias génicas realizadas en la población y deducidas a partir de los estudios fenotípicos. Las inferencias del genotipo son útiles en estudios de población y para predecir a partir del estudio de la pareja si el feto presenta el antígeno Rh heredado del padre para el cuál la madre presenta anticuerpos capaces de provocar EHFNR. Aun cuando en la actualidad todavía se continúa con la inferencia del genotipo por esta metodología el proceder más confiable es la determinación por técnicas de biología molecular del gen RHD y de los alelos del RHCE. Para los antígenos C, c, E y e, es posible determinar la zigocidad por las características de codominancia de estos, no así para el antígeno D donde solo puede tenerse evidencia de presencia y ausencia y no es posible inferir por el efecto de dosis los genotipos D/d y D/D. Estos últimos solo pueden estimarse a partir de las frecuencias génicas en la población, pero en ellos influye el origen racial del individuo. Por ejemplo, un individuo blanco con el fenotipo ccDee probablemente sea de genotipo cDe/ce sin embargo en un individuo de la raza negra es igualmente probable que sea cDe/cDe que cDe/ce.

- Expresión débil del antígeno D (D débil)

La gran mayoría de los individuos RhD positivos muestran aglutinación definida con el reactivo anti-D. En ocasiones los eritrocitos D positivos no reaccionan con los reactivos anti-D en las técnicas convencionales y la detección del antígeno D requiere una incubación prolongada con el anti-D o el empleo

del empleo de la técnica de antiglobulina (Coombs). Antiguamente estos eritrocitos eran considerados como Du, este término ya no es usado y en su lugar se emplea el de D débil, aunque estos eritrocitos son considerados D positivos. Los anticuerpos monoclonales anti-D pueden aglutinar directamente las muestras de eritrocitos considerados como D débiles con los reactivos anti-D policlonales. La frecuencia de D débil es mayor entre los negros que en los blancos.

El D débil es definido como un fenotipo que, desde el punto de vista cuantitativo, pero no cualitativo tiene una menor expresión del antígeno D y responden a varias circunstancias genéticas. Algunos genes RhD pueden codificar para una expresión debilitada del antígeno D. Este tipo es común entre los negros y tiene lugar como parte del haplotipo cDe. Otro de los fenómenos bien conocidos es el debilitamiento del antígeno D por la presencia del gen C en posición trans con respecto al D, o sea en el cromosoma opuesto. Los eritrocitos que muestran este efecto son generalmente de genotipo CDe/Ce.

Los análisis moleculares de los genes que codifican para el antígeno D débil muestran que estos poseen una secuencia normal, pero una reducción severa en la expresión del ARNm, sugiriendo la ocurrencia de un defecto a nivel de transcripción o procesamiento del pre-ARNm. Otros estudios sin embargo encontraron la presencia de mutaciones en los exones del gen RhD. Todas las sustituciones de aminoácidos encontradas se localizaron en las partes intracelulares ó transmembranosas de la proteína RhD. La mayoría de las sustituciones que se han reportado son no conservativas y los aminoácidos introducidos como la prolina en particular es probable que rompa la estructura secundaria y terciaria de la proteína. No obstante, existen evidencias de que las bases moleculares puede ser heterogéneas y algunos D débiles pueden portar alelos estructuralmente anormales.

- El D débil en el donante de sangre

La posibilidad de que los hematíes D débiles puedan estimular la producción de anticuerpos anti-D ha invalidado el uso de los eritrocitos de este fenotipo para la transfusión de los receptores RhD negativos. Al parecer esta posibilidad es remota ya que estas formas debilitadas del D son mucho menos inmunogénicas. También es probable que estos eritrocitos sean destruidos si se les transfunde a receptores que presenten anticuerpos anti-D. Las evidencias sobre la inmunogenicidad del D débil son limitadas. Muchos factores son necesarios evaluar para dilucidar la importancia clínica de este como son: el volumen de sangre transfundida, el número de inmunizaciones y la densidad

del antígeno D. El empleo de los reactivos anti-D monoclonales ha minimizado estos riesgos ya que actualmente muchos de estos fenotipos se clasifican como RhD positivos. No obstante, es importante la identificación correcta del fenotipo D débil en los donantes de sangre ya que existen algunas evidencias de inmunización de receptores RhD negativos transfundidos con eritrocitos D débil. Las políticas sobre este particular deben ser definidas en cada país teniendo en cuenta la composición étnica de su población, la frecuencia de este fenotipo y los reactivos de que dispone para la tipificación RhD.

- El D débil en los receptores de sangre

La gran mayoría de los pacientes con este fenotipo pueden recibir sangre RhD positiva sin riesgos de inmunización, a menos que carezcan de algún epítotope del antígeno D (D parcial). Las políticas actuales con respecto al D débil como receptor de sangre plantean que es innecesaria la detección de formas débiles del antígeno en los pacientes. Los centros que disponen de reactivos anti-D monoclonales clasifican a los pacientes D débiles como RhD positivos y los restantes no detectados reciben sangre RhD negativa. En algunos centros se considera esta política como un gasto inútil de sangre D negativa y prefieren realizar la detección del D en técnica de antiglobulina a todos los receptores D negativos y de ser positivos administrar sangre D positiva. Sin embargo, de seguirse esta alternativa es importante implementar procedimientos que prevengan de una determinación errónea en la técnica de antiglobulina del antígeno D en un paciente D negativo con prueba de antiglobulina directa positiva. Por otra parte, estas determinaciones pueden dar lugar a diferentes interpretaciones del estatus D de un paciente entre un centro y otro, que puede motivar a dudas y reclamos.

- D parcial

La producción de anti-D en un paciente D positivo se publicó por vez primera en 1953. Al antígeno D presente en estos individuos se le denominó "Variantes D" o "D parcial". Se postuló que los eritrocitos de estos individuos han perdido una parte del mosaico del antígeno D y el anticuerpo anti-D que producen es contra la parte del antígeno que no está presente en sus células. La clasificación inicial agrupó a las células carentes de una parte del antígeno D en 4 categorías usando la notación de Wiener se denominaban como: RhA, RhB, RhC y RhD ó Rh13, Rh14, Rh15 y Rh16, esta nomenclatura actualmente es obsoleta. Esta notación fue reemplazada por el sistema de categorías de Tippett y Sanger. Inicialmente solo era posible identificar estas categorías, cuando individuos D parciales producían anti-D en respuesta a exposiciones con sangre Rh D positiva.

Al identificarse anticuerpos anti-D en un individuo RhD positivo, sobre todo cuando son anticuerpos que reaccionan débilmente, es necesario corroborar que no estamos en presencia de anticuerpos anti-LW. Estos últimos reaccionan con mayor fortaleza con hematíes RhD+ que con RHD- y podría erróneamente clasificarse a un individuo como D parcial con anti-D. Los anti-LW se pueden diferenciar de los anti-D por el tratamiento de los hematíes con compuestos sulfidrilos como el ditiotreitolo, ya que estos destruyen los antígenos LW y no al antígeno D.

Los anticuerpos monoclonales anti-D humanos producidos en el transcurso de los últimos años han permitido la caracterización de los epitopes del antígeno D, por lo que las células con categorías del D presentan un patrón particular de reactividad con el panel de anticuerpos. Sobre la base de estos resultados se determinó inicialmente que el mosaico del antígeno D tiene 9 epitopes que definen a 6 categorías del D parcial; DII a DVII (DI es obsoleto). Los ensayos más recientes sugieren la presencia de 37 epitopes del antígeno D y al menos 12 categorías del D.

Muchos de estos fenotipos aparecen como resultado del entrecruzamiento entre los genes homólogos RhD y RhCE donde uno ó más exones del gen RhD son reemplazados por el o los exónes equivalente del RhCE. Tal conversión provoca la formación de un gen híbrido que codifica una cadena polipeptídica la cual ha perdido algunos de los epitopes codificados por el gen RhD, originando el fenotipo D parcial. El fenotipo D parcial puede presentarse además por mutación-delección del gen RhD que no se relacionan con el RhCE. Algunas de estas categorías de D parciales presentan antígenos Rh de baja incidencia Es muy probable que estos antígenos de baja incidencia sean neoantígenos formados por el entrecruzamiento de los genes RhD y RhCE presentes en los fenotipos D parciales.

El fenotipo D parcial siempre involucra una diferencia cualitativa en el antígeno D y en algunas ocasiones coincide con diferencias cuantitativas (D débil parcial) (17).

La producción de anti-D en individuos D positivos es rara excepto para algunas categorías del antígeno D como la DVI. La discriminación serológica de anomalías cualitativas y cuantitativas del antígeno D no se encuentra exenta de llegar a conclusiones erradas en las muestras que presentan gran reducción en la densidad del antígeno D.

- El antígeno G

El antígeno G está presente en todos los hematíes que son C+ y D+. Los anticuerpos anti-G, serológicamente se comportan como anti-C+D, pero no se pueden separar los anti-C de los anti-D. La presencia de este antígeno explica por qué los individuos RhD negativos que son inmunizados con hematíes C-,D+ pueden producir aparentemente anti-C. Se pueden encontrar raramente individuos C-, D-, G+ (rG) que en su mayoría son de origen africano.

- Otros antígenos del sistema Rh

Se ha asignado una numeración de 52 para los antígenos debido a que algunos números han sido declarados obsoletos, pero sólo se reconocen 46 antígenos Rh. Con excepción de los antígenos D, C, c, E y e, los restantes rara vez causan problemas transfusionales. Algunos de estos son variantes de los antígenos más comunes y están restringidos a determinados grupos raciales. Por ejemplo, se han identificado variantes del antígeno e, denominadas como hrs (Rh 19) y hrB (Rh 31), que se encuentran con mayor frecuencia entre los negros.

- Fenotipos delecionados

Existen individuos cuyos eritrocitos carecen de los antígenos CcEe y se denota como D- -. Este fenotipo carece también de todos los antígenos Rh de alta incidencia excepto del Rh29 y posee una fuerte expresión del antígeno D. Los individuos de este fenotipo pueden formar anticuerpos anti-Rh contra un determinante común a los polipéptidos CcEe. Otras variantes incluyen a los fenotipos DCw -y Dc- que también producen anti-Rh.

Con características similares al fenotipo D- -, se describe también el fenotipo D••. Este último posee una expresión menor del antígeno D y presenta el antígeno Rh 47. Lo distingue principalmente la presencia del antígeno de baja incidencia Evans (Rh 37).

Estos fenotipos son el resultado del reemplazo de exones en el gen RhCE por el RhD. Este entrecruzamiento selecciona los antígenos CcEe y aumenta el número de sitios D en los hematíes.

Síndrome Rh nulo y Rh modificado

El fenotipo Rh nulo se caracteriza por la ausencia de todos los antígenos del sistema Rh. Este fenotipo se atribuye a dos mecanismos genéticos. El Rh nulo más común es el tipo regulador, como resultado de la ausencia de un gen

regulador X1 r, que impide la expresión de los genes del Rh. Estas personas transmiten los genes Rh a su descendencia, y se consideran homocigóticas para un alelo del X1r, denominado X0r, que se segrega independientemente de los genes Rh. La otra variante de Rh nulo es el tipo amorfo que se produce por la presencia homocigótica de un gen amorfo, el r, que impide la expresión de los antígenos Rh. Este tipo de Rh nulo es poco frecuente.

Los individuos de fenotipo Rh nulo presentan anomalías de la membrana eritrocitaria, con anemia crónica compensada. Los hallazgos morfológicos y serológicos incluyen la estomatocitosis, esferocitosis, incremento de la fragilidad osmótica, alteración de los fosfolípidos de la membrana y del volumen celular, defectos en el transporte de cationes, actividad elevada de la ATPasa de Na⁺/K⁺, depresión de los antígenos de grupo sanguíneo S, s, U, ausencia de LW y de Fy5. Estos individuos pueden resultar inmunizados y producen anticuerpos anti-Rh total o anti-Rh 29, que reaccionan con todos los eritrocitos excepto con los Rh nulos.

El tipo amorfo es el resultado de cambios a nivel molecular en el gen RhCE y una deleción del RhD. El tipo regulador es producto de defectos moleculares en el gen RhAG que codifica a la glicoproteína Rh50.

El fenotipo Rh modificado presenta una supresión parcial de los antígenos Rh. Este se caracteriza por la presencia de un gen regulador XQ. Los eritrocitos de estos individuos tienen una expresión disminuida de los antígenos Rh y LW, pero estos pueden ser determinados con antisueros potentes o por técnicas de adsorción-elución. Los individuos de este fenotipo presentan anemia crónica e iguales defectos morfológicos en los hematíes que el fenotipo Rh nulo.

Anticuerpos del sistema Rh

La mayoría de los anticuerpos anti-Rh se producen por la inmunización con hematíes en las transfusiones o en los embarazos. Otros, sin embargo, como los anti-E, anti-Cw y los anticuerpos contra los antígenos de baja frecuencia pueden detectarse sin que se conozca el estímulo que los generó. El D es el más inmunogénico de los antígenos del Rh, seguido del c y el E. La mayoría de los anticuerpos anti-Rh son de la clase IgG y se detectan en la prueba de antiglobulina, en medio albuminoideo y en las técnicas que utilizan enzimas proteolíticas. Estos anticuerpos persisten en el suero por muchos años y aunque desaparezcan, un estímulo, posterior puede incrementar su producción en niveles superiores a los que le precedieron. La presencia de

anticuerpos contra cualquier antígeno Rh debe considerarse de importancia clínica tanto para la transfusión de sangre como en mujeres embarazadas por el riesgo de provocar EHRN. De esta forma los receptores de sangre con aloanticuerpos anti-Rh recibirán hematíes carentes del antígeno específico para los anticuerpos séricos. Los eritrocitos recubiertos con anticuerpos anti-Rh son destruidos por mecanismos extravasculares. Los anticuerpos anti-Rh no fijan complemento, aunque en su mayoría son de las subclases IgG1 e IgG3.

Algunos anticuerpos anti-Rh muestran efectos de dosis, esto es que provocan una aglutinación más fuerte o únicamente aglutinan los eritrocitos que presenta el antígeno específico de forma homocigótica. Este efecto puede observarse para cualquiera de los 5 antígenos principales del sistema (DCcEe), pero los ejemplos más notorios lo constituyen los anti-E y anti-c.

Otros anticuerpos aparecen siempre en concomitancia. De esta forma un individuo que carece de los antígenos c y E o sea de fenotipo D+C+c-E-e+ en los que se detecte anticuerpos anti-E, debe esperarse la presencia de anti-c, aunque no se demuestre este último con las técnicas disponibles y viceversa (anti-c sin anti-E). En estos casos es aconsejable compatibilizar ambos antígenos para la transfusión.

Los individuos de fenotipos relacionados aloinmunizados constituyen un problema si necesitan transfusiones de eritrocitos, ya que la única compatible será la de un individuo de igual fenotipo.

Los anticuerpos anti-D humanos obtenidos a partir de donantes inmunizados o de mujeres sensibilizadas son utilizados en la producción de la inmunoglobulina Rh para prevención de la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido.

Los autoanticuerpos anti-Rh se abordan en autoanticuerpos eritrocitarios y anemias hemolíticas autoinmunes.

Determinación del grupo sanguíneo RhD

El tipaje Rh de rutina incluye la determinación del antígeno D en los receptores y en los donantes. Debe también realizarse la determinación del D débil en los donantes de sangre supuestamente RhD negativos. La tipificación de los demás antígenos del Rh se realiza únicamente con propósitos justificados como es en búsqueda de sangre compatible para pacientes con aloanticuerpos anti-Rh. Los reactivos para la determinación del antígeno D

tradicionalmente se obtienen a partir donantes con anti-D, cuyo suero después de procesado es enriquecido con albúmina bovina polimerizada para que los anticuerpos sean capaces de aglutinar los hematíes suspendidos en salina o en plasma autólogo. Actualmente muchos centros utilizan anticuerpos monoclonales humanos anti-D, preferiblemente de la clase IgM, que aglutinan los hematíes en medio salino, son altamente específicos y no requieren del empleo de albúmina bovina. Estos anticuerpos provocan una aglutinación más fuerte que los policlonales IgG, pero pueden no aglutinar hematíes de fenotipo D débil. Para estos casos es necesario del uso de anticuerpos IgG que pueden ser policlonales o monoclonales.

Las técnicas para el tipaje RhD incluyen el uso de láminas, tubos o microplacas. El empleo de la lámina, aunque ampliamente extendido tiene como inconvenientes de que ésta pueda secarse en la incubación y dar la falsa impresión de una aglutinación. Los procedimientos en tubos y microplacas son más recomendados. La detección del D débil no puede realizarse en lámina, si no que requiere del empleo de la técnica de antiglobulina en tubos o microplacas.

La determinación de antígeno D en recién nacidos con enfermedad hemolítica por incompatibilidad de grupos sanguíneos requiere de un comentario especial. Los hematíes de los recién nacidos con enfermedad hemolítica están sensibilizados con anticuerpos, por lo que se prefiriere del empleo de reactivos anti-D que aglutinen los hematíes en salina. Los reactivos policlonales usualmente contienen potenciadores de la aglutinación, como la albúmina, que provocan la aglutinación de los hematíes recubiertos por anticuerpos y esto podría conllevar a un resultado falso positivo. En el caso de que los hematíes estén sensibilizados con anticuerpos anti-D, los reactivos anti-D salinos podrían no reaccionar con el antígeno D por estar el antígeno bloqueado por anticuerpos IgG. Para obtener un resultado adecuado se deben separar los anticuerpos de los hematíes del recién nacido por un método de elución como el del calor a 450C.

Función biológica de las proteínas Rh

Aunque la función de las proteínas Rh todavía es desconocida, se ha demostrado que la proteína Rh pertenece a la familia de los transportadores de amonio que se encuentran en las bacterias y plantas. Los animales superiores utilizan mecanismos más complejos y eliminan el amonio tóxico a través del ciclo de la urea, por lo que la presencia del Rh en los hematíes es inexplica-

ble. Una hipótesis es que ha perdido su función original y se ha mantenido a lo largo de la evolución por ser indispensable para la integridad estructural de la membrana eritrocitaria. La presencia en las bacterias de estructuras homólogas a la RhAG sugiere que la función de esta glicoproteína no está relacionada con los hematíes.

Sistema LW

El sistema LW recibe esta denominación en reconocimiento a sus descubridores, Landsteiner y Wiener. Hoy día se conoce que los anticuerpos estimulados por los hematíes Rhesus inicialmente atribuidos al descubrimiento del sistema Rh reconocen en realidad a los antígenos de la glicoproteína LW. La confusión inicial se debió a que los antígenos de este sistema están más expresados en los eritrocitos adultos RhD+ que en el RhD-. Sin embargo, los antígenos LW están igualmente expresados en los eritrocitos fetales y de los recién nacidos RhD+ y RhD-. Los antígenos LW son destruidos por compuestos sulfidrilos como el ditiotreitol y el bromuro de 2-aminoetilisotiouronio (AET) así como por la enzima pronasa.

Antes de establecerse como LW este sistema tubo varias clasificaciones. En la actualidad se acepta la presencia de dos antígenos el LWa y el LWb. El fenotipo LW(a-b+) es el más frecuente que comprende más del 99% de los individuos. El fenotipo LW(a+b+) tiene una frecuencia menor del 1% y el LW(a-b-) es muy poco frecuente. El gen que codifica los antígenos LW está en el cromosoma 19.

Los hematíes Rh nulo son también LW (a-b-). Es muy posible que la glicoproteína LW interactúe preferencialmente con el RhD que con el RhCcEe.

Anticuerpos del sistema LW

Los anticuerpos anti-Lwa no destruyen los eritrocitos incompatibles. Puede observarse una reducción transitoria de los antígenos LW, especialmente en embarazadas y producirse anticuerpos anti-LW pero que no poseen importancia clínica. Se ha descrito un anti-LWab potente en una embarazada de fenotipo RhD+LW(a-b-) detectándose también los anticuerpos en el recién nacido.

Función biológica de la glicoproteína LW

La glicoproteína LW pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se reconoce como la molécula de adhesión intercelular ICAM-4. Su ligando es la integrina LFA-1(CD11a/CD18). La función de esta glicoproteína en los hematíes no es conocida, aunque se especula su papel en la formación de los islotes eritroblásticos en la médula ósea y la de mediar interacciones entre los eritroblastos y los macrófagos durante la eritropoyesis. La expresión del LW es mayor en los hematíes falciformes que en los hematíes normales, lo que sugiere que este antígeno puede estar involucrado en la adherencia de los estos hematíes al endotelio y podría contribuir a las crisis vaso-oclusivas de la anemia drepanocítica.

Sistema de grupo sanguíneo MNS

El sistema MNS agrupa un total de 43 antígenos distribuidos en las glicoforinas, aunque los más importantes de este sistema son los antígenos M, N, S, s y U (Tabla 2).

Los antígenos M y N se localizan en la glicoforina A y los antígenos S, s y U se localizan en la glicoforina B. Existe una interacción genética que se manifiesta en un desequilibrio de lincaje entre las frecuencias de M, N y S, s, donde la frecuencia N con s es mayor que la de N con S. El fenotipo eritrocitario En (a-) carecen de la GPA y estos individuos pueden producir anticuerpos anti-Ena. Los hematíes de fenotipo S-s- son también negativos para el antígeno U de alta frecuencia y carecen de GPB. Las personas U negativas pueden producir anti-U al ser transfundidos. El fenotipo Mk Mk es el resultado de la ausencia de GPA y GPB en la membrana.

El sistema MNS agrupa a varios antígenos de baja incidencia que son el producto de sustituciones de aminoácidos en la glicoforinas o a híbridos de ambas proteínas.

Genética y Bioquímica

Los genes (GYPA y GYPB) que codifican a estos antígenos se encuentran muy próximos en el cromosoma 4 en 4q28-q31.

La GPA es la glicoforina más frecuentes en los hematíes con 1000,000 copias por células. Los grupos sanguíneos M y N residen en los segmentos extracelulares, una secuencia de 72 aminoácidos con cadenas laterales de carbohidratos

unidos en los primeros 50 residuos del amino terminal. La GPA está asociada a la banda 3 en la membrana, pero no se conoce el significado de este evento.

De la GPB hay presente aproximadamente 200.000 copias por hematíe y posee en el amino terminal un segmento de 26 aminoácidos que duplican la secuencia de GPA. Esto provoca la presencia de un antígeno N denominado "N" que se encuentra en todos eritrocitos normales. Este antígeno no es detectado por los reactivos anti-N convencionales, pero si por anticuerpos monoclonales muy potentes y por los anti-N (IgG) producidos por individuos de fenotipo M+N-S-s-. Existen evidencias serológicas e inmunoquímicas que sugieren la asociación entre la GPB y la glicoproteína RhAG (Ver Rh nulo). Los antígenos de baja incidencia Hil, Sta, Dantu y Mur están asociados a moléculas híbridas producto del entrecruzamiento entre los genes GYPA y GYPB.

Las enzimas proteolíticas como la papaína y la ficina desdoblan a las sialoglicoproteínas (SGP) de la membrana eritrocitaria en sitios definidos. El efecto de las diferentes enzimas sobre los antígenos de este sistema está en relación con el sitio en el cuál la enzima desdobla la SGP portadora del antígeno. Los antígenos M y N son destruidos por estas enzimas. El efecto sobre el antígeno S es variable y al parecer no afectan a los antígenos s y U. Esta propiedad de las enzimas es muy utilizada para la identificación de anticuerpos anti-M y anti-N en mezclas de anticuerpos de otras especificidades.

Biología Molecular

La GPA y GPB son codificados por dos genes homólogos, GYPA y GYPB, junto con un tercer gen el GYPE. Los genes GYPB y GYPE son el producto de la duplicación del GYPA por lo que tienen una organización muy similar. El gen GYPA está compuesto de 7 exones y el GYPB de 5. Los exones 2, 3 y 4 del GYPA y los 2 y 4 del GYPB codifican para los dominios extracelulares de la proteína. No se conoce el producto del gen GYPE en los hematíes. Los antígenos M y N son codificados por el exón 2 del GYPA. La secuencia de nucleótidos del exón 2 del GYPA y del GYPB son idénticos, de esta forma la GPB porta el antígeno "N". Los antígenos S y s son el resultado del polimorfismo de un nucleótido en el exón 4 del GYPB. Los antígenos de alta frecuencia Ena y U son debido a la ausencia de las respectivas glicoforinas.

Anticuerpos del sistema MNS

Los anticuerpos anti-M se detectan frecuentemente con eritrocitos suspendidos en salina y en individuos que no tienen historia previa de transfusiones o embarazos. Estos anticuerpos son generalmente de la clase IgM, aunque pueden ser también de la clase IgG. Los anticuerpos anti-M se consideran de importancia clínica si reaccionan in vitro a 37°C o en la prueba de antiglobulina (Coombs). En casos excepcionales pueden provocar enfermedad hemolítica del recién nacido.

Los anti-N son infrecuentes, casi siempre de la clase IgM y reacciona mejor a bajas temperaturas. Los de la clase IgG potentes se producen en individuos de fenotipo M+N-S-s-U-, ya que carecen de la glicoforina B que expresa el antígeno "N". En algunos pacientes con hemodiálisis que han usado membranas de diálisis esterilizadas con formaldehído, se puede demostrar la presencia de anti-N. Al parecer el formaldehído induce alteraciones en la inmunogenicidad de los antígenos N y "N".

Los anticuerpos anti-S, -s, -U son los de mayor importancia clínica. Todos son capaces de provocar reacciones transfusionales hemolítica y EHRN. Estos anticuerpos casi invariablemente se detectan en la prueba de antiglobulina. El anti-U es raro ya que muy pocas personas carecen del mismo. Mayormente este fenotipo se demuestra entre los negros.

Función Biológica

Aunque la función de las GPA y GPB no están totalmente esclarecidas, se ha demostrado que se comportan como receptores de varias lectinas y patógenos. Estas proteínas portan más del 60% de todos los carbohidratos de los hematíes entre los que se encuentran el ácido siálico. Este glúcido les confiere la carga negativa a las células y de esta forma evita el contacto entre los hematíes y entre estos y el endotelio de los vasos sanguíneos.

Sistemas de grupos sanguíneos Kell y XK

Como el Kell y XK están fenotípicamente asociados muchos investigadores consideraban al antígeno Kx codificado por XK como parte del sistema Kell. En estos momentos se han establecidos como dos sistemas de grupos sanguíneos.

El sistema de grupo sanguíneo Kell, es el segundo en inmunogenicidad tras el Rh, fue descrito por Coombs poco tiempo después (1946) a partir del hallazgo de un anti-Kell causante de EHRN. (10)

El sistema Kell está formado por dos antígenos principales: el Kell (K) y el Cellano (k), el primero fue descubierto en 1946 por Coombs, Mourant y Race cuando encontraron el anticuerpo respectivo en un caso de Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido. Tres años después Levine y colaboradores, encontraron el alelo respectivo, el cual fue denominado Cellano (k). (4)

En 1957 Allen y Lewis describieron los antígenos Kpa y Kpb que ampliaron el número de antígenos de este sistema. En 1958 se describió el Jsa y en 1963 el Jsb los cuales, junto con los anteriores, conforman los antígenos más conocidos de este sistema. Sin embargo, no son los únicos, ya que en este sistema se han descrito muchos otros llegando a alcanzar un número de 21 en la actualidad, varios de los cuales son pares de alta y baja incidencia (18).

Este sistema también presenta un fenotipo nulo, llamado Kellnull (K0), el cual fue descrito en 1957 por Chown y colaboradores. Además, existe el fenotipo McLeod, descrito en 1961 por Allen y colaboradores, en el cual los antígenos Kell se expresan muy débilmente y está relacionado con la Enfermedad Granulomatosa Crónica, en la cual la función bactericida de los granulocitos está alterada, ya que pueden fagocitar los microorganismos, pero no los pueden destruir (18).

El gen Kell se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, entre la posición 7q 32y. Este gen codifica una proteína glicosilada de 93 kilodaltons la cual tiene áreas específicas donde se expresan varios antígenos Kell, de una manera similar de como lo hacen los antígenos del sistema Rh (18). Esta es una proteína transmembrana de Tipo II, de un solo paso y con la terminal COOH extramembrana.

El sistema Kell está formado por dos antígenos principales: el Kell (K) y el Cellano (k), el primero fue descubierto en 1946 por Coombs, Mourant y Race cuando encontraron el anticuerpo respectivo en un caso de Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido. Tres años después Levine y colaboradores, encontraron el alelo respectivo, el cual fue denominado Cellano (k) (4).

En 1957 Allen y Lewis describieron los antígenos Kpa y Kpb que ampliaron el número de antígenos de este sistema. En 1958 se describió el Jsa y en 1963 el Jsb los cuales, junto con los anteriores, conforman los antígenos más conocidos de este sistema. Sin embargo, no son los únicos, ya que en este sistema se han descrito muchos otros llegando a alcanzar un número de 21 en la actualidad, varios de los cuales son pares de alta y baja incidencia (18).

Este sistema también presenta un fenotipo nulo, llamado Kellnull (K0), el cual fue descrito en 1957 por Chown y colaboradores. Además, existe el fenotipo McLeod, descrito en 1961 por Allen y colaboradores, en el cual los antígenos Kell se expresan muy débilmente y está relacionado con la Enfermedad Granulomatosa Crónica, en la cual la función bactericida de los granulocitos está alterada, ya que pueden fagocitar los microorganismos, pero no los pueden destruir (18).

El gen Kell se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, entre la posición 7q 32y. Este gen codifica una proteína glicosilada de 93 kilodaltons la cual tiene áreas específicas donde se expresan varios antígenos Kell, de una manera similar de como lo hacen los antígenos del sistema Rh (3,7). Esta es una proteína transmembrana de Tipo II, de un solo paso y con la terminal COOH extramembrana (18).

Los antígenos de este sistema son altamente inmunogénicos, lo que les confiere el tercer lugar en importancia clínica. Se encuentran en la superficie de glóbulos rojos humanos y están completamente desarrollados al nacimiento (11).

Cuando una persona de fenotipo K- es transfundido con una unidad de sangre K+ la probabilidad de desarrollar un anti-K puede ser mayor al 10% (19).

Anti-K (KEL1) puede causar graves reacciones transfusionales hemolíticas y la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (20).

Los antígenos más importantes de este sistema son: K, k, Kpa, Kpb, Kpc, Jsa y Jsb. Todos de importancia clínica (15).

Genes y antígenos del sistema Kell

El gen KEL se localiza en el cromosoma 7q32-q36, y se extiende a lo largo de una secuencia de 21.5 kb de DNA organizada en 19 exones codificantes. La producción de los diferentes antígenos está también ligada a genes pertenecientes al locus XK del cromosoma X (2).

El sistema Kell se compone de 35 antígenos; de ellos, seis conjuntos de antígenos poseen relaciones antitéticas. Entre los más importantes están el antígeno Kell (K+ o K1) y Cellano (k o K2), aunque otros anticuerpos del sistema Kell también son importantes en términos clínicos. Se localizan en la superficie de los glóbulos rojos humanos y están completamente desarrollados al nacimiento.

Los antígenos de este sistema son altamente inmunogénicos (20).

Anti-K (KEL1) puede causar graves reacciones transfusionales hemolíticas y la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido. La expresión de una glicoproteína (CD238) codificada por KEL es una metaloendopeptidasa que procesa la endotelina-3; se extiende por la membrana de los glóbulos rojos y tiene un dominio grande que está unido a través de un enlace disulfuro a la proteína Xk del sistema Kx. La ausencia de la proteína Xk resultante de mutaciones o deleción de XK, un gen ligado al cromosoma X, provoca la expresión debilitada del antígeno K+ y el síndrome de McLeod: una forma de neuroacantocitosis (20).

El antígeno K se detecta con una frecuencia del 9% en norteamericanos, un 2% en individuos de origen africano y, muy raramente, en los de origen asiático; por el contrario, el antígeno k es de alta frecuencia en todas las poblaciones (2).

Asociación entre el Kell y la proteína XK (Fenotipo McLeod)

Los eritrocitos que carecen de Kx tienen una expresión deprimida de los antígenos del sistema Kell, además muestran una permeabilidad disminuida al agua y morfología acantocítica. Estos hallazgos caracterizan al fenotipo McLeod, cuyos individuos poseen además una disfunción del sistema neuromuscular. En algunos casos este fenotipo se ha encontrado en pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica (EGC), en la que los granulocitos conservan la función fagocítica, pero son incapaces de provocar la muerte del patógeno ingerido. El fenotipo McLeod asociado con EGC parece ser la consecuencia de la deleción de una parte del cromosoma X que comprende el locus XK y X-EGC.

Genética y Bioquímica

Los genes del sistema Kell se encuentran en el cromosoma 7 en 7q33. Los antígenos antitéticos de este sistema son heredados como si fueran el producto de alelos de loci estrechamente vinculados o sea en haplotipos. No todas las combinaciones teóricamente posibles se han identificados, de esta forma Kpa y Jsa nunca se han demostrado en el mismo cromosoma al igual que la combinación K y Kpa. Los antígenos del sistema Kell se encuentran en una glicoproteína de 93 kDa que está unida por puentes disulfuros a la proteína XK. La proteína Kell es muy polimórfica y porta todos los antígenos del sistema.

Los antígenos del sistema Kell son destruidos por compuestos sulfidrilos como el ditiotreitól (DTT) y el bromuro de 2-aminoetilisotiuronio (AET). Este procedimiento es muy útil para identificar anticuerpos contra los antígenos Kell al poder contar con hematíes artificialmente carentes de los antígenos de este sistema. No obstante, hay que considerar que estos compuestos reducen también la reactividad de otros antígenos como los LW, Do, Yt y otros. Los antígenos Kell también son destruidos por ZZAP, una mezcla de DTT y papaína, que es utilizada para eliminar los anticuerpos unidos a los hematíes, principalmente en los pacientes con autoanticuerpos eritrocitarios. La susceptibilidad de los antígenos Kell a los compuestos sulfidrilos se debe a que provocan la ruptura de los puentes disulfuros con la proteína XK además de a las uniones disulfuro de los residuos de cisteína en la región extracelular que permiten el plegamiento de la proteína.

El gen XK codifica para una proteína de 50.9 kD que porta el antígeno Kx, este gen está ligado al cromosoma X, localizado en el brazo corto en Xp21 entre el gen de la Distrofía muscular de Duchenne y el gen de la Enfermedad Granulomatosa Crónica. La expresión de la proteína XK está incrementada en las células eritroides y en el tejido muscular, con una expresión menor en el corazón, cerebro y el páncreas.

Biología Molecular

El gen KEL comprende 21.5 kb en el cromosoma 7q33 y está organizado en 19 exones. Se conocen la mayoría de los eventos moleculares del polimorfismo del sistema. En todos los casos se debe a la sustitución de una base en los exones que codifican cada antígeno que resulta en la sustitución de un aminoácido.

El gen XK está organizado en 3 exones, el exón 1 en dirección del telómero y el exón 3 muy cercano al centrómero del cromosoma.

Anticuerpos del sistema Kell

El aloanticuerpo anti-K es el más común tras las especificidades pertenecientes a los sistemas ABO y Rh. Generalmente es de clase IgG1 y, ocasionalmente, fijador de Complemento. Los restantes aloanticuerpos son menos habituales, y la presencia de anticuerpos anti-k, anti-Kpb y anti-Jsb suele plantear problemas cuando se requieren hematíes carentes de estos antígenos para la transfusión, ya que se ha demostrado su capacidad para producir reacciones transfusionales y EHRN. (2)

Los aloanticuerpos Kell en el embarazo son conocidos por suprimir la eritropoyesis, que puede resultar en una enfermedad grave, a pesar de las concentraciones bajas de bilirrubina en el líquido amniótico y los títulos de anticuerpos bajos, se cree que la anemia de inicio tardío con reticulocitopenia es atribuible a la supresión continua de la eritropoyesis de aloanticuerpos residual en el lactante (20). Ya que el anti-K puede causar EHFN severa, es práctica habitual en algunos países el empleo de glóbulos rojos antígenos K negativo para transfundir a niñas y mujeres con posibilidades potenciales de procrear (12).

Aunque la mayoría de los anticuerpos anti-K son originados por embarazo o transfusiones, se han descrito unos pocos casos de aparente anti-K no inmune originados por antígenos eritrocitarios. En algunos casos los anticuerpos fueron encontrados en hombres sanos donantes de sangre y sin antecedentes transfusionales. En otros casos se adjudicó la sensibilización a infecciones microbianas (12).

El antígeno K es muy inmunogénico y es frecuente encontrar anti-K en los pacientes politransfundidos. La mayoría de los anti-K, se detectan en la prueba de antiglobulina indirecta y pueden fijar complemento. Pueden identificarse como anticuerpos que aglutinan eritrocitos en medio salinos en individuos sin antecedentes de transfusiones. El anti-k tiene características clínicas y serológicas similares al anti-K pero es infrecuente ya que muy pocos individuos son k negativos. Estos anticuerpos causan RTH y EHRN. Los anti-K pueden suprimir la eritropoyesis en los fetos afectados de EHRN por este anticuerpo.

Los anti-Kpa, Kpb, Jsa, Jsb son anticuerpos muy poco frecuentes con características serológicas similares a los anti-K y se consideran de importancia clínica.

El anti-Ku es un anticuerpo identificado en individuos transfundidos de fenotipo K0. Este anticuerpo reconoce un determinante antigénico común a todo el sistema Kell. Los pacientes de fenotipo McLeod pueden, al ser transfundidos, producir anti-Kx. Los eritrocitos K0, que poseen una elevada expresión de Kx, no pueden ser administrados a estos pacientes.

Función Biológica

Los antígenos Kell se han reconocido como endopeptidasas y muestran actividad enzimática. El Kell activa la endotelina-3 que es un potente vasoconstrictor además de actuar como agente mitogénico en numerosos procesos biológicos. Su papel en los hematíes no está completamente esclarecido.

Sistema de grupo sanguíneo Duffy

Este sistema se descubrió en 1950 al identificarse un anticuerpo que se le denominó anti-Fya en un paciente hemofílico politransfundido.

El sistema Duffy está constituido por 6 antígenos. Los antígenos de mayor importancia son el Fy^a y el Fy^b, los restantes son el Fy3, Fy4, Fy5 y el Fy6. La frecuencia de los fenotipos Fy^a y Fy^b difiere entre las diferentes poblaciones. El fenotipo Fy (a-b-) se encuentra en un 68% de los negros y se aproxima a un 100% en algunas áreas de África Occidental (Tabla 17). Se ha descrito una forma débil de Fyb denominada Fy^x, que solo puede ser detectada por los anti-Fy^b muy potentes. Se ha sugerido que el antígeno Fy5 es el resultado de la interacción de los productos de los genes Rh y Duffy ya que este antígeno está ausente en los eritrocitos Rh nulo.

Genética y Bioquímica

El gen FY se encuentra en el cromosoma 1, en 1q22-q23, y codifica a una glicoproteína de 35 a 43 kD que se expresa en otros tejidos además de en los hematíes como, en el cerebro, riñón, bazo, corazón y pulmón. Los antígenos Fy^a, Fy^b y Fy6 se localizan en la región amino terminal de la glicoproteína, mientras que el Fy3 está en el tercer lazo extracelular. Los antígenos Fy^a y Fy^b son codificados por un par de alelos codominantes designados como FY*A y FY*B. El antígeno Fy^x es consecuencia de la sustitución de un nucleótido en el gen FY*B. El fenotipo Duffy nulo o Fy(a-b-) que se encuentra entre los negros es causado por una mutación en la región promotora del FY*B que impide la transcripción a las células eritroides de los antígenos Fy. Este fenómeno está restringido a las células de este linaje ya que se ha demostrado una expresión normal de la glicoproteína Fy en los demás tejidos. De esta forma todos los individuos Fy(a-b-) tiene el gen FY*B con expresión del antígeno Fy^b en células no eritroides. Esto explica por qué al ser transfundidos solo producen anti-Fya. Para la transfusión de estos pacientes se requiere únicamente de hematíes Fy(a-).

Los antígenos Fy^a, Fy^b y Fy6 son destruidos con el tratamiento de los eritrocitos con proteasas (papaína y ficina).

Anticuerpos del sistema Duffy

Los anti-Fya son comunes y ocasionan RTH y EHRN. Los anti-Fyb son infrecuentes, reaccionan débilmente in vitro y pueden provocar reacciones hemolíticas. No se han documentados casos de EHRN por este anticuerpo. Ambos anticuerpos son de la clase IgG y se detectan en la prueba de aglutinación indirecta. El anticuerpo anti-Fy3 reconoce a un antígeno público que está ausente en los eritrocitos Fy(a-b-). A diferencia de los antígenos Fya y Fyb, el Fy³ no se afecta con el tratamiento de los hematíes con proteasas. Este anticuerpo es raro y solo se produce en individuos Fy(a-b-). Los anticuerpos contra los demás antígenos son muy infrecuentes. El anti-Fy6 es un anticuerpo monoclonal murino que reconoce a un antígeno de alta incidencia en la región de los antígenos Fy^a y Fy^b.

Función biológica

La glicoproteína Duffy se conoce también como Antígenos Duffy Receptores de Citocinas (DARC), el cual es reconocido como un receptor promiscuo para varias citocinas pro-inflamatorias. Las citocinas involucradas incluyen, entre otras, a la IL-8 y la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1). La función del DARC no es conocida, aunque se ha sugerido que actúa como receptor para la eliminación de los mediadores inflamatorios. No obstante, su función no es vital en los eritrocitos ya que en los individuos de fenotipo Duffy nulo no se manifiesta anomalía alguna. DARC está presente también en las células endoteliales y se especula su función como receptor para la endocitosis y posiblemente genera un gradiente quimiotáctico de atracción leucocitaria. Los antígenos Fy también se han identificado como receptor para el *Plasmodium vivax* lo que explica el predominio del fenotipo Fy nulo en Africa, que le confiere resistencia a la invasión por el parásito.

Sistema de grupo sanguíneo Kidd

Este sistema se describió en 1951, al identificarse un anticuerpo, que se le denominó anti-Jk^a, en el suero de una puérpara cuyo hijo tuvo una EHRN. Dos años más tarde se describió el anti-Jk^b en una paciente con una reacción postransfusional hemolítica. El sistema consta de tres antígenos, Jk^a, Jk^b y Jk³, el fenotipo Jk(a-b-) es extremadamente infrecuente excepto en algunas poblaciones de las Islas del Pacífico. La expresión de los antígenos depende del estado homocigótico o heterocigótico de los alelos del sistema.

Genética y Bioquímica

El sistema Kidd lo integran tres alelos, Jk^a , Jk^b y Jk^k . Los alelos Jk^a y Jk^b son codominantes y codifican para los antígenos Jk^a y Jk^b respectivamente. El alelo Jk^k es silente. El grupo sanguíneo Kidd ha sido asignado al cromosoma 18 en el locus del transportador de urea (HUT1) en la posición q12-q21. La glicoproteína Kidd o transportadora de urea está compuesta por 391 aminoácidos con 10 dominios de membrana. La expresión de los antígenos Jk^a y Jk^b es el resultado de la sustitución de un nucleótido en el lazo extracelular de la proteína. El antígeno Jk^3 está presente en los hematíes $Jk(a+)$ y/o $Jk(b+)$ pero no en los hematíes $Jk(a-b-)$. Los individuos que heredan los dos alelos recesivos, son de genotipo $JkJk$ y de fenotipo $Jk(a-b-)Jk:-3$. Se han encontrado hematíes $Jk(a-b-)$ que reacciona débilmente con anti- Jk^3 y pueden adsorber anticuerpos anti- Jk^a y anti- Jk^b , lo que ha sugerido la existencia de un gen supresor. Este gen ha sido confirmado por estudios familiares y se ha denominado In (Jk).

Los eritrocitos $Jk(a-b-)$ son resistentes a la lisis en una solución de urea 2M al contrario de los eritrocitos de los fenotipos Jk comunes. Los antígenos Kidd no se afectan con el tratamiento de los hematíes con AET o DTT. El tratamiento con proteasas aumenta la expresión de los mismos.

Anticuerpos del sistema Kidd

Los anti- Jk^a son más comunes que los anti- Jk^b y se identifican con frecuencia coexistiendo con aloanticuerpos de otros grupos sanguíneos. El anti- Jk^3 es producido por individuos $Jk(a-b-)$ y generalmente se detecta junto con los anti- Jk^a y anti- Jk^b . La mayoría de estos anticuerpos son de la clase IgG, aunque en raras ocasiones se han identificado de la clase IgM. Los anticuerpos anti- Jk se detectan en una gran variedad de técnicas como el LISS, las enzimas, el polibreno y el polietilenglicol. La identificación de estos anticuerpos es difícil y se han comunicado casos en que sólo son revelados por la actividad anti-complemento del suero antiglobulínico. En muchas ocasiones se requiere del empleo de hematíes que expresen los antígenos Kidd en doble dosis (homocigóticos) para una detección confiable de los mismos.

Los anticuerpos de este sistema pueden causar EHRN, pero generalmente es un cuadro clínico leve. Sin embargo, son en extremo importantes por estar involucrados en reacciones postransfusionales hemolíticas tardías al no detectarse en las pruebas de compatibilidad pretransfusionales.

Por muchos años se consideró que los anticuerpos IgG anti-Kidd activaban el complemento, actualmente se conoce que principalmente son los IgM y la fracción IgG₃, aunque contribuye no es el principal agente.

Función Biológica

La glicoproteína Kidd o transportadora de urea está presente también en las células endoteliales de los vasos rectos y en la red vascular de la médula renal. El transporte de urea en los hematíes tiene dos funciones principales: el transporte de urea al interior y exterior de la célula y prevenir que los hematíes transporten urea fuera del riñón. Los eritrocitos que carecen de los antígenos Kidd (Jka-b-) presentan una disfunción en el transporte de urea, que al parecer no se relaciona con enfermedad alguna.

Sistema de grupo sanguíneo Lutheran

El sistema Lutheran se describió en 1945, cuando fue identificado el anti-Lua en un suero que contenía varios anticuerpos. Este sistema lo componen 18 antígenos. El sistema del grupo sanguíneo Lutheran consta de 19 antígenos, codificados por el gen LU, el cual se encuentra en el cromosoma 19. De los 19 antígenos, 4 de ellos son antígenos antitéticos –Lu (a)/ Lu (b), Lu 6/ Lu 9, Lu 8/ Lu 14, y Au (a)/ Au (b), mas 11 antígenos de alta frecuencia. Los antígenos más conocidos son el Lu^a y el Lu^b siendo el fenotipo Lu(a-b-) en extremo infrecuente (Tabla 19). El número de sitios antigénicos Lub por eritrocito es de aproximadamente 600-1600 en los eritrocitos Lu(a+b+) y de 1400-3800 en los eritrocitos Lu(a-b+). Los antígenos Lu9 y Lu14 son de baja incidencia y muestran una aparente relación antitética con los antígenos de alta incidencia Lu6 y Lu8. Los antígenos restantes son de alta incidencia, que exceptuando a los Au^a y Au^b, no están presentes en los hematíes de fenotipo Lu(a-b-).

Genética y Bioquímica

La glicoproteína Lutheran es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas con dos dominios variables, tres constantes y 5 puentes disulfuros extracelulares. Los antígenos de este sistema se expresan en dos glicoproteínas integrales de la membrana de 85 y 78 kDa respectivamente. La estructura total de la proteína es similar al marcador de tumor humano MUC18 y la molécula de adhesión neural del pollo SCI. El gen LU contiene 15 exónes y está

localizado en el cromosoma 19. Los antígenos de este sistema son destruidos por la tripsina, la α La bases genéticas del fenotipo Lu(a-b-) comprenden: La presencia de un gen Lutheran amorfo heredado de ambos progenitores, la herencia dominante de un gen inhibidor In(Lu) que impide la expresión de los antígenos de este sistema y de otros como el P1 y los antígenos Indian y la presencia de un gen recesivo supresor localizado en el cromosoma X.

Anticuerpos del sistema Lutheran

Los anti-Lu^a y anti-Lu^b son infrecuentes, generalmente en respuesta a embarazos o transfusiones, pero pueden aparecer también en ausencia de estímulo previo. Los anti-Lu^a no se han asociado con RTH y tampoco se han comunicado casos de EHRN, probablemente porque este antígeno está poco expresado en los hematíes de los recién nacidos. Los anti-Lu^b disminuyen la supervivencia de los eritrocitos transfundidos, pero tampoco ocasionan EHRN.

Estos anticuerpos pueden reaccionar con eritrocitos resuspendidos en solución salina provocando una aglutinación en campo mixto. Con frecuencia de detectan también en la prueba de antiglobulina indirecta.

Función Biológica

El ligando de la glicoproteína Lutheran son las lamininas que componen las membranas. El nivel de unión de las lamininas se correlaciona con la expresión de la glicoproteína Lutheran en los hematíes. Los hematíes falciformes muestran una mayor expresión del Lutheran que los hematíes de individuos sanos, por lo que poseen una mayor capacidad de unión a lamininas. Es probable que esta glicoproteína intervenga en la adherencia de los hematíes al endotelio vascular y puede estar involucrada en las crisis vasooclusivas en la anemia drepanocítica.

Sistema de grupo sanguíneo Diego

El sistema Diego lo constituyen 18 antígenos que están localizados en el transportador de aniones (AE-1) o banda 3. Los antígenos más conocidos son el Di^a, Di^b, Wr^a y Wr^b cuyas frecuencias fenotípicas. Los antígenos Di^a y Di^b se utilizan como marcadores antropológicos ya que la presencia del antígeno el Dia está circunscrito a poblaciones mongoloides e indígenas de América. La expresión del antígeno Wrb depende de la presencia de GPA.

Genética y Bioquímica

El gen de este sistema se encuentra en el cromosoma 17. Los 18 alelos del Diego se asocian con sustituciones de aminoácidos dentro de la banda 3. Por ejemplo, el antígeno Dia está representado por la prolina (Pro) en la posición 854 y el antígeno Di^b por la leucina (Leu) en la posición 854 del séptimo lazo extracelular de la banda 3. Al parecer en la membrana de los hematíes la banda 3 y la glicoforina A (GPA) están asociadas, su interacción es más evidente en la expresión del antígeno Wr^b. Esta asociación al parecer es entre un dominio expandido de la GPA y 8 dominios de membrana de la banda 3. La expresión del antígeno Wra, por su parte está asociado con una mutación del gen que provoca la sustitución de un aminoácido en el cuarto lazo extracelular de la banda 3. Los antígenos restantes del sistema Diego están determinados por la sustitución de un aminoácido en la banda 3.

Anticuerpos del sistema Diego

Estos anticuerpos se detectan generalmente en la técnica de antiglobulina indirecta. El anti-Dia puede ocasionar EHRN y RTH. El anti-Di^b es infrecuente, pero de importancia clínica. El anti-Wra generalmente se identifica en individuos sin antecedentes de estímulo previo. En pocas ocasiones provoca EHRN y RTH.

Función Biológica

La banda 3 es una de las proteínas más abundantes en los hematíes, con cerca de 106 copias por células. Actúa como intercambiador de aniones y su función es crucial para el intercambio gaseoso O₂ /CO₂ entre los pulmones y los tejidos y como sitio de unión de las proteínas esqueléticas.

Sistema de grupo sanguíneo Cartwright (Yt)

Este sistema está constituido por dos antígenos, Yt^a y Yt^b. El polimorfismo del sistema Cartwright (Yt) está determinado por la sustitución de un aminoácido dentro de la acetilcolinesterasa eritrocitaria (AChE). Los fenotipos resultantes de las combinaciones de estos alelos codominantes son: Yt(a+b-): 91.9%, Yt(a+b+): 7.9% y Yt(a-b+): 0.2%. Los antígenos son codificados por un gen en el cromosoma 7.

Anticuerpos del sistema Yt

Los anticuerpos anti-Yt^a y anti-Yt^b no son de importancia clínica, aunque en algunos casos se ha observado una destrucción acelerada de eritrocitos Yt(a+) por anticuerpos anti- Yt^a.

Función Biológica

La acetilcolinesterasa se conoce por su función vital en la neurotransmisión. La función de ésta en los hematíes es desconocida pero la molécula muestra actividad enzimática.

Sistema de grupo sanguíneo Xg

El Xg_a es el único antígeno asignado al sistema Xg que muestra una herencia ligada al cromosoma X. De esta forma el antígeno es más frecuente en el sexo femenino que en el masculino siendo las frecuencias del antígeno de 88.7% y 66.5% respectivamente. El antígeno Xg_a es desnaturalizado por el tratamiento de los eritrocitos con proteasas.

Anticuerpos del sistema Xg

El anti-Xg^a es infrecuente y se detecta en la prueba de antiglobulina indirecta y no tiene importancia clínica.

Función Biológica

La glicoproteína Xg^a comparte un 48% de identidad con el CD99. El CD99 se considera importante en la diferenciación de las células hematopoyéticas y puede mediar la formación de rosetas de los linfocitos T con los eritrocitos de carnero.

Sistema de grupo sanguíneo Scianna

Lo constituyen tres antígenos, Sc1, Sc2 y Sc3. Los fenotipos se denotan como: Sc:1,-2 con una frecuencia del 99.7%, Sc:1,2 (0.3%) y Sc: -1,2, Sc: -1,-2 que son muy infrecuentes. El Sc3 está presente de los eritrocitos de los individuos Sc1 y/o Sc2. El gen que codifica estos antígenos se localiza en el cromosoma 1.

Anticuerpos del sistema Sc

Los anticuerpos Sc son infrecuentes y generalmente no tienen importancia clínica, únicamente se ha informado de la ocurrencia de EHRN leve causada por anti-Sc2.

Función Biológica

Los antígenos se localizan en una glicoproteína de 60-68 kDa pero se desconoce su función.

Sistema de grupo sanguíneo Dombrock

En un inicio se describieron los antígenos antitéticos Do^a y Do^b cuyos fenotipos y frecuencias son Do(a+b-): 12.2%, Do(a+b+): 49.5% y Do(a-b+): 33.3%. Posteriormente se asignaron a este sistema los antígenos de alta incidencia Gy^a, Hy y Jo^a. La condición Gy(a-) representa al fenotipo nulo. Se desconoce la localización de gen DO.

Anticuerpos del sistema Do

Los anti- Do^a y -Do^b son infrecuentes. El anti-Doa provoca RTH y EHRN leves. Los anti-Dob no se asocian con EHRN pero sí a RTH. Los anti- Gy^a, -Hy y -Jo^a pueden provocar el acortamiento de la supervivencia de los eritrocitos transfundidos y EHRN leves.

Función Biológica

Los antígenos Do se localizan en una glicoproteína de 46-58 kD^a cuya función es desconocida.

Sistema de grupo sanguíneo Colton

El antígeno Co^a es de alta incidencia y el Co^b de baja incidencia y el Co3 es el producto de los genes Co^a o Co^b. Las frecuencias fenotípicas de este sistema son: Co(a+b-): 89.3%, Co(a+b+): 10.4%, Co(a-b+): 0.3% y el Co(a-b-) que es infrecuente. Los antígenos son codificados por un gen que se localiza en el cromosoma 7.

Anticuerpos del sistema Co

El anti-Co^a y anti-Co3 son infrecuentes, pero provocan EHRN y RTH. El anti-Co^b causa RTH, pero no se han comunicado casos de EHRN.

Función Biológica

El sistema Colton o acuaporina-1(AQP-1) está compuesto por glicoproteínas responsables de los canales de agua en los hematíes. El polimorfismo de los antígenos Co^a/Co^b es producto de la sustitución de aminoácidos en el primer lazo extracelular. Además de en los hematíes, la AQP-1 se expresa en el riñón, en el plexo coroidal y varios epitelios y endotelios. La función de la AQP-1 es formar canales de agua en la membrana plasmática para incrementar el transporte osmótico de agua, como en la reabsorción de agua del filtrado glomerular en los túbulos proximales del riñón. La AQP-1 permite también la rehidratación rápida de los hematíes en el medio hipertónico de la

médula renal y junto con los transportadores de urea reduce la crenación de los hematíes aumentando la permeabilidad para la urea. La AQP-1 también se ha detectado en muchos otros órganos y tejidos como en los pulmones, donde contribuye al mantenimiento del balance de agua, en el cerebro regulando del fluido cerebro espinal y en los ojos permitiendo la secreción del humor acuoso.

Sistema de grupo sanguíneo Chido/Rogers

Los antígenos Ch y Rg son antígenos de alta incidencia presentes en el componente C4 del complemento. Los antígenos son adsorbidos sobre los eritrocitos a partir del plasma. Este sistema está compuesto por 8 antígenos y son codificados por dos genes ligados, C4A y CAB, localizados en el cromosoma 6.

Anticuerpos del sistema Ch/Rg

Estos anticuerpos no provocan RTH ni EHRN.

Función Biológica

La función de los mismos se relaciona con las atribuidas al fragmento C4 del complemento.

Sistema de grupo sanguíneo Gerbich

Lo componen 7 antígenos, los tres primero de alta incidencia y los restantes de baja incidencia. El antígeno Ge1 de alta incidencia se considera obsoleto ya que no han sido efectuadas las pruebas confirmatorias. Los antígenos de este sistema se encuentran en la glicoforina C y D. En la GPC se encuentran los antígenos Ge3 y Ge4, mientras que en la GPC están el Ge2 y An^a. El Dh^a y el Wb están en formas alteradas de GPC y el Lsa en una forma alterada de GPC y GPD. Los antígenos son el producto de un solo gen, GYPC, localizado en el cromosoma 2.

Anticuerpos del sistema Ge

Los anticuerpos anti-Ge son por lo general de la clase IgG, pero pueden tener un componente IgM. Su importancia clínica es variable ya que únicamente se han informado casos de EHRN por anticuerpos contra los antígenos de baja incidencia.

Función Biológica

La función de este sistema se relaciona con las de las glicoforinas que predominantemente les confieren la carga negativa a los hematíes y forman parte del glicocalix de estas células.

Sistema de grupo sanguíneo Cromer

Un total de 10 antígenos se han asignado a este sistema, siete de alta incidencia y tres de baja incidencia (Tabla 2). Los antígenos Tc^a y Tc^b son antitéticos al igual que los WES^a y WES^b. Los antígenos están localizados en el Factor acelerador de la desintegración o DAF(CD55) que es codificado por un gen localizado en el cromosoma 1.

Anticuerpos del sistema Cr

Los anticuerpos de este sistema son muy infrecuentes. Algunos ocasionan la disminución de la supervivencia de los eritrocitos transfundidos y no han sido implicados en casos de EHRN.

Función Biológica

Los antígenos Tc^a/Tc^b/ Tc^c y WES^a/WES^b se encuentran en el primer dominio y los antígenos Dra, Cra y UMC están en los dominios tercero y cuarto del DAF. El fenotipo Cromer nulo o fenotipo Inab tiene ausencia de los antígenos Cromer y carecen de DAF, pero los individuos con esta característica no presentan signos de enfermedad hematológica. El inhibidor de membrana de la lisis reactiva o CD59 es otra de las glicoproteínas reguladoras del complemento, pero no muestra actividad de grupo sanguíneo. La ausencia del CD59 y CD55 caracteriza a los pacientes con Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN).

Sistema de grupo sanguíneo Knops

Los antígenos de este sistema, Kn^a, McC^a, McC^b, Si^a y Yk^a, se localizan en el receptor del C3b/C4b o receptor del complemento 1(CR1). El CR1 (CD35) es codificado por un gen del cromosoma 1. Con excepción del McC^b, todos los demás antígenos son de alta incidencia.

Anticuerpos del sistema Kn

Los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de este sistema se comportan como de altos título y baja avidéz, o sea una reactividad débil en la fase de antiglobulina pero que muestran esta reacción hasta altas diluciones del suero. Estos anticuerpos no tienen importancia clínica.

Función Biológica

La función más importante del CR1 es la del transporte de inmunocomplejos vía C3b/C4b hasta el hígado y el bazo para su eliminación.

Sistema de grupo sanguíneo Indian

Este sistema lo constituyen dos antígenos antitéticos, el In^a y el In^b. Los fenotipos y frecuencias como resultado de su combinación son: In(a+b+): 1%, In(a-b+): >99% y el In(a+b-) que es infrecuente. Estos antígenos son destruidos por las proteasas y los compuestos sulfidrilos y se encuentran localizados en la molécula de adhesión CD44.

El antígeno de alta frecuencia Anton (AnWj) está también localizado en el CD44, por esta razón se menciona en este apartado, aunque no pertenece al sistema. El AnWj no se expresa en los hematíes de los recién nacidos.

Anticuerpos del sistema In

Estos anticuerpos se detectan preferentemente en la prueba de antiglobulina. Los anti-In^a, -In^b pueden destruir los hematíes incompatible transfundidos pero no se han comunicado casos de EHRN. Los anti-AnWj pueden causar RTH, pero no EHRN.

Función Biológica

Variadas funciones se le han atribuido al CD44 como: mediar la adhesión del leucocito al endotelio, a las células del estroma y a la matriz extracelular y participan en la activación de los linfocitos T Y B. Muchas de estas interacciones ocurren por la interacción del CD44 con el hialuronato presente en las superficies celulares. El antígeno AnWj es el receptor en las células epiteliales del *Hemophilus influenzae*, que es la causa principal de meningitis en los niños.

Sistemas de grupos sanguíneos Ok y RAPH

Estos sistemas presentan un único antígeno (tabla 2). El Ok^a es de alta incidencia que se encuentra en el CD147. La glicoproteína Ok pertenece a la superfamilia de las Igs con un dominio variable y uno contante. Del antígeno MER2 del sistema RAPH se desconoce su frecuencia y estructura bioquímica.

Anticuerpos del sistema Ok

El anti-Ok^a puede provocar RTH, pero no se han comunicado casos de EHRN

Función biológica

La función del CD147 es desconocida, al parecer es una glicoproteína asociada a la activación de los leucocitos.

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1ª Edición

Capítulo

III

Colecciones y Antígenos de Alta y Baja Incidencia



Colecciones de grupos sanguíneos. Generalidades

Se trata de una serie de colecciones de antígenos que comparten ciertas características genéticas, bioquímicas o serológicas, pero que no cumplen los criterios establecidos por la ISBT, para considerarlos un sistema de grupo sanguíneo. Las principales colecciones con sus respectivos antígenos vienen reflejadas en la tabla siguiente:

Tabla 5. Colecciones de grupos de sanguíneos

Colección			Antígeno		
Nº	Nombre	Símbolo	Nº	Símbolo	Incidencia %
205	Cost	Cost	205001	Cs ^a	95
			205002	Cs ^b	34
207	li	l	207002	i	*
			208001	Er ^a	>99
208	Er	ER	208002	Er ^b	<1
			208002	Er3	99
29		GLOB	209003	LKE	98
210			210001	Le ^c	1
			210002	Le ^d	6
212	Vel	VEL	212001	Vel	>99
			212002	ABTI	>99
213		MN CHO	213001	Hu	
			213002	M1	
			213003	Tm	
			213004	Can	
			213005	Sext	
			213006	Sj	

* Con test serológicos estándar, suele ser de baja incidencia

Nota. Extraído de (26).

Desde el punto de vista transfusional, de las colecciones de grupos sanguíneos tienen importancia:

Los anticuerpos anti-Era y anti-Erb son raros, los antígenos que detectan son de frecuencia alta y baja, respectivamente. No hay ninguna evidencia de que sean clínicamente significativos, pero dado que son anticuerpos sumamente raros, los datos clínicos disponibles son escasos. En casos necesarios, unidades de sangre serológicamente incompatibles pueden utilizarse con extraordinaria cautela. No se han implicado tanto el anti-Era como el anti-Erb en casos de EHRN.

El anti-Csa detecta un antígeno de frecuencia relativamente alta; en tanto que el anti-Csb lo hace frente al de una frecuencia relativamente baja.

Puede considerarse que carecen de importancia clínica, no han causado RHT ni casos de EHRN, y pueden ignorarse al seleccionar unidades de sangre para la transfusión.

El anticuerpo anti-LKE se enfrenta a un antígeno de alta frecuencia, ausente en hematíes Pk y p. Los anticuerpos anti-LKE, generalmente son activos a bajas temperaturas, y no hay ningún informe de una RHT.

Unidades de sangre serológicamente incompatibles pueden transfundirse.

Antígenos de baja frecuencia (serie 700 ISBT)

Se trata de una serie de antígenos independientes, no asignados a ningún sistema o una colección de antígenos en la clasificación de la ISBT, y que tienen una baja incidencia en la población, y generalmente se heredan de forma dominante. Los principales antígenos de baja frecuencia vienen reseñados en la siguiente tabla:

Tabla 6. Antígenos de baja frecuencia (Serie 700 ISBT)

Nº	Nombre	Símbolo
700002	Batty	By
700003	Christiansen	Chra
700005	Biles	Bi
700006	Box	Bx2
700017	Torkildsen	Toa
700018	Peters	Pta
700019	Reid	Rea
700021	Jensen	Jea
700028	Livesay	Lia
700039	Milne	
700040	Rasmussen	RASM
700044		JFV
700045	Katagiri	Kg
700047	Jones	JONES
700049		HJK
700050		HOFM
700052		SARA
700054		REIT

Nota. Extraído de (26).

Los anticuerpos contra estos antígenos de baja frecuencia pueden ser causantes tanto de cuadros de EHRN como de RHT, si bien con una escasísima incidencia, y su hallazgo suele ser casual; de tal manera que sólo se han descritos casos de EHRN causada por: anti-JFV, anti-Kg, anti-JONES, anti-HJK, y anti-REIT.

Antígenos de alta frecuencia (serie 901 ISBT)

Se trata de una serie de antígenos independientes, no asignados a ningún sistema o una colección de antígenos en la clasificación de la ISBT, y que tienen una alta incidencia en la población. Los anticuerpos frente a estos antígenos son excepcionales, pero cuando aparecen es muy complicado encontrar unidades de sangre compatibles, ya que surgen de aloinmunizaciones.

Los antígenos de alta incidencia más significativos desde el punto de vista transfusional son:

a. Antígeno Vel: los anticuerpos anti-Vel se detectan en fase de Coombs, pero pueden aparecer en fase salina. Surgen tras episodios inmunizantes, y se trata de una IgM que no suele causar EHRN, pero sí RHT aguda fijando el complemento.

b. Antígeno Lan: El anti-Lan, ha causado al menos un caso de RHT inmediata. Unidades de sangre Lan-, normalmente no se requieren para la transfusión, pero deben considerarse en casos en los que existan títulos altos de anticuerpo. No hay descrito ningún caso de anti-Lan en relación con EHRN.

c. Antígeno Ata: El anti-Ata ha sido involucrado en casos de RHT. Unidades de sangre At(a-) normalmente no se requieren para la transfusión, pero deben considerarse en casos en los que existan títulos altos de anticuerpo. Hay un caso descrito de anti-Ata que provocó una EHRN moderada.

d. Antígeno Jra: hay escasa evidencia de que el anti-Jra ha causado una RHT, y no hay ningún caso descrito de EHRN. Unidades de sangre Jr(a-) normalmente no se requieren para la transfusión, pero deben considerarse en casos en los que existan títulos altos de anticuerpo.

e. Antígeno Emm: solo se han descrito cinco casos de anti-Emm, y no hay ninguna evidencia de su importancia clínica.

f. Antígeno Sda: está presente en el 91%, pero en mujeres embarazadas puede disminuir su expresión e incluso desaparecer. Si bien ha sido involucrado en una ocasión como causa de RHT, se cree que en la práctica clínica no tiene interés transfusional.

g. Antígeno AnWj: el anticuerpo anti-AnWj ha causado severas RHT, y en caso de detectarse hay que seleccionar unidades que carezcan del antígeno.

h. Antígeno PEL: sólo dos casos de anti-PEL y dos anti-PEL-like se han descrito. Estudios “in vivo” sobre la supervivencia de los hematíes sugieren que los anti-PEL no causarían una RHT.

i. Antígeno ABTI: sólo se conocen tres casos de anti-ABTI, y no hay información suficiente sobre su importancia clínica.

j. Antígeno MAM: cuatro casos conocidos de anti-MAM eran anticuerpos IgG potentes. Anti-MAM no ha causado RHT, pero sí causado EHRN severa.

Tabla 7. Antígenos de alta frecuencia (serie 901 ISBT)

Nº	Nombre	Símbolo
901003	August	Ata
901008		Emm
901009	Anton	AnWj
901011	Sid	Sda
901014		PEL
901016		MAM

Nota. Extraído de (26).

Algunos de estos antígenos han sido comentados anteriormente tales como la colección Ii (Ver ABO), antígenos globósidos (Ver P) y otros antígenos de alta incidencia como el Anton (Ver Indian).

Cabe indicar que después de una centuria de su descubrimiento los antígenos de los grupos sanguíneos eritocitarios continúan siendo una de las principales causas de reacciones adversas a la transfusión y de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido. El estudio del polimorfismo de los antígenos de los grupos sanguíneos ha permitido comprender la estructura y función de estos cuyos resultados permitirán la aplicación de nuevas estrategias de tratamiento en el campo de la hematología y de la Medicina Transfusional.

Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. Pruebas de compatibilidad pretransfusional

Los requerimientos transfusionales de la mayoría de los pacientes, que necesitan de una transfusión sanguínea, se cumplen al administrar sangre de donantes de igual fenotipo ABO y RhD. Numerosos antígenos de grupos sanguíneos diferentes al A, B y RhD son ignorados en el acto transfusional, debido a que muy pocas personas poseen anticuerpos dirigidos contra alguno de ellos.

Del 0,5-1,5% de los pacientes presentan anticuerpos resultantes de la exposición a hematíes por las transfusiones o embarazos, estos anticuerpos eritrocitarios se pueden detectar e identificar por diferentes procedimientos, sin embargo, existen factores que afectan la reacción entre el anticuerpo y el antígeno, los factores pueden estar asociados al antígeno, al anticuerpo o a las condiciones de la reacción.

Los factores relacionados con el antígeno incluyen el número de sitios antigénicos, las interacciones génicas, la dosis, el sitio que ocupa el antígeno sobre la superficie eritrocitaria, la edad de las células y las condiciones de almacenaje de las mismas. Entre los factores relacionados con el anticuerpo se encuentran la capacidad para fijar el complemento, la influencia que sobre la reacción tienen el uso de suero o plasma, el fenómeno de rouleaux (pilas de monedas) y la contaminación bacteriana.

Las condiciones de la reacción incluyen el pH, la relación entre la concentración de antígeno y anticuerpo, la temperatura, el tiempo de incubación, la centrifugación, la fuerza iónica y por último el medio utilizado ya sea salino, albuminoideo, enzimático o antiglobulínico (Coombs).

Valdés et al. (21), en el trabajo investigativo relativo a los "Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios", exponen las siguientes consideraciones:

Reacción antígeno-anticuerpo en inmunohematología

La interacción antígeno-anticuerpo puede verse en diferentes contextos, uno de ellos es la reacción de aglutinación, que por lo general en lo que se basan las técnicas que se realizan en Inmunohematología.

Existen dos requisitos para que la reacción antígeno-anticuerpo se produzca, uno es la adecuada complementariedad entre los anticuerpos y los de-

terminantes antigénicos. El otro requisito es la complementariedad de carga; las cargas opuestas de antígenos y anticuerpos crean fuerzas de atracción, mientras que cargas iguales crean fuerzas de repulsión.

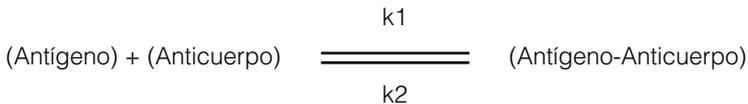
Una vez que se forma el complejo antígeno-anticuerpo las fuerzas que lo mantienen unidos no son interacciones covalentes, son interacciones interatómicas débiles que mantienen al antígeno y al anticuerpo en un contacto muy cercano, capaz de desarrollar fuerzas que estabilizan la unión del complejo como las interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas.

Los anticuerpos aglutinan a los eritrocitos en dos etapas, en la primera el anticuerpo se une físicamente al antígeno en los eritrocitos (sensibilización), en la segunda los eritrocitos, a los cuales los anticuerpos se unieron, aglutinan formando puentes entre ellos para crear una estructura de enrejado que constituye la aglutinación. En algunas reacciones antígeno-anticuerpo las dos etapas ocurren casi simultáneamente, mientras que en otras sólo ocurre la primera etapa de la reacción, es decir, hay sensibilización de los eritrocitos por anticuerpos no aglutinantes.

Para analizar la reacción de aglutinación es conveniente separarla en sus dos etapas, ya que, existen factores y variables que afectan a cada una.

1. Primera etapa de la reacción de aglutinación

La asociación y disociación del complejo antígeno-anticuerpo se rige por la ley de acción de masas, esta es una reacción reversible:



De donde (Antígeno), (Anticuerpo) y (Antígeno-Anticuerpo) son las concentraciones del antígeno, anticuerpo y complejo antígeno-anticuerpo respectivamente, k_1 es la constante de asociación y k_2 la de disociación. De acuerdo a la ley de acción de masas:

$$\frac{(\text{Antígeno} - \text{Anticuerpo})}{(\text{Antígeno}) + (\text{Anticuerpo})} = \frac{k_1}{k_2} = K$$

K es la constante de equilibrio o afinidad de la reacción y refleja la fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo, mientras mayor sea K la velocidad de asociación de la reacción será mayor, es decir, serán mayores las cantidades que se formarán del complejo antígeno-anticuerpo y la velocidad de disociación será más lenta.

La constante de equilibrio K en la reacción de aglutinación se afecta por las concentraciones de antígeno y anticuerpo, y por condiciones físicas de las técnicas tales como pH, temperatura, fuerza iónica y tiempo de incubación. La alteración de estas últimas condiciones puede producir aumento o disminución de la sensibilidad en la aglutinación.

a. Concentración de antígeno y anticuerpo. La velocidad de formación del complejo antígeno-anticuerpo varía con el número de moléculas de anticuerpo presentes en el medio y con el número de sitios antigénicos presentes en cada célula. El aumentar la cantidad de anticuerpos en el medio puede aumentar la sensibilidad de la prueba, así mismo, al aumentar la proporción suero/eritrocitos se proveen más anticuerpos por zonas antigénicas.

b. PH. El pH óptimo para los anticuerpos de la mayoría de los sistemas de grupos sanguíneos aún no ha sido determinado. Anticuerpos como los anti-M reaccionan mejor a pH bajo, y para los anti-D se reporta el pH óptimo entre 6,5 y 7,0. En la práctica las técnicas de rutina deben trabajarse a un pH alrededor de 7,0. Temperatura

La mayoría de los anticuerpos de grupos sanguíneos reaccionan en un rango restringido de temperatura. Por ejemplo, los anti-P reaccionan óptimamente a 18°C y los anti-Fy^a a 37°C. Los anticuerpos de la clase IgM son más reactivos a bajas temperaturas (4-27°C), mientras que los de la clase IgG lo son a 37°C, por este motivo las técnicas de detección de anticuerpos abarcan rangos de temperaturas de 22-37°C o 30-37°C. Aquellos anticuerpos que reaccionan in vitro a temperaturas por debajo de 37°C, no se consideran clínicamente significativos y rara vez destruyen eritrocitos transfundidos; algunos anticuerpos de la clase IgM pueden activar el complemento a temperaturas por debajo de 30°C, pero sólo acortan de forma mínima la supervivencia de eritrocitos incompatibles transfundidos; los anticuerpos clínicamente significativos son aquellos que tienen actividad in vitro a 37°C.

c. Fuerza iónica. En una solución salina normal los iones Na⁺ y Cl⁻ se agrupan alrededor de las moléculas de antígeno y anticuerpo, y neutra-

lizan parcialmente sus cargas opuestas. Este recubrimiento dificulta la unión del anticuerpo con el antígeno y se reduce al disminuir la fuerza iónica del medio donde tiene lugar la reacción, por lo general cuando la concentración salina del medio de reacción disminuye, la velocidad de captación del anticuerpo aumenta.

d. Tiempos de incubación. Los anticuerpos de los diversos grupos sanguíneos tienen diferentes tiempos para alcanzar el equilibrio, en esto interviene de manera significativa la clase de inmunoglobulina y la forma en que se une a su antígeno específico.

Los estudios con eritrocitos suspendidos en suero o solución salina han demostrado que del 100% de anticuerpos RhD que se fijan, aproximadamente el 25% lo hace en los primeros 15 minutos y el 75% restante los hace durante la primera hora. La adición de varios agentes potenciadores, por ejemplo, disminución de la fuerza iónica, puede aumentar la cantidad de anticuerpos fijados durante los primeros 15 minutos y con esto disminuir el tiempo de incubación necesario para alcanzar el equilibrio.

2. Segunda etapa de la reacción de aglutinación

Una vez que la reacción antígeno-anticuerpo ha ocurrido la aglutinación puede o no producirse, algunos factores facilitan la aglutinación otros la impiden, estos son: característica del anticuerpo, localización y número de sitios antigénicos, fuerzas que mantienen la distancia entre los eritrocitos, uso de albúmina sérica bovina, uso de enzimas, efecto de dosis y efecto de moléculas con carga positivas.

a. Características del anticuerpo. Dos de las características de los anticuerpos que deben considerarse son el tamaño y el número de sitios de combinación con el antígeno, ya que entre los anticuerpos de las clases IgG e IgM existen considerables diferencias físicas.

Los anticuerpos IgM pueden establecer puentes entre los eritrocitos y aglutinarlos aún suspendidos en solución salina, lo contrario ocurre con los anticuerpos IgG. Esto es posible porque las moléculas de IgM son circulares y poseen 10 sitios de combinación con el antígeno, separados a una distancia de 300 anstroms (Å); la distancia que separa a dos células normales son 184 Å y estos anticuerpos para provocar la aglutinación de las mismas puede combinar 2 ó 3 de sus sitios con una y el resto de los sitios con otra.

Las moléculas de IgG, a diferencia de las IgM, poseen sólo 2 sitios de combinación con el antígeno y estos están separados a una distancia de 140 Å, por tanto, para aglutinar dos células sólo dispone de un sitio de combinación para cada una, estos a su vez se encuentran más cercanos uno del otro que los sitios de la IgM.

b. Localización y número de sitios antigénicos. Los reactivos hemoclasificadores anti-A y anti-B de tipo IgG regularmente aglutinan eritrocitos de estos fenotipos suspendidos en salina, una posible explicación para este fenómeno es la localización y número de los antígenos del sistema de grupos sanguíneos ABO. Existe gran cantidad de sitios antigénicos A y B en los eritrocitos, comparado con el número de sitios de otros antígenos, además los antígenos A y B están localizados en los glicolípidos y zonas sobresalientes de la superficie de la membrana. Otros antígenos como el RhD son proteínas localizadas en la propia membrana eritrocitaria.

c. Fuerzas que mantienen la distancia entre los eritrocitos. Como se analizó anteriormente los eritrocitos sensibilizados con anticuerpos de la clase IgM pueden crear la estructura de enrejado en la segunda etapa de la reacción de aglutinación, porque los anticuerpos de esta clase son capaces de cubrir la distancia, que separa a los eritrocitos entre sí por la repulsión de cargas iguales.

De forma contraria los anticuerpos de la clase IgG son generalmente sensibilizantes, pero no aglutinantes, el ser moléculas de pequeño tamaño y con 2 sitios de combinación con el antígeno, les imposibilita vencer la distancia que existe entre los eritrocitos y aglutinarlos. Los eritrocitos tienen una carga neta negativa en su superficie, su interacción con los iones del medio en que están suspendidos altera esa carga y producen una carga neta denominada potencial zeta, de ahí que la distancia que separa a los eritrocitos es proporcional al potencial zeta y la disminución del mismo hace que los eritrocitos se aproximen y puedan ser aglutinados por anticuerpos de este isotipo.

d. Empleo de la albúmina sérica bovina. Los anticuerpos que no aglutinan eritrocitos suspendidos en salina, en ocasiones, los aglutinan cuando están suspendidos en albúmina bovina. Esto es posible porque la albúmina provoca un incremento en la constante dieléctrica del medio en el que están suspendidos los eritrocitos y una disminución de la potencial zeta. La constante dieléctrica de un medio es una medida de su habilidad para disipar cargas.

No todos los anticuerpos de los grupos sanguíneos aumentan su actividad en las pruebas de albúmina, los anti-A, anti-B y anti-Lewis muestran reducción de su actividad en presencia de albúmina, esta influye en el grado de hidratación de la membrana lo cual puede alterar la orientación estérica del determinante antigénico o puede disminuir la entropía disponible para dirigir la reacción.

e. Empleo de enzimas. Enzimas proteasas como la bromelina, tripsina, papaína y ficina se utilizan en las pruebas serológicas porque reducen la carga de la superficie de los eritrocitos al hidrolizar las sialoglicoproteínas de la superficie celular. La neuraminidasa también reduce la carga de la superficie celular porque escinde moléculas de ácido siálico de las cadenas de polisacáridos.

Como se informó anteriormente, cualquier mecanismo que elimine las cargas negativas de los eritrocitos reducirá la distancia que los separa al disminuir la potencial zeta y así facilitar su aglutinación por parte de anticuerpos de la clase IgG, se conoce que este proceder puede disminuir la distancia entre células de 184 Å a 113 Å en eritrocitos tratados con papaína y a 111 Å cuando son tratados con neuraminidasa. El tratamiento enzimático de eritrocitos también incrementa la accesibilidad de algunos antígenos cuando las glicoproteínas de las membranas son eliminadas.

Los eritrocitos pretratados con neuraminidasa aumentan su aglutinación por los anticuerpos IgG, pero este aumento no es comparable al producido por otras enzimas.

Además de estas acciones las enzimas proteolíticas destruyen antígenos de los grupos sanguíneos como el M, N, Fya, Fyb y Xga. Esta propiedad de las enzimas proteolíticas es de gran utilidad en la identificación de anticuerpos eritrocitarios.

f. Efecto de dosis. El efecto de dosis de algunos antígenos puede afectar la fuerza de la reacción antígeno-anticuerpo. Algunos anticuerpos muestran diferencias en la fuerza de sus reacciones, en dependencia de la cantidad de antígeno presente en las células, a veces estas cantidades son proporcionales al genotipo del individuo, por ejemplo, los eritrocitos M+ de un individuo de genotipo MM contienen más antígeno M que los eritrocitos M+ de un individuo de genotipo MN.

g. Efecto de moléculas con carga positiva. El Polibreno® es un polímero de carga positiva, provoca agregación espontánea de eritrocitos normales al neutralizar su carga superficial negativa. Las células carentes

de ácido sialico, por ejemplo, las células poliaaglutinables T o Tn y las tratadas con proteasa, no se agregan en presencia de Polibreno®.

Detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios

El pesquisaje de anticuerpos eritrocitarios tiene como objetivo detectar y luego identificar anticuerpos clínicamente significativos, que puedan causar reacción transfusional y acortamiento de la supervivencia normal de los eritrocitos, de modo que deben emplearse métodos *in vitro* apropiados.

De manera usual se emplean múltiples técnicas para la detección de anticuerpos eritrocitarios, entre ellas: el tratamiento enzimático de los eritrocitos con proteasas. Asimismo, dos de las técnicas que se deben emplear como rutina en la evaluación de anticuerpos eritrocitarios son: el método del polibreno y el de LISS (del inglés *low ionic strength solution*, solución de baja fuerza iónica). Por otro lado, la prueba de antiglobulina indirecta (PAI) proceder altamente favorecido ya que es útil para detectar e identificar anticuerpos y también se utiliza para tipificar la sangre y en las pruebas de compatibilidad. Sin embargo, se considera la prueba de antiglobulina o Coombs como la técnica por excelencia para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios.

1. Prueba de antiglobulina o Coombs

La prueba de antiglobulina comenzó a utilizarse después de que Coombs, Mourant y Race la describieron en 1945. En un inicio se utilizó para detectar anticuerpos en el suero, pero posteriormente se demostró su utilidad para detectar anticuerpos fijados a los eritrocitos *in vivo*. De esta forma la prueba de antiglobulina directa se utiliza para demostrar anticuerpos sensibilizando a los hematíes *in vivo* y la prueba indirecta para detectar anticuerpos libres en el suero. Por tanto, la PAI es un proceder altamente favorecido por la mayoría de los investigadores que se desempeñan en esta especialidad y no sólo es útil para detectar e identificar anticuerpos, sino que también se utiliza para tipificar la sangre y en las pruebas de compatibilidad.

En la prueba directa (PAD o CD), los eritrocitos recién obtenidos del paciente se lavan y ponen en contacto con un reactivo antiglobulina y/o anticomplemento con el fin de observar si existió una reacción reciente en el individuo en estudio. Es importante recalcar que la prueba debe realizarse lo más pronto posible para evitar la destrucción de los eritrocitos por la reacción y activación del complemento.

En la prueba indirecta (PAI o CI) de antiglobulina, los eritrocitos se incuban con suero para facilitar la fijación del anticuerpo y en algunos casos del complemento durante un tiempo y temperatura adecuados para el anticuerpo que se desea detectar. Acto seguido, se lavan y estudian con un reactivo antiglobulina y/o anticomplemento, con posterior control de la prueba con eritrocitos sensibilizados. (22)

1.1 Fundamento

La prueba de antiglobulina emplea anticuerpos contra las globulinas humanas denominado reactivo antiglobulínico poliespecífico que contiene, al menos anti-IgG y anticuerpos contra el fragmento C3 del complemento. Este proceder se rige por ciertos principios.

1.2. Principios

- a. Todas las moléculas de anticuerpos son globulinas.
- b. Al inyectar un animal con globulinas humanas este genera anticuerpos contra la proteína extraña o antiglobulina humana (AGH) posteriormente el suero animal es adsorbido para eliminar los heteroanticuerpos contra los hematíes humanos para garantizar que reaccione únicamente con las globulinas humanas. Las particularidades del control de este reactivo se exponen en el acápite de Reactivos en Inmunohematología.
- c. Los dos sitios Fab de la molécula de AGH se unen a las porciones Fc de dos anticuerpos que se encuentran sensibilando a dos eritrocitos adyacentes, esta unión forma un puente entre los eritrocitos y la aglutinación se hace visible.
- d. La AGH reacciona con globulinas humanas unidas a eritrocitos o libres en el suero, estas últimas se unen con preferencia a la AGH, la neutralizan y ocasionan un resultado falsamente negativo, por ello los eritrocitos deben lavarse previo a la adición del reactivo antiglobulínico.

1.3. Prueba de antiglobulina directa (PAD)

Esta prueba se utiliza para demostrar la presencia de IgG y/o C3 en los hematíes. Para su realización se utiliza una suspensión de hematíes lavados, que son mezclados directamente con el suero antiglobulínico. Dentro de las

aplicaciones más importantes de esta prueba se encuentran: La investigación de las reacciones transfusionales hemolíticas; la detección de anticuerpos en los hematíes de los recién nacidos en los que se sospecha enfermedad hemolítica por incompatibilidad de grupos sanguíneos; en la investigación de autoanticuerpos en las anemias hemolíticas autoinmunes y la detección de anticuerpos contra fármacos que pueden destruir a los hematíes del paciente.

1.4. Prueba de antiglobulina indirecta (PAI)

Esta técnica se realiza en dos pasos y es la más recomendada para la detección de anticuerpos que no producen aglutinación directa de los hematíes. En la primera fase se mezclan los hematíes con el suero a investigar y se incuban a 37°C de 30-45 minutos. Posteriormente se lavan los hematíes tres veces con solución salina y se le añade el suero antiglobulínico para revelar la reacción. Esta prueba se utiliza para: la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios en el suero del paciente; el tipaje de grupos sanguíneos con reactivos que requieren de esta técnica para revelar la reacción y en las pruebas de compatibilidad pretransfusional.

1.5. Sensibilidad de la técnica de antiglobulina

Aunque este proceder se considera de gran sensibilidad un resultado negativo no excluye la presencia de anticuerpos. Se ha estimado que esta técnica detecta de 100 a 500 moléculas de IgG o C3 por eritrocito, un número menor de moléculas por hematíes puede dar un resultado negativo. Por otra parte, el componente anti-IgA es generalmente deficiente en el reactivo poliespecífico y anticuerpos de este isotipo, aunque no son frecuentes, no se detectan con facilidad. A su vez el suero AGH muestra en ocasiones mayor actividad contra algunas subclases de IgG y por lo tanto los anticuerpos de determinadas subclases pueden no ser detectados. Otros procedimientos como la técnica manual de polibreno y la de polietilenglicol-antiglobulina permiten la detección de anticuerpos no reactivos en la técnica de Coombs.

1.6. Control de la calidad de la técnica de antiglobulina

Para confirmar los resultados negativos, tanto en la PAD como en la PAI, se debe añadir a cada tubo que en los que se observó un resultado negativo las células controles de Coombs. Estas células se preparan sensibilizando

hematíes con anticuerpos anti-Rh, preferiblemente anti-D, que muestre una reacción de aglutinación en antiglobulina de dos cruces de aglutinación (2+). Después de añadido este control deberá observarse un resultado positivo, de no ser así es necesario repetir el proceder y controlar la calidad del reactivo previo a su uso. El uso de estas células alerta sobre lavados insuficientes de las células o el deterioro del reactivo AGH.

a. Falsos negativos de la Prueba de antiglobulina

Lavados insuficientes de los hematíes. Demoras en la realización del proceder. Olvidar adicionar el reactivo antiglobulínico, centrifugación inadecuada y deterioro del reactivo entre otras.

b. Falsos positivos de la prueba de antiglobulina

Utilizar hematíes del paciente para la realización de la PAD almacenados en anticoagulantes diferentes al EDTA, ACD o CPD y que hayan sido almacenados a 40C, ya que puede unirse complemento a los eritrocitos y resultar en una PAD positiva. La contaminación bacteriana del reactivo, la centrifugación a altas velocidades y uso de material no apropiadamente lavado.

2. Empleo de otros procedimientos

Generalmente se utilizan diferentes técnicas para la detección de anticuerpos eritrocitarios, una de ellas es el tratamiento enzimático de los eritrocitos con proteasas. Esta técnica es mucho más sensible que otras, especialmente en la detección de anticuerpos Rh y otros anticuerpos que sólo reaccionan con eritrocitos pretratados.

2.1. Enzimas proteolíticas

A pesar de las ventajas que brindan las enzimas proteolíticas, es importante alertar con relación a su uso como rutina en la detección de anticuerpos eritrocitarios. Los eritrocitos pretratados con enzimas pueden detectar anticuerpos fríos y otros anticuerpos que no son de importancia clínica. En la actualidad esta técnica se utiliza para la identificación de mezclas de anticuerpos de varias especificidades y se sospeche que alguno de ellos reconoce a antígenos que son destruidos por proteasas.

2.2. Solución de baja fuerza ionica: Polibreno y Polietilenglicol

Dentro de las técnicas que deben emplearse como rutina en la evaluación de anticuerpos eritrocitarios se encuentran, la técnica manual de polibreno, el empleo de la solución de baja fuerza iónica, comúnmente conocido como LISS (del inglés Low Ionic Strength Solution) en la fase de incubación previa a la realización de la técnica de antiglobulina y la técnica de polietilenglicol antiglobulina. Estas técnicas pueden revelar la presencia de anticuerpos de importancia clínica no detectados por la técnica de antiglobulina tradicional.

Es necesario comentar que la técnica del LISS sólo debe realizarse a 37°C, ya que a temperatura ambiente se pueden detectar anticuerpos que no tienen repercusión clínica.

Al contrario, el método del polibreno se realiza a temperatura ambiente y tiene como ventaja el de detectar predominantemente anticuerpos que son activos a 37°C por otros métodos.

2.3. Aglutinación en gel

A finales de la década del 80 se desarrolló un nuevo método para el tipaje de grupos sanguíneos y para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. La prueba de aglutinación en gel es un método de serología transfusional, donde la reacción entre anticuerpos y antígenos ocurre en el gel Sephadex contenido en los microtubos de una tarjeta plástica, la centrifugación se realiza en una centrífuga no convencional y el gel empleado puede ser neutro, contener reactivo AGH para la PAI o reactivos hemoclasificadores de grupos sanguíneos para tipificar la sangre.

La prueba de aglutinación en gel es negativa si después de la centrifugación los eritrocitos van al fondo del microtubo al pasar fácilmente a través del gel; los eritrocitos aglutinados quedan atrapados en el gel formando diferentes patrones de aglutinación. Esta técnica es fácil, sensible y reproducible, entre sus ventajas están el uso de eritrocitos no lavados para la ejecución de la prueba de antiglobulina, requiere de pocas cantidades de reactivos, después que la reacción ocurre en el gel esta puede mantenerse sin cambios hasta pasadas las 24 horas y los resultados en los microtubos pueden ser fotocopiados.

La detección in vitro de la reacción antígeno-anticuerpo en todas las técnicas que se han comentado hasta aquí se evidencia por aglutinación, sin embargo, existen otras formas de detectar esta reacción, por ejemplo, las

pruebas de inhibición de la aglutinación, en ellas se detecta la presencia del antígeno o del anticuerpo cuando la aglutinación previamente observada de un elemento queda inhibida. Otros medios de detección son sencillos como la hemólisis, otros como el radioinmunoanálisis son más peligrosos, costosos y complejos.

2.4. Hemólisis

La hemólisis es la ruptura de los eritrocitos con la consiguiente liberación de la hemoglobina intracelular, cuando es mediada por anticuerpos requiere el concurso del complemento y no se produce si el plasma contiene un agente quelante del calcio o magnesio. Si la hemólisis se produce el sobrenadante se torna color rosa tras la incubación de los anticuerpos con los eritrocitos, este resultado se considera positivo. Los anticuerpos anti-Lea pueden provocar la hemólisis de eritrocitos suspendidos en salina.

2.5. Prueba de adherencia de eritrocitos en fase sólida

Otra de las técnicas utilizadas para identificar antígenos o anticuerpos es la prueba de adherencia de eritrocitos en fase sólida, esta utiliza eritrocitos indicadores. En la prueba directa se recubren las paredes de una microplaca con anticuerpos y se añaden eritrocitos a los pocillos, si tienen el antígeno adecuado se adherirán a los anticuerpos en la pared del pocillo, si no hay reacción antígeno-anticuerpo sedimentan en el fondo del pocillo. En la prueba indirecta se adhieren eritrocitos a los bordes de los pocillos mediante pretratamiento con glutaraldehído, formaldehído o un anticuerpo monoclonal potente, luego se añade suero del paciente y después eritrocitos recubiertos con IgG (células indicadoras). En la reacción positiva los eritrocitos recubiertos se adhieren a las paredes del pocillo, en la negativa los eritrocitos sedimentan en el fondo de los pocillos.

Determinación de la especificidad de los anticuerpos

Las pruebas de detección de anticuerpos tienen como objetivo evidenciar la mayor cantidad posible de anticuerpos con significación clínica, para ello los eritrocitos que se utilicen deben portar los antígenos, contra los cuales están dirigidos la mayoría de los anticuerpos que se encuentran comúnmente. Para investigar los sueros de los pacientes dos muestras testigos de eritrocitos de donantes de fenotipo seleccionado son generalmente suficientes.

Quando se detecta un anticuerpo en el suero de un individuo, deberá identificarse la especificidad del mismo para conocer su significado clínico y si es necesaria la transfusión administrar entonces hematíes carentes del o los antígenos que reconocen los anticuerpos detectados. El procedimiento emplea un panel eritrocitario de fenotipo conocido; en dependencia de las células que reaccionen o no con el suero se podrá reconocer el antígeno contra el cual está dirigido el anticuerpo. Al realizar la identificación de los anticuerpos se deberá tener en cuenta la fuerza de aglutinación con cada una de las células del panel ya que esto puede indicar la presencia de anticuerpos contra varios antígenos o informar sobre la identificación de anticuerpos que reconocen únicamente a antígenos que están en doble dosis (homocigóticos). La estimación de la fuerza de la aglutinación es un proceder subjetivo que depende de la experiencia y apreciación del personal que realiza la investigación. Una de las escalas más usadas se ofrece a continuación:

- 4+ Aglutinación total en un solo cúmulo grande en un fondo claro.
- 3+ Dos o tres aglutinados grandes en un fondo claro.
- 2+ Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo rojo.
- 1+ Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo rojo.
- ± Pequeños aglutinados no definidos.
- 0 ausencia de aglutinación.

En la tabla que se presenta a continuación se muestra el ejemplo de un suero que reacciona en la PAI con todas las células S+ y no reacciona con las S-, en este caso el suero contiene anticuerpos anti-S y se pueden excluir otras posibilidades; por ejemplo, las células 2, 4 y 10 son D+ y reaccionan con el suero, las células 1, 5, 6, 7 y 8 son D- y no reaccionan con el suero, pero los anticuerpos no pueden ser anti-D porque las células 3 y 9 son D+ y el suero no reacciona con ellas.

Al investigar de esta manera se pueden excluir anticuerpos de otras especificidades, sin embargo, otros no. En el ejemplo anterior el suero puede presentar anticuerpos anti-Cw tanto como anti-S porque el suero reacciona con la célula 2 y esta es S+ y Cw, en este particular y en otros similares es necesario el uso de hematíes fenotipo S(-), Cw(+).

Tabla 8. Panel eritrocitario para la identificación de anticuerpos eitrocitarios

Muestras	Rh	MN				Lutheran		P	Lewis		Kell				Duffy		Kidd*			Resultado		
		M	N	S	U	Lua	Lub	P1	Lea	Leb	K	k	Kpa	Kpb	Jsa	Jsb	Fya	Fyb	Jka		Jkb	Xga
																					PAI	
1	CCddee	++	0	0	0	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	+	0
2	CcwDee	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	2+
3	CCDee	++	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0
4	ccDEE	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	3+
5	ccddEE	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0
6	ccddee	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0
7	ccddee	++	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0
8	ccddee	++	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0
9	CCDEe	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0
10	CcDee	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	3+

Nota. Extraído de (29).

Cuando el suero contiene diferentes tipos de anticuerpos se deben utilizar diferentes métodos para determinar las especificidades presentes, una de ellas es valorar la fuerza de la aglutinación con cada fenotipo del panel eritrocitario, otra es el tratamiento enzimático de los eritrocitos para eliminar los sitios antigénicos de los antígenos Fya, Fyb, M, N y S. También se puede usar más de una técnica para identificar varias especificidades si nos basamos en el hecho de que muchos anticuerpos reaccionan por diferentes métodos.

La identificación de anticuerpos contra antígenos de baja o alta incidencia, se rige por los mismos principios detallados anteriormente para otros anticuerpos se requiere del uso de fenotipos raros. Estas células digamos exóticas no poseen antígenos de alta incidencia o por el contrario portan algunos de estos antígenos infrecuentes.

En otras ocasiones los métodos de adsorción elución son útiles para la identificación de anticuerpos eritrocitarios, por ejemplo un suero que contiene anti-K producido por un individuo RhD- se debe estudiar para dilucidar la presencia de anticuerpos anti-D, si la muestra de eritrocitos D+, K- es insuficiente para confirmar o excluir la presencia del anti-D, el suero se puede adsorber con células D-, K+ repetidamente, cuando se obtiene el suero libre de anti-K este se enfrenta a muestras D+ y D-, si el anti-D está presente el anti-K se puede separar de ese anticuerpo por elución de los eritrocitos D-, K+ adsorbidos.

Pruebas de compatibilidad pretransfusional

Las pruebas pretransfusionales muestran un panorama amplio de los antígenos y anticuerpos que puede tener un individuo.

Actualmente existe una gran variedad de pruebas pretransfusionales que se han desarrollado para mejorar la seguridad y eficacia de una transfusión; si se efectúan de manera adecuada, establecen la compatibilidad ABO entre el donador y el receptor y detectan la mayoría de los anticuerpos clínicamente significativos (23).

La metodología de las pruebas pretransfusionales de compatibilidad varía según los recursos del servicio de transfusión y la urgencia del caso, sin embargo, según las normas de muchos países se establece que siempre debe incluirse la técnica de la antiglobulina humana como mínimo.

Cualquier prueba pretransfusional tiene como objetivo garantizar la normal supervivencia de las células rojas transfundidas (detectando anticuerpos clínicamente significativos en el suero del receptor), minimizar los riesgos para el paciente y contener los costos, es decir, su objetivo es proveer a los pacientes de componentes sanguíneos lo más seguro posible. Para ello es necesario el cumplimiento de una serie de pasos que garantizan la seguridad del proceder como son: la correcta identificación del paciente y de sus muestras de sangre, consultar si el paciente ha recibido sangre previamente y la realización de las pruebas inmunohematológicas recomendadas al paciente y a la sangre previo a la transfusión.

Al realizar las pruebas pretransfusionales, es importante que se tomen en cuenta los pasos y procedimientos por realizar, con énfasis en el control de calidad.

Internacionalmente se han establecido los siguientes procedimientos (24):

- Solicitud de producto y datos relevantes del receptor.
- Identificación y colección de las muestras sanguíneas del receptor.
- Estudios y pruebas del donador.
- Determinación del grupo ABO y RHo (D) del receptor.
- Detección de anticuerpos irregulares
- Selección de componentes ABO y Rho (D) apropiados para el receptor.
- Comparación entre resultados actuales y el historial de las pruebas transfusionales realizadas con anterioridad.

a. Identificación del paciente

Antes de realizar la flebotomía el técnico debe asegurarse de la identidad del receptor, siempre que sea posible interrogando al mismo paciente o si el estado de este no lo permite, lo identificará por los registros con el personal de enfermería o de los familiares. La muestra de sangre se coleccionará en tubos etiquetados con el nombre y apellido del paciente. Para los neonatos se anotará el sexo y el número de identificación de la pulsera. En pacientes de identidad desconocida se recomienda utilizar una serie única de números que figurarán en la pulsera del mismo. Se debe tener en cuenta que el período entre la extracción la muestra, la realización del estudio inmunohematológico y la fecha de la transfusión no debe exceder de las 72 horas. Esta premisa es especialmente importante en las embarazadas y en transfusiones recientes del paciente.

b. Transfusiones anteriores

Es necesario consultar si el paciente ha recibido transfusiones y los resultados anteriores de las pruebas realizadas. Esto nos puede alertar sobre la presencia de anticuerpos eritrocitarios ya conocidos que obligan a la administración de sangre fenotipada para los antígenos específicos. En muchas ocasiones los anticuerpos previamente identificados disminuyen su concentración con el tiempo y pueden no ser detectados en pruebas serológicas posteriores, lo que no excluye que con un nuevo estímulo aumenten bruscamente su título y provoquen reacciones transfusionales hemolíticas. Por otra parte, pueden existir discrepancias en el tipaje ABO y RhD con determinaciones previas que deberán ser resueltas antes de la transfusión.

c. Investigaciones inmunohematológicas

Comprenden la determinación del grupo sanguíneo ABO y RhD, la investigación de anticuerpos irregulares y la prueba de compatibilidad.

El grupo sanguíneo ABO y Rh se investigarán en el receptor y en todos los componentes que contengan hematíes. En los receptores no se requiere de la determinación del D débil (Du). En los componentes plasmáticos y plaquetarios se determinarán el grupo ABO, por las isoaglutininas, con una muestra de plasma del componente y eritrocitos de grupo ABO conocidos. Se seleccionará preferiblemente el componente del mismo grupo ABO y RhD del receptor.

d. Detección de anticuerpos eritrocitarios

En la actualidad se recomienda que la detección de anticuerpos eritrocitarios sea realizada en paralelo con la determinación del grupo sanguíneo del paciente. En este proceder se utilizarán hematíes fenotipados o células de pesquisaje y se investigará la presencia de anticuerpos reactivos en salina a 37°C y en la prueba de antiglobulina indirecta. Si el resultado es positivo tiene que investigarse la especificidad de los anticuerpos y proveer al paciente de eritrocitos carentes del antígeno específico.

e. Pruebas cruzadas

Se realizará la prueba cruzada entre el receptor y el donante en las transfusiones de componentes que contengan cantidades de glóbulos rojos visibles a simple vista. El significado más importante de esta prueba es comprobar la compatibilidad ABO entre donante y receptor. Las técnicas que se realizan en las pruebas de compatibilidad deberán incluir la de salina con centrifugación inmediata. Esto es mezclar una suspensión en salina de los hematíes de la unidad de sangre con el suero del receptor y centrifugar. Las muestras de sangre de los componentes se obtendrán de un segmento de la guía originalmente unida a la bolsa.

Con este método se corrobora la identidad ABO entre el donante y el receptor. La prueba de antiglobulina puede omitirse si no se demostraron anticuerpos en los ensayos de detección de anticuerpos. De no realizarse en paralelo la detección de anticuerpos, entonces la prueba cruzada se realizará también en la técnica de antiglobulina indirecta.

Un resultado positivo en las pruebas de compatibilidad obliga a una investigación rigurosa para dilucidar la causa antes de proceder a la transfusión.

Esta prueba podrá omitirse si existe una necesidad urgente de sangre y únicamente se realizará el grupo sanguíneo ABO y RhD al receptor y a la unidad a transfundir. De ser imposible tipificar al paciente se le administrarán hematíes de grupo O RhD negativos. En estos casos se obtiene muestra del paciente con posterioridad y se realizan en ese momento todos los procedimientos recomendados.

En la transfusión de componentes plasmáticos se tendrá en cuenta únicamente la compatibilidad ABO entre donante y receptor.

La muestra de sangre del receptor y del donante se mantendrán tapadas a temperatura de 1°C a 6°C durante 7 días después de la transfusión por si son necesarias investigaciones ulteriores o se diagnostica una reacción pos-transfusional hemolítica tardía.

f. Etiquetado del hemoderivado compatible

En el hemoderivado debe aparecer el nombre, número de identificación y grupo ABO y RhD del receptor, la interpretación de las pruebas de compatibilidad y la identificación de la persona que ha realizado las pruebas de compatibilidad.

g. Registro de los resultados

En la solicitud de la transfusión se llenarán los datos de número de identificación de los donantes, grupo ABO y Rh de los donantes, interpretación de la prueba de compatibilidad, identificación de la persona que ha realizado la prueba de compatibilidad, fecha, hora en que se entrega el hemoderivado para su uso y la firma de quien lo entrega y de quien lo recibe.

Autoanticuerpos eritrocitarios y anemias hemolíticas autoinmunes

Se define al autoanticuerpo eritrocitario al anticuerpo constituido por inmunoglobulinas, fundamentalmente IgG e IgM, y más raramente IgA. Estos anticuerpos reciben el nombre de aloanticuerpos cuando reconocen antígenos que no pertenecen al individuo que los ha producido, y autoanticuerpos cuando reaccionan contra antígenos presentes en los propios hematíes.

Los eritrocitos humanos tienen una vida media en la circulación de 120 días. Ellos son destruidos por el sistema retículo-endotelial a razón aproximadamente de un 1 % por día e igual cantidad es reemplazada, por la médula ósea. Cuando existe una pérdida excesiva de eritrocitos, como en los procesos hemolíticos; se presenta anemia y un aumento en la producción de eritrocitos que se traduce en un incremento en el número de reticulocitos, basófilos y eritrocitos policromatófilos. Otros indicadores de destrucción eritrocítica pueden ser los esferocitos y/o eritrocitos fragmentados, incremento de la bilirrubina, disminución de la haptoglobina, niveles elevados de Lactato Deshidrogenasa (LDH) y hemoglobinuria.

Por otro lado, cabe indicar que la hemólisis de origen inmune es solo una de las causas de anemia hemolítica, esta afección se va a subdividir en los

siguientes grupos: anemia hemolítica autoinmune caliente (AHAIC), síndrome de crioglobulinas (AHAI), anemia hemolítica postransfusional, enfermedad hemolítica fetoneonatal, anemia hemolítica inmune inducida por drogas (25).

Diferencias entre anemias hemolíticas hereditarias y anemias hemolíticas inmunes.

Las anemias hemolíticas hereditarias se caracterizan por un defecto intrínseco de la membrana de los eritrocitos (esferocitosis, eliptocitosis, estomatocitosis); por síntesis de hemoglobina anormal (anemias drepanocíticas, talasemias) o por deficiencias en la síntesis de enzimas glicolíticas (glucosa 6 fosfato deshidrogenasa). Otras anemias hemolíticas están asociadas con los fenotipos Rh nulos; Rh modificado y el fenotipo McLeod (Ver sistema Rh y Kell).

La hemólisis es característica de todas estas patologías, pero en ningún caso la destrucción de los eritrocitos es mediada por anticuerpos.

Por el contrario, en las anemias hemolíticas inmunes los eritrocitos son morfológica y funcionalmente normales y son hemolizados por presencia de anticuerpos eritrocitarios (alo o autoinmunes).

Las anemias hemolíticas aloinmunes se caracterizan por la destrucción de los eritrocitos por anticuerpos debido a la aloinmunización. Esta se divide en dos grandes grupos: la reacción transfusional hemolítica (RTH) y la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN).

En las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI) la destrucción de los eritrocitos es debida a la producción de autoanticuerpos por el paciente dirigidos contra sus propios antígenos eritrocitarios.

Diagnóstico inmunohematológico de las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI)

El diagnóstico de laboratorio principalmente se realiza con la Prueba de Antiglobulina Directa (PAD) o Prueba de Coombs directa. Este ensayo se realiza con suero antiglobulina humana (Suero de Coombs) que se obtiene en animales inmunizados con las globulinas humanas. Este reactivo debe contener anticuerpos principalmente contra la IgG y el fragmento C3d del complemento humano y puede o no presentar anticuerpo anti-IgM y anti-IgA (suero de Coombs poliespecífico).

Es preferible contar con un reactivo en el cual estén presentes todas las actividades para garantizar un mayor espectro de detección de autoanticuerpos. Está demostrado que los autoanticuerpos de la clase Ig A son infrecuentes, pero cuando se presentan es difícil su detección en la PAD.

Una prueba de Coombs directa positiva significa la presencia de anticuerpos y/o complemento (C3) unido a los hematíes "in vivo", pero no es exclusivo de las AHAI ya que puede también ser causado por la ocurrencia "in vivo" de los siguientes fenómenos:

- La presencia de aloanticuerpos en un receptor de sangre transfundido recientemente, que reaccionan con los antígenos eritrocitarios del donante.
- Anticuerpos presentes en los derivados plasmáticos o productos de fraccionamiento que reaccionan con los antígenos de los eritrocitos del receptor (Ej. anti A, anti B, anti AB).
- Aloanticuerpos maternos que atraviesan la placenta y se unen a los hematíes fetales. Estos anticuerpos provocan la EHRN.
- Anticuerpos contra algunos fármacos que se unen a la membrana de los eritrocitos, como la penicilina.
- Modificaciones de las membranas eritrocitarias como resultado de la terapia con fármacos del grupo de las cefalosporinas que provocan la adsorción no inmune de proteínas a los eritrocitos, incluyendo las inmunoglobulinas y el complemento.
- La presencia de inmunocomplejos en respuesta a la administración de quinidina y fenacetina, por citar algunas; que causan la unión de componentes del complemento a los eritrocitos.
- Anticuerpos heterófilos antieritrocitos humanos presentes en la globulina antilinfocítica (GAL) de origen equino.
- Unión de inmunoglobulinas a los eritrocitos de los pacientes con hipergammaglobulinemias. Este fenómeno también se observa en pacientes tratados con altas dosis de gammaglobulina intravenosa.
- Anticuerpos eritrocitarios producidos por linfocitos alogénicos presentes en los órganos trasplantados.

Autoanticuerpos benignos

Estudios reportan que en el 10 % de los pacientes hospitalizados y entre 1 en 1000 y 1 en 9000 donantes de sangre se ha detectado una PAD positiva anemia hemolítica. Los resultados serológicos de estos casos son similares a los encontrados en pacientes con AHAI. Los estudios de subclases de IgG han revelado la presencia de IgG1 y en algunas ocasiones IgG3 en concentraciones similares a las presentes en eritrocitos de pacientes con AHAIC, por lo que las diferencias cuantitativas no se relacionan con el desarrollo de la enfermedad.

Se ha observado que en donantes de sangre con PAD positiva hay presencia de dos poblaciones de autoanticuerpos IgG. Una de ellas reacciona con los eritrocitos, siendo en realidad los autoanticuerpos, y la otra no reacciona con los eritrocitos sino con los autoanticuerpos unidos a los mismos; estos anticuerpos son anti-idiotipos específicos contra los autoanticuerpos.

Las interacciones idiotipos-anti-idiotipos pueden ser la causa de la ausencia de hemólisis en individuos normales con autoanticuerpos eritrocitarios. En los pacientes con AHAIC no se demuestra la presencia de anticuerpos anti-idiotipos.

Evaluación de una PAD positiva

Las consideraciones clínicas son definitorias para evaluar la importancia de una PAD positiva. El diálogo con el clínico es importante antes de realizar cualquier prueba serológica. Para una correcta interpretación de la prueba se requiere del conocimiento del diagnóstico clínico del paciente, historia reciente de transfusiones, o de tratamiento con fármacos y en qué condiciones el paciente comenzó con el cuadro de anemia hemolítica adquirida. El resultado de las pruebas de laboratorio no es diagnóstico; su significación sólo puede tenerse en cuenta en relación con las condiciones clínicas del paciente y los demás exámenes de laboratorio como son: hematocrito, bilirrubina, haptoglobina y conteo de reticulocitos.

La evidencia de hemólisis in vivo está dada por reticulocitosis, hemoglobinemia, hemoglobinuria, disminución de la haptoglobina sérica, niveles elevados de bilirrubina no conjugada y de LDH específicamente la LDH1.

En un paciente anémico con PAD positiva y signos y síntomas de hemólisis es apropiado determinar si la hemólisis es de tipo inmune. Posteriormente es necesario identificar el tipo de inmunoproteína unida a los hematíes para

lo cual es necesario el empleo de suero de Coombs monoespecífico anti IgG y anti C3. La presencia de IgG en los hematíes se relaciona con una anemia hemolítica autoinmune caliente, El C3 como única inmunoproteína en los hematíes se detecta más comúnmente en las anemias hemolíticas por anticuerpos fríos. La reacción negativa con los reactivos monoespecíficos anti-IgG y anti-C3 puede indicar la presencia de anticuerpos de la clase IgA, lo cual debe ser confirmado con suero monoespecífico anti-IgA. En tales casos es necesario tener en cuenta que los estudios posteriores sean realizados con suero de Coombs con actividad anti-IgA demostrada.

1. Anemia hemolítica autoinmune caliente (AHAIC).

La AHAIC pueden ser primarias (idiopáticas) o secundarias a determinadas patologías como son: linfomas, lupus eritematoso sistémico, carcinomas o la terapia con ciertos fármacos.

La incidencia de esta enfermedad varía en dependencia de las series estudiadas, pero no existe duda de que es el tipo más común de anemia hemolítica autoinmune. Los estimados oscilan entre el 48 % y el 70 % del total de las AHAI.

En un resumen de hallazgos inmunohematológicos en las AHAIC reportados en un estudio se señalan las siguientes observaciones:

PAD: En la PAD se puede detectar la presencia de autoanticuerpos de los isotipos IgG, IgA e IgM, aunque estos últimos generalmente concommitan con los IgG. Puede haber la presencia únicamente de C3 e incluso puede ser negativa (Ver AHAI, PAD negativa)

Eluido: La presencia de un autoanticuerpo en los hematíes debe ser confirmada por la elución o sea con el empleo de algún procedimiento para separar a los autoanticuerpos de los hematíes y obtenerlos en una fase acuosa para su posterior caracterización. En algunos casos los autoanticuerpos están presentes en pequeñas concentraciones y puede no ser recuperados en el eluido. Cuando en la PAD se detecta únicamente C3 en el eluido puede o no detectarse el autoanticuerpo. Esto puede ser debido a que el autoanticuerpo se separe de los hematíes después de haberse iniciado la cascada del complemento. No obstante, con técnicas de mayor sensibilidad que la prueba de Coombs, puede revelarse la presencia del mismo.

Un eluido inactivo de hematíes con una PAD intensamente positiva puede ser indicativo de la presencia de anticuerpos contra fármacos que están unidos a los hematíes.

El eluido obtenido debe enfrentarse a hematíes de grupo O pertenecientes a un panel de eritrocitos de identificación de anticuerpos. El estudio debe realizarse a 37°C en la (PAI) y con hematíes tratados con enzimas proteolíticas que aumentan la sensibilidad de detección de los anticuerpos. Si se obtiene un resultado positivo debe enfrentarse a todo el panel de eritrocitos para determinar la especificidad de los anticuerpos. En la gran mayoría de los casos el autoanticuerpo no muestra especificidad aparente y reacciona con todas las muestras de eritrocitos que conforman el panel de células.

En un número reducido de casos el anticuerpo posee especificidad y la confirmación de la naturaleza autoinmune del mismo es demostrando la presencia del antígeno específico en los eritrocitos del paciente o que estos adsorben nuevamente los anticuerpos del eluido.

La presencia en el eluido de autoanticuerpos reactivos a 37°C confirma el diagnóstico de una anemia hemolítica autoinmune caliente (AHAIC).

Especificidad de los autoanticuerpos: La especificidad de los autoanticuerpos asociados a AHAIC es muy compleja. La clasificación más simple es la que divide la especificidad en dos tipos:

- **tipo I:** Autoanticuerpos calientes que reaccionan únicamente con los eritrocitos senescentes o gerocitos del paciente.

- **tipo II:** Autoanticuerpos calientes que reaccionan igualmente con los reticulocitos (eritrocitos jóvenes) que con los eritrocitos senescentes.

Los autoanticuerpos calientes de tipo I generalmente muestran especificidades para los antígenos del sistema Rh, no así los anticuerpos de tipo II donde en la mayoría de los casos no es posible determinar la especificidad.

En un reducido número de casos (4 %) los autoanticuerpos muestran especificidades simples (Ej. anti-e, anti-c); en otros las especificidades reveladas pueden ser confundidas con un aloanticuerpo. Ejemplo: paciente con fenotipo Rh CcDee y anticuerpo anti-E en el eluido, pero este anticuerpo es capaz de adsorberse con eritrocitos que carecen del antígeno por lo que en realidad son autoanticuerpos que mimetizan especificidades de aloanticuerpos.

En la mayoría de los casos la especificidad se manifiesta como una "especificidad relativa" y esta es revelada al diluir el eluido y enfrentarlo a diferentes fenotipos Rh. La especificidad relativa más comúnmente encontrada es

anti-e. De otros autoanticuerpos sólo puede determinarse que son específicos para el complejo Rh al no reaccionar con eritrocitos Rh nulos (carentes de los antígenos del sistema Rh o parcialmente seleccionados. La reacción de los autoanticuerpos con eritrocitos Rh nulos o parcialmente seleccionados sugiere especificidades no relacionadas con el sistema Rh.

Se han identificado también autoanticuerpos con especificidades para otros sistemas de grupos sanguíneos dentro de los que se incluyen los antígenos A (ABO), Ena, Jka, Kell, Kpb, Jsb, Lan, LW, N, Sc1, U, Wrb, Xga y otros.

Las determinaciones de la especificidad de los autoanticuerpos son de interés académico; no existe relación alguna entre la especificidad y la severidad de la enfermedad. El conocimiento de la especificidad de los autoanticuerpos puede ser útil al determinar si los anticuerpos circulantes en el suero son aloanticuerpos o autoanticuerpos y así como para la estimación de la concentración de estos últimos que puede servir de referencia al evaluar la efectividad del tratamiento. Algunos centros se apoyan en la especificidad de los autoanticuerpos para seleccionar la sangre a transfundir.

Estudios en el suero del paciente: En la mayoría de los pacientes los autoanticuerpos libres en el suero están en bajas concentraciones. Estos son detectados en el suero cuando todos los sitios antigénicos de los hematíes están ocupados y no pueden unirse a ellos más anticuerpos in vivo. La PAD en estos casos es intensamente positiva. En el 50 % de los pacientes se detectan autoanticuerpos IgG en el suero que reaccionan adecuadamente en la prueba de antiglobulina indirecta (PAI). Con el tratamiento de los hematíes con enzimas se obtiene positividad en el 90 % de los casos. Los autoanticuerpos capaces de hemolizar a células no tratadas con enzimas (autohemolisinas) son poco frecuentes, afortunadamente, ya que estos provocan hemólisis intravascular que se asocia con una alta mortalidad de los pacientes. Las investigaciones en el suero del paciente pueden revelar la presencia de

Aloanticuerpos provocados por transfusiones o embarazos anteriores. La detección de aloanticuerpos es vital para la terapia transfusional ya que pueden provocar reacciones transfusionales hemolíticas y comprometer la recuperación y la vida del paciente. La certeza de la aloinmunización se tiene al identificar en el suero del paciente anticuerpos contra antígenos eritrocitarios no presentes en sus hematíes frecuentemente con especificidades dentro de los sistemas Rh, Kell, Duffy y Kidd.

La presencia de los aloanticuerpos puede estar enmascarada por autoanticuerpos circulantes en el suero y es necesario eliminar estos últimos de

la reacción para revelar la presencia de los primeros. Con este objetivo se utiliza la técnica de adsorción en caliente que no es más que la incubación a 37°C del suero del paciente con los hematíes autólogos previamente tratados con enzimas proteolíticas o con una combinación de estas con Ditiotreitól (ZZAP). El tratamiento previo de los hematíes es necesario para eliminar los autoanticuerpos unidos in vivo a los mismos y dejar libres los sitios antigénicos para la adsorción de los autoanticuerpos del suero.

Dstrucción inmune de los hematíes en las AHAIC: La destrucción intravascular de los eritrocitos en las AHAIC es poco frecuente. Cuando esta ocurre se han detectado hemolisinas in vitro. Como es de esperar los pacientes con estos autoanticuerpos presentan una anemia severa y generalmente la mortalidad es alta si no es suprimido el proceso hemolítico. La destrucción de eritrocitos en la AHAIC es predominantemente extravascular (Ver mecanismo de hemólisis extravascular).

Autoanticuerpos estimulados por la transfusión: Las transfusiones en períodos tempranos de la aparición de la enfermedad sin aún comenzar el tratamiento inmunosupresor comprometen la respuesta al mismo. Las transfusiones innecesarias incrementan la producción de autoanticuerpos por el estímulo inmunogénico que producen los eritrocitos del donante. En algunos pacientes las transfusiones provocan la aparición de complemento en los hematíes donde solo se detectaba IgG. Esto se traduce en un incremento de la anemia por el efecto sinérgico que el complemento manifiesta en la destrucción de los eritrocitos por el macrófago.

Selección de la sangre para la transfusión en las AHAIC: El aspecto más importante para la selección de la sangre a transfundir es la detección de aloanticuerpos circulantes que puedan causar reacciones transfusionales hemolíticas. No existe justificación para ignorar este aspecto en las pruebas de compatibilidad. Los procedimientos utilizados para este fin han sido mencionados anteriormente, son prácticos y no requieren de un tiempo prolongado de realización.

Quando los autoanticuerpos tienen especificidad definida o muestran especificidad relativa puede tenerse en cuenta esta para la transfusión. En pacientes con autoanticuerpos de especificidad anti-e, los hematíes de fenotipo Rh ccDEE pueden sobrevivir mejor al ser transfundidos que los de fenotipo Rh ccddee o los CcDee. Sin embargo, este hallazgo no es siempre cierto y en ocasiones la sobrevivencia de hematíes carentes del antígeno no es significativamente diferente a la de los que lo presentan. Por ejemplo, en un estudio

realizado, la vida media de hematíes CCDee fue de 2 días y la de hematíes ccDEE fue de 4 días.

En otros casos los autoanticuerpos que muestran especificidad son los responsables directos de la destrucción y con la transfusión de eritrocitos carentes del antígeno se obtienen beneficios notables. Existen dos excepciones en las cuales no se recomienda la transfusión de eritrocitos carentes del antígeno específico para los autoanticuerpos. Una de ellas es la transfusión de sangre RhD positiva a pacientes RhD negativos; esto es particularmente importante en mujeres en edad gestacional o cuando es necesario administrar varias transfusiones. Por ejemplo, en paciente con fenotipo Rh ccddee con especificidad de autoanticuerpo anti-e, los eritrocitos indicados serían de fenotipo E+e- y este fenotipo es imposible encontrarlo en donantes RhD negativos (ccddEE) y la única alternativa de sangre carente del antígeno se encuentra en donantes RhD positivos.

La otra excepción es cuando el paciente presenta un aloanticuerpo que contraindica la transfusión de hematíes carentes del antígeno específico para los autoanticuerpos. Ejemplo: paciente con un aloanti-E y un autoanti-e. Los aloanticuerpos siempre deben ser considerados de mayor relevancia clínica por lo que debe transfundirse sangre E negativa.

Apoyándose en este último ejemplo es que no se recomienda la transfusión compatibilizando la especificidad de los autoanticuerpos si existe riesgo de aloinmunización. Sin embargo, se conoce que la aloinmunización en pacientes con AHAIC es un evento poco frecuente debido a que la respuesta aloimmune está suprimida por el uso de inmunosupresores.

Cuando existen autoanticuerpos circulantes en el suero de especificidad no definida, es necesario transfundir los hematíes incompatibles, después de comprobar la ausencia de aloanticuerpos causantes de RTH. Se sugieren realizar las pruebas de compatibilidad con diferentes donantes y seleccionar la unidad de eritrocitos menos incompatible, aunque no existen datos que apoyen esta recomendación y que demuestren que estos eritrocitos sobrevivan mejor en el paciente.

En la mayoría de los casos y teniendo en cuenta que: Es difícil evitar la incompatibilidad causada por los autoanticuerpos en la selección de la sangre ya que solo en el 4 % de los pacientes con AHAIC se demuestra especificidad de autoanticuerpos y que la incompatibilidad por autoanticuerpos raramente causa problemas clínicos; no se debe considerar para la transfusión la especificidad del autoanticuerpo. Si es obligatorio investigar la presencia de

aloanticuerpos y excluir la incompatibilidad causada por los mismos. Otros aspectos relacionados con la transfusión se abordan en el capítulo de Medicina Transfusional.

2. Anemia hemolítica autoinmune con PAD negativa

La gran mayoría de los pacientes con AHAIC presentan una PAD positiva, pero una PAD negativa no excluye la enfermedad. Numerosos casos se han descrito de AHAIC en que los autoanticuerpos no han sido demostrados con las pruebas serológicas convencionales. Una de las explicaciones de este fenómeno es que el número de moléculas de IgG por eritrocito es inferior a 200, que es el requerido para una PAD positiva.

Durante mucho tiempo el diagnóstico de AHAIC con PAD negativa se realizaba por exclusión. Actualmente se cuenta con una serie de procedimientos que si bien no son todo lo eficientes que se desea pueden establecer un diagnóstico en la mayoría de los casos en que se sospecha hemólisis inmune.

Los procedimientos más usados se relacionan a continuación:

- Ensayos inmunoenzimáticos de antiglobulina (ELISA).
- PAD en autoanalizador.
- PAD con anti-inmunoglobulinas marcadas con radioisótopos.
- Técnica manual de polibrene directa.
- Técnica directa con bromelina.
- Concentración del eluido.
- Ensayos de fagocitosis in vitro con monocitos.

Los resultados obtenidos con estos métodos confirman que la PAD negativa no es atribuible únicamente a la presencia de un reducido número de moléculas de IgG por hematíe. Se ha demostrado que en muchos casos las concentraciones de autoanticuerpos IgG son superiores a las encontradas en eritrocitos con PAD débilmente positiva. Al parecer la inefectividad de la prueba de Coombs se explica porque las anti-inmunoglobulinas no establecen uniones entre células debido a una orientación particular de las moléculas de autoanticuerpos. Esta disposición impide que se evidencie la aglutinación.

En algunos pacientes la negatividad de la PAD es debido a los procedimientos utilizados in vitro (Ej. lavado de los hematíes). Cuando existen autoanticuerpos IgG de baja afinidad y los lavados de los hematíes se realizan con salina a temperatura ambiente, la PAD puede ser negativa, demostrándose la presencia de los autoanticuerpos cuando los lavados se realizan con salina fría 4°C o en solución de baja fuerza iónica.

3. Anemia hemolítica autoinmune inducida por fármacos.

Los primeros casos descritos de AHAi inducidas por fármacos se relacionaron con la administración de alfa-metildopa. Después de esta observación otras drogas han sido identificadas como inductoras de autoinmunidad contra eritrocitos. Dentro de las que se encuentran:

- Clorpromazina
- Nomifensina
- Cianidanol
- Fenacetina
- Diclofenac
- Procainamida
- Ibuprofen
- Estreptomina
- Levodopa
- Ácido mefenámico
- Interferón alfa

El tratamiento con estos medicamentos provoca desordenes del sistema inmune, aún no dilucidados completamente, que conlleva a la producción de autoanticuerpos contra los propios hematíes del paciente. Es importante no confundir este mecanismo con el de la anemia hemolítica por fármacos debido a la producción de anticuerpos contra el medicamento, donde los hematíes se comportan como espectadores inocentes de la inmunohemólisis.

Diferentes mecanismos se han sugerido para explicar la inducción de la autoinmunidad por medicamentos. Unos se apoyan en que el fármaco altera

los antígenos del hematíe siendo estos reconocidos como no propios por el sistema inmune. También en ensayos in vitro se ha demostrado que la droga interfiere en la función de las células T supresoras lo que facilita la producción de autoanticuerpos por las células B. Otros estudios no confirman estos resultados. Algunos autores plantean que el mecanismo de inducción de autoinmunidad por el interferón alfa (IFN) es similar al de la metil-dopa. Estas observaciones se apoyan en que el IFN puede modificar las membranas celulares y convertirlas en antigénicas.

Los hallazgos de laboratorio relacionados con la inducción de autoanticuerpos por la alfa-metildopa son los siguientes:

- PAD positiva en aproximadamente el 15 % de los pacientes que reciben tratamiento con dicho fármaco. De ellos sólo del 0.5 - 1 % desarrollan anemia hemolítica.
- En los eritrocitos se identifica únicamente IgG; raramente C3.
- PAD positiva 6 meses después del tratamiento.
- Los autoanticuerpos en el suero y en el eluido tienen características similares a los encontrados en la AHAIC.
- La positividad de la PAD puede disminuir progresivamente después que es suspendido el tratamiento y puede persistir hasta 2 años.

Cuando existe evidencia de que el fármaco ha inducido la anemia hemolítica el medicamento debe ser retirado. En los pacientes con autoanticuerpos inducidos por alfa-metildopa pero sin manifestaciones clínicas de anemia hemolítica se debe discontinuar el tratamiento. La inducción del proceso hemolítico es dosis-dependiente.

En aquellos pacientes en que se decida continuar la terapia, aunque presenten autoanticuerpos sin manifestaciones de anemia, deberán ser cuidadosamente monitorizados serológica y hematológicamente. Es de valor en estos casos la realización de la PAI. En los pacientes con PAD positiva y PAI negativa la anemia hemolítica es improbable. En los que ambas pruebas resulten positivas hay alto riesgo de aparición de anemia hemolítica.

4. Síndrome de aglutininas frías

El Síndrome de aglutininas frías (SAF) es el tipo más común de anemia hemolítica asociada con autoanticuerpos fríos y representa del 16 al 32 % del total de casos con hemólisis de tipo inmune. Este síndrome puede manifestarse de forma aguda o crónica. La forma aguda es secundaria a enfermedades linfoproliferativas (Ej. linfomas) o a la infección por *Mycoplasma pneumoniae* o VIH. La forma crónica se observa en pacientes de edad avanzada con manifestaciones de anemia ligera o moderada. Los pacientes expuestos a ambientes fríos pueden presentar hemoglobinuria y fenómeno de Raynaud.

Se presenta a continuación el resumen de los hallazgos inmunohematológicos en el SAF.

PAD: El complemento es la única proteína detectada en los hematíes. El autoanticuerpo frío es de tipo IgM y se une a los hematíes en la circulación periférica cuando la temperatura está por debajo de 32°C. La IgM al unirse activa la cascada del complemento y particularmente promueve la unión del C3b y del C4b a los eritrocitos. Al circular el eritrocito por áreas donde la temperatura es mayor, la IgM se disocia y solo queda unido a los hematíes el complemento. La acción de los inactivadores H e I provoca que el C3b/C4b sea inactivado a C3dg /C4d y estos son los fragmentos que se identifican sobre los eritrocitos en la PAD. Estos hallazgos muestran la importancia de la presencia del anti-C3d en el suero de Coombs.

Eluido: Generalmente no se obtiene actividad de autoanticuerpos en el eluido ya que en los hematíes in vivo está presente únicamente complemento.

Especificidad de los autoanticuerpos: La especificidad más común encontrada es anti-I, menos probable anti-i. Esta última se encuentra con más frecuencia asociada con la mononucleosis infecciosa. En raras ocasiones pueden identificarse anti-Pr y otras especificidades.

Estudios en el suero: En el suero de estos pacientes se identifican autoanticuerpos IgM fríos o crioaglutininas con títulos a 40°C que pueden ser de 1000 en períodos de incubación de 12 horas. Cuando se usan períodos de incubación de 1 hora a 40°C se obtienen títulos mayores de 64 y amplio rango térmico de actividad de anticuerpo. Esto se traduce en que las crioaglutininas de importancia clínica aglutinan hematíes a 37°C en presencia de albúmina y son capaces de hemolizar los hematíes tratados con enzimas. Es importante tener en cuenta este aspecto ya que los autoanticuerpos fríos son anticuerpos "naturales", presentes en la mayoría de los individuos sanos, pero en títulos menores de 64 a 40°C e incapaces de reaccionar a 37°C.

En algunos casos se puede demostrar actividad hemolítica con hematíes suspendidos en salina a temperaturas entre 20 y 25oC.

En el SAF crónico el autoanticuerpo IgM es monoclonal mientras que la forma aguda se caracteriza por una IgM policlonal.

Es también necesario realizar la detección e identificación de aloanticuerpos. El estudio debe realizarse estrictamente a 37oC ya que a menores temperaturas puede fijarse el autoanticuerpo y provocar positividad en la PAI. En algunos casos en que la producción de autoanticuerpos fríos está exacerbada es necesario recurrir a procedimientos de auto adsorción en frío para realizar el estudio de los aloanticuerpos.

Destrucción inmune de los hematíes en el SAF: La exposición al frío provoca la unión de los autoanticuerpos IgM a los eritrocitos y se activa la vía clásica del complemento, como resultado algunos eritrocitos son destruidos por lisis intravascular. Al retornar el paciente a la temperatura normal la IgM pierde afinidad y se separa dejando fijado el C3b a los eritrocitos. Los hematíes con C3b son atrapados por los macrófagos del hígado si antes el C3b no fue inactivado por los factores H e I produciendo C3dg. Los hematíes con C3dg unido sobreviven normalmente en la circulación ya que no existen receptores para este fragmento en los macrófagos. La destrucción extravascular en estos casos es limitada.

Selección de la sangre para la transfusión en el SAF: La compatibilización de la sangre para el autoanticuerpo es casi imposible ya que no hay forma de obtener sangre de adulto totalmente carente del antígeno I. La transfusión hay que administrarla con resultados positivos en la prueba de compatibilidad pretransfusional, particularmente en las que se realizan en medio salino y albuminoideo. Las particularidades de la transfusión en estos pacientes se detallan en el capítulo de Medicina Transfusional.

5. Anemia hemolítica autoinmune mixta

La anemia hemolítica autoinmune mixta se caracteriza por hallazgos serológicos compatibles con la anemia hemolítica autoinmune caliente (AHAIC) y con el síndrome de aglutininas frías (SAF). Representa entre el 7 y el 8 % de las AHAIC y puede ser idiopática o secundaria generalmente asociada con Lupus Eritematoso Sistémico. Los hallazgos serológicos que muestran los resultados de estudios son:

PAD: La prueba antiglobulina directa es positiva por presencia de IgG y C3dg. Presumiblemente la IgG es el autoanticuerpo caliente mientras que el C3dg es fijado por la autoaglutinina fría IgM.

Eluido: En el eluido se detecta el autoanticuerpo IgG caliente.

Especificidad de los autoanticuerpos: La crioaglutinina es de igual especificidad que en el SAF (anti I; i). En otros casos no ha sido posible determinar la especificidad.

Los autoanticuerpos calientes muestran especificidades similares a los descritos en las AHAIC, aunque se ha sugerido que puede reconocer un determinante antigénico de los grupos sanguíneos diferente de los que reconoce el autoanticuerpo en la AHAIC.

Estudios en el suero: En el suero se encuentran autoanticuerpos calientes IgG y la crioaglutinina IgM; con la diferencia que ésta última es de título menor de 64 a 40C, pero reacciona a 37oC.

Destrucción inmune de los hematíes en las AHAI Mixta: La destrucción inmune de hematíes es por mecanismos extravasculares similares a los de la AHAIC.

Selección de la sangre para la transfusión en la AHAI Mixta: Se realiza de forma similar a lo expresado en la AHAIC

6. Hemoglobinuria paroxística a frigore (HPF)

Esta enfermedad es poco frecuente. En el pasado se encontró asociada con la sífilis. Se presenta más comúnmente como un proceso agudo ocasional secundario a infecciones virales particularmente en niños y puede presentarse como una enfermedad crónica idiopática en personas de edad avanzada.

PAD: El autoanticuerpo en la HPF es de la clase IgG y al igual que el autoanticuerpo frío IgM reacciona con los eritrocitos en las áreas de menor temperatura del cuerpo (generalmente en las extremidades) causando la deposición de componentes del complemento (C3; C4) y se separa de los hematíes en las áreas de mayor temperatura corporal. La PAD sólo detecta el complemento (C3) fijado a los hematíes. Es posible detectar los autoanticuerpos IgG cuando los hematíes son lavados con salina a 4oC comportándose como un anticuerpo de baja afinidad.

Eluido: Es invariablemente no reactivo.

Especificidad de los autoanticuerpos: Los autoanticuerpos son frecuentemente de especificidad anti-P. Excepcionalmente se han descrito especificidades anti I, anti i y anti Pr.

Investigaciones en el suero: El autoanticuerpo IgG es descrito como una hemolisina bifásica ya que se une a los hematíes a bajas temperaturas y los lisa a 37°C. Esta es la prueba básica para el diagnóstico de la enfermedad (Prueba de Donath - Landsteiner). Los autoanticuerpos pueden aglutinar los eritrocitos a 4°C, pero raramente a títulos mayores de 64.

Destrucción inmune de los hematíes en la HPF: Se observan episodios de hemólisis intravascular por fijación de complemento que coincide con la hemoglobinuria.

Selección de la sangre para la transfusión en la HPF: El suero de los pacientes con HPF es compatible con hematíes de donantes cuando se realizan las pruebas de compatibilidad pretransfusional ya que el anticuerpo raramente aglutina los hematíes a temperaturas superiores a 4°C. Los autoanticuerpos de especificidad anti P no reaccionan con eritrocitos de fenotipos raros p y Pk. Existen evidencias de que los hematíes p sobreviven mejor que los P+ (P1+ ó P1-). La incidencia de donantes p es aproximadamente 1 en 200 000; por tanto, los pacientes que requieran transfusiones urgentes deben transfundirse independientemente de la compatibilización del autoanticuerpo ya que la posibilidad de encontrar donantes compatibles es poco frecuente.

Inmunoematología de las plaquetas y los leucocitos.

Las plaquetas y los leucocitos tienen una entidad inmunológica propia, aunque expresan antígenos compartidos con otras células del organismo.

A diferencia de la serología eritrocitaria, la leucoplaquetar no se desarrolló directamente relacionada con la historia de la transfusión sanguínea. Los anticuerpos anti-plaquetas y anti-leucocitos se demostraron inicialmente en las trombocitopenias inducidas por medicamentos y en la agranulocitosis crónica, respectivamente.

La descripción del primer antígeno del sistema HLA (del inglés Human Leucocytes Antigens), y del primer antígeno específico de plaquetas en 1958, inicia la era de los antígenos plaquetarios y leucocitarios. Casi medio siglo ha transcurrido desde entonces, período en el cual se ha logrado precisar en gran medida la significación clínica de los anticuerpos antiplaquetarios y antileucocitarios. La detección de estos anticuerpos ha llevado consigo la superación de muchas dificultades técnicas.

La identificación, caracterización bioquímica y localización de las dianas de los anticuerpos antiplaquetarios y antileucocitarios han repercutido

en el perfeccionamiento de los métodos de detección para los mismos. Por otra parte, la aplicación de los avances logrados en el campo de la inmunología y la biología molecular ha sido de vital importancia en el desarrollo obtenido en la serología leucoplaquetar en la última década.

A continuación, se abordan los antígenos plaquetarios y leucocitarios tanto compartidos como específicos y los métodos de detección de los anticuerpos dirigidos contra estas células. Además, se exponen algunas consideraciones diagnósticas de las trombocitopenias y neutropenias inmunes.

Antígenos plaquetarios

1. Antígenos compartidos

Los antígenos compartidos se expresan en las plaquetas y en otras líneas celulares, ellos incluyen los antígenos de grupos sanguíneos y los del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) clase I.

Los antígenos A, B y H presentes en la membrana plaquetaria son constituyentes propios de la membrana y también pueden ser adsorbidos de las formas solubles del plasma. En el primer caso su síntesis se realiza a partir de moléculas H tipo II y su expresión es independiente de los genes Lewis y Secretor. Estos se encuentran fundamentalmente en la cadena de la glicoproteína Ib (GPIb). En el segundo caso la síntesis se realiza a partir de precursores H tipo I y su expresión depende de los genes Lewis y Secretor. Los antígenos de los sistemas Lewis, I y P se expresan en cantidades pequeñas por lo que sus expresiones carecen de importancia clínica.

La expresión de los antígenos del sistema ABO debe ser tenida en cuenta en la selección de las plaquetas para la realización de las pruebas serológicas y en la transfusión de este componente. La administración de plaquetas ABO incompatibles puede ser indicada en casos de no disponerse de plaquetas compatibles. La sobrevida de las plaquetas ABO incompatibles es variable, debido a la variabilidad individual en la expresión de estos antígenos y al menor título de anti-B presente en los receptores, lo que está relacionado con la mayor sobrevida de las plaquetas B incompatibles.

Los antígenos del sistema HLA clase I pueden ser adsorbidos del plasma, pero su expresión se debe en mayor medida a la síntesis a partir de RNA contenido en las plaquetas. Las moléculas de clase I se encuentran involucradas en la Refratariedad a la Transfusión de las Plaquetas (RTF) y en las reacciones febriles postransfusionales. Su participación en la Púrpura Trombocitopénica Neonatal Aloinmune (PTNA) es un tema controversial en la literatura.

2. Antígenos específicos.

En un inicio los antígenos específicos de plaquetas fueron identificados con diferentes nombres por los distintos investigadores que los descubrieron. En 1990 von dem Borne propuso una nomenclatura uniforme, que designa a cada sistema con las iniciales HPA (del inglés Human Platelet Antigen) y un número asignado de acuerdo al orden cronológico del descubrimiento de cada sistema. Hasta el momento se conocen 5 sistemas bialélicos bien definidos. Las dos formas alélicas son codominantes y se identifican con las letras a y b en correspondencia con sus frecuencias relativas. Existen 8 sistemas de los que sólo se conoce el alelo de baja frecuencia. En estos casos se utiliza la letra w para designar al sistema. El sistema bialélico puede definirse solamente cuando se identifican aloanticuerpos contra ambos alelos. Recientemente se han identificado 6 antígenos que se encuentran pendientes de caracterizar definitivamente. Con excepción de los antígenos del sistema Gov, el resto residen en las glicoproteínas (GP) mayores de la membrana plaquetaria.

En el complejo glicoproteico GP IIb/IIIa, se localizan la mayor cantidad de los antígenos plaquetarios específicos. En la membrana plaquetaria existen aproximadamente 50 000-80 000 copias de este heterodímero que actúa como receptor del fibrinógeno una vez que la plaqueta se encuentra activada. Hasta la fecha se conocen las bases genéticas de 10 aloantígenos localizados en este complejo. En 9 casos la causa de la variabilidad antigénica es la sustitución de un simple nucleótido. El antígeno Oea es la excepción, el cual resulta de la delección de un fragmento de 3 nucleótidos en la glicoproteína IIIa.

En el complejo glicoproteico Ib/IX/V residen 4 sistemas antigénicos, de los cuales en dos casos se han podido determinar las bases genéticas. Este complejo funciona como receptor del factor von Willebrand y se encuentra involucrado en la adhesión plaquetaria a la matriz subendotelial de vasos sanguíneos dañados.

El complejo antigénico GP Ia/IIa o VLA-2 se expresa además de en las plaquetas en los linfocitos T activados y en otros tipos celulares. Este heterodímero funciona como receptor del colágeno en el subendotelio expuesto y existen entre 800 y 2800 copias del mismo por plaqueta. En este complejo residen dos sistemas antigénicos, en ambos casos la variabilidad es ocasionada por la sustitución de un simple nucleótido.

3. Isoantígenos.

El antígeno plaquetario naka puede provocar la producción de anticuerpos causantes de refractariedad. la carencia de este antígeno se debe a la ausencia de la gp-iv por lo que se ha considerado como un isoantígeno, ya que los anticuerpos no reconocen una variante molecular de la gp-iv.

4. Antígenos crípticos.

Los antígenos crípticos deben su nombre al hecho de que su expresión no es detectable en condiciones normales, ocurriendo sólo bajo algún tipo de influencia del entorno. Dentro de ellos se encuentra el antígeno tn, que puede expresarse en pacientes con anemias hemolíticas, leucemias y deficiencias de transferasas. El antígeno tn puede quedar expuesto por tratamientos con neuroaminidasa. La activación, generalmente bacteriana del antígeno t puede inducir el reconocimiento de las plaquetas infectadas por parte de los anticuerpos anti-t presentes en la mayoría de los sueros, sin embargo esta unión no produce trombocitopenia.

El edta, produce modificaciones en la configuración del complejo gpiib-ii-ia. Los anticuerpos edta dependientes inducen agregación y satelitismo. Su reconocimiento y confirmación serológica son importantes para evitar falsos diagnósticos y exploraciones innecesarias.

Drogas como la quinidina y la quinina inducen la expresión de neoantígenos en la membrana plaquetaria. Estos neoantígenos estimulan la producción de anticuerpos productores de trombocitopenia, la cual remite al suspender el tratamiento con la droga.

5. Autoantígenos.

La mayoría de los autoanticuerpos detectados en los pacientes con Púrpura trombocitopénica autoinmune (PTA) reconocen epitopes localizados en el complejo GPIIb/IIIa. En algunos casos se han identificado anticuerpos que reconocen determinantes presentes en el complejo GPIb/IX y en la GPIa.

A parte de las glicoproteínas de membrana existen otras proteínas que han sido identificadas como diana de los autoanticuerpos en la pta. ellos incluyen el receptor del colágeno de 62 kda, el vla-2 y proteínas con pesos moleculares desde 50-240 kda o de un rango más estrecho de 50-90 kda.

Koerner y cols purificaron 13 glicoesfingolípidos y plantearon que dos no bien caracterizados pudieran actuar como autoantígenos.

Tipificación de antígenos plaquetarios

El desarrollo de la biología molecular ha hecho posible vencer muchas de las dificultades para el tipaje de los sistemas HPA. En el tipaje celular se emplean antisueros procedentes de individuos sensibilizados, por lo que la disponibilidad de los mismos es escasa, sobre todo en los casos de los antisueros dirigidos contra antígenos de baja frecuencia. Además, la mayoría de estos antisueros están contaminados con anticuerpos anti HLA, lo que puede afectar la especificidad de la reacción.

En inmunohematología se aplican las técnicas denominadas PCR-ASRA (del inglés PCR-allele specific restriction analysis), PCR-ASO (del inglés PSR-allele specific oligonucleotide) y PCR-SSP (del inglés PCR-sequence-specific primer)

1. PCR-ASRA. La PCR-ASRA consiste en amplificar los segmentos de interés mediante "primers" específicos para las GPs implicadas en los sistemas HPA. El producto de la amplificación es digerido por endonucleasas de restricción específicas. Después de la digestión se realiza una electroforesis en geles de agarosa o acrilamida, tinción con el agente intercalante bromuro de etidio y trasiluminación con luz ultravioleta de onda media (302 nm). El patrón de bandas resultantes se interpreta con la ayuda de una muestra control, consistente en diversos fragmentos de DNA de tamaño conocido, que se incluye en el mismo proceso electroforético.

2. PCR-ASO. En la PCR-ASO una vez amplificado el producto de interés, éste es transferido a un soporte sólido e hibridado con una sonda de DNA específica. La positividad se muestra como manchas oscuras, dependiendo su revelado del sistema de marcaje utilizado para la sonda.

3. PCR-SSP. La técnica de PCR-SSP permite amplificar alelos de forma específica; esto evita pasos adicionales de restricción o hibridación, ya que la mera presencia o ausencia de fragmento de DNA es suficiente para determinar el genotipo.

Técnicas para la detección de los aloanticuerpos.

Las técnicas para detectar aloanticuerpos emplean plaquetas de donantes de sangre, las cuales son enfrentadas al suero del paciente. En caso de existir aloinmunización plaquetaria, el suero debe ser enfrentado a un panel de plaquetas fenotipadas para conocer la especificidad de los aloanticuerpos.

1. Técnica de inmunofluorescencia

La detección de los anticuerpos es a través de un conjugado antiglobulínico marcado con isocianato de fluoresceína. En esta técnica las plaquetas son tratadas con paraformaldehído con el objetivo de disminuir la fijación inespecífica de IgG o de inmunocomplejos. Las ventajas de la misma son: la fácil detección de fragmentos plaquetarios portadores de fluorescencia no específica y la identificación de IgG, IgM e IgA mediante antiglobulinas monoespecíficas. Este método es tomado como estándar para comparar nuevos procedimientos. Una desventaja del mismo es la baja sensibilidad, ya que se requiere como mínimo 1000 moléculas de IgG unidas a las plaquetas para obtener una reacción positiva.

Una alternativa de la inmunofluorescencia microscópica es la citometría de flujo. Esta variante ha sido usada para la detección de aloanticuerpos y para la realización de las pruebas de compatibilidad.

2. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)

En esta técnica se emplea antiglobulina marcada con peroxidasa o fosfatasa alcalina. La desventaja de este método es la tendencia de las IgG del suero a unirse a las microplacas, lo que puede dar resultados positivos falsos.

3. Fase sólida

Las plaquetas se fijan a las microplacas y se incuban con el suero problema. Después de varios lavados se añade una suspensión de hematíes recubiertos con anti-IgG. En caso de que las plaquetas queden sensibilizadas, los hematíes se distribuirán recubriendo toda la monocapa plaquetaria, en caso contrario los hematíes se concentrarán en el fondo del pocillo. El uso de una solución de baja fuerza iónica reduce el tiempo de realización del ensayo. En lugar de emplear hematíes acoplados a anti-IgG, pueden emplearse hematíes sensibilizados con anti-D de la clase IgG y posteriormente añadir anti-IgG.

4. MAIPA

Su nombre proviene del inglés Monoclonal antibodies-specific immobilization of platelet antigen assay. En esta técnica las plaquetas se incuban con el suero problema, después de lavarlas se incuban con anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas. Las plaquetas se solubilizan y el sobrenadante del lisado es incubado en microplacas previamente recubiertas con antiglobulina de ratón. Si el suero contiene anticuerpos, el sobrenadante contendrá inmunocomplejos, formados por la unión del anticuerpo monoclonal a su GP específica, a la cual se habrá fijado también el anticuerpo problema. Estos inmunocomplejos se unen a través del anticuerpo monoclonal a la antiglobulina de ratón fijada a la microplaca. El anticuerpo es detectado por la adición de una antiglobulina humana marcada con fosfatasa alcalina o peroxidasa.

Esta técnica tiene como ventajas ser más sensible que la inmunofluorescencia, la fase sólida o el ELISA y permite definir la especificidad del anticuerpo detectado porque la presencia de anticuerpos HLA no interfiere en el resultado.

El principal inconveniente de este método es la necesidad de disponer de un panel de anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos de plaquetas, además si el monoclonal reconoce el mismo epítotope que el anticuerpo plaquetario, se pueden obtener resultados negativos falsos.

En el trabajo presentado por Hernández D. et al. (26) relativo al diagnóstico de las enfermedades autoinmunes y el apoyo de las técnicas que permiten tanto identificar como confirmar el o los antígenos(s) específicos reconocidos.

Indican los autores que entre las técnicas más utilizadas se encuentran: la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo inmunoenzimático (ELISA), el ensayo múltiple y la electroinmunotransferencia (EIT). Cada una de ellas presenta diferencias, pero conservan el fundamento general que es el reconocimiento de la unión antígeno-anticuerpo y presenta las características más importantes de dichas pruebas:

a. Inmunofluorescencia indirecta. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una de las técnicas más utilizadas en los estudios de autoinmunidad debido a su fácil manejo y estandarización. Sin embargo, la lectura e interpretación requieren de amplia experiencia. La técnica se basa en el reconocimiento de los anticuerpos que reconocen estructuras antigénicas celulares nativas. La interacción se evidencia por medio de un anticuerpo antiinmunoglobulina humana, producido en conejo, cabra o cobayo, dirigido contra las fracciones constantes (Fc) de las inmunoglobulinas IgG, IgA y/o IgM. Este anticuerpo

antiinmunoglobulina humano está conjugado o acoplado a un fluoróforo (generalmente isotiocianato de fluoresceína [FITC]). Los resultados del reconocimiento de los antígenos por los autoanticuerpos presentes en el suero, plasma o cualquier otro líquido, se evalúan en un microscopio de epifluorescencia. Actualmente, la IFI se utiliza en los estudios de autoinmunidad para la detección de anticuerpos anti-DNA de doble cadena (DNAcd) o DNA nativo (DNA_n) utilizando como sustrato *Crithidia luciliae*. Para la detección de anticuerpos que reconocen antígenos nucleares se utilizan como sustratos líneas celulares epiteliales humanas como las células HEp-2 o las células HeLa. En el caso de los anticuerpos contra componentes de los gránulos primarios y específicos de los polimorfonucleares o anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA), se utilizan neutrófilos fijados con etanol y formalina; y para los anticuerpos que reconocen antígenos órgano-específicos, se utilizan como sustratos cortes de tejidos específicos (v. g. tiroides, esófago, estómago, glándulas suprarrenales, glándulas salivales, etc.).

b. Ensayo inmunoenzimático. El ELISA es una de las técnicas más utilizadas para identificar o confirmar la especificidad de los anticuerpos presentes en las muestras de los pacientes con enfermedades autoinmunes. Además, por su fácil estandarización, manejo y variedad de antígenos disponibles, ha desplazado notablemente a otras técnicas como el radioinmunoensayo para la detección de anticuerpos anti-DNAcd (conocido también como prueba de Farr), ya que no utiliza radionúclidos, lo que hace que sea una técnica accesible y de bajo riesgo. Si bien existen diferentes tipos de ELISA, el más utilizado en el laboratorio de diagnóstico de autoinmunidad es el ELISA indirecto, el cual se fundamenta en el reconocimiento de los anticuerpos específicos presentes en las muestras de los pacientes, mediante un anticuerpo dirigido contra la región Fc humana de cualquier isotipo (IgG, IgA o IgM) e inclusive de cualquier subclase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2). Los anticuerpos anti-Fc están unidos a enzimas como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina. Los antígenos utilizados en las placas de ELISA pueden ser nativos, recombinantes (antígeno completo o epítipo específico) o sintéticos (epítipo específico). Después de permitir la interacción de los anticuerpos de las muestras de los pacientes con el antígeno pegado a la placa de ELISA, se realizan lavados para eliminar los anticuerpos inespecíficos y se agrega el anticuerpo antiinmunoglobulina humana unido a enzima, permitiendo la interacción por un tiempo determinado. Posteriormente, se adiciona la solución que contiene el sustrato-cromogénico c, 3', 5', 5'-Tetrametilbenzidina [TMB] para la peroxidasa o p-nitrofenilfosfato para la fosfatasa alcalina) el cual cambiará de color en función de la cantidad de anticuerpos conjugados con la enzima y cuya cantidad

depende de los anticuerpos del paciente que reconocieron al antígeno pegado a la placa. En otras palabras, la intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo del paciente unido al antígeno (fig. 4). La técnica puede ser cualitativa si solo se requiere conocer si existen o no anticuerpos con reactividad por determinado antígeno o cuantitativa si se requiere conocer la cantidad de anticuerpos presentes en las muestras, para lo cual el ensayo debe incluir una curva patrón de reactividad específica. El ELISA tiene como ventaja que no se necesita un equipo sofisticado para su lectura.

c. Ensayo luminométrico múltiple. En los últimos años el ensayo luminométrico múltiple (ELM) se ha vuelto popular, debido a que permite la detección de hasta 100 diferentes autoanticuerpos que reconocen el mismo número de antígenos en una sola determinación y con un volumen pequeño de muestra (aproximadamente 50µL). Estas son las ventajas más importantes del ensayo comparado con el ELISA, ya que para realizar el mismo número de determinaciones específicas por ELISA se requerirían 100 placas y 5mL de muestra. La técnica es una variante del ELISA indirecto, pero la detección es distinta: en el ELISA se utiliza un compuesto cromogénico, en tanto que en el ELM la detección se realiza por fluorescencia, con lo que la sensibilidad del ensayo es mayor. El ELM se fundamenta en la detección de anticuerpos que reaccionan contra antígenos específicos, los cuales recubren esferas que contienen diferentes proporciones de un fluoróforo (combinaciones de un fluoruro rojo y otro infrarrojo). La determinación de la cantidad de anticuerpo unido al antígeno se revela por la interacción de un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana conjugado con biotina. Posteriormente, se adiciona un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (PE). El ensayo se lee en un luminómetro, instrumento que tiene el mismo principio que el citómetro de flujo. De manera breve, cuando se hacen pasar por un detector de fluorescencia, las microesferas que contienen los complejos antígeno-anticuerpo-estreptavidina-PE, el colorante de las microesferas y la PE se excitan por haces de luz de longitudes de onda de 635 y 488nm respectivamente. La luz del láser que pasa por el filtro de longitud de onda de 635nm excita al fluoróforo de la microesfera, lo que permite la identificación de los antígenos y el láser que pasa por el filtro de 488nm excita a la PE conjugada con estreptavidina, permitiendo la detección de la cantidad de anticuerpo específico presente en la muestra del paciente.

d. Electroinmunotransferencia. La EIT, junto con el ELISA y el ELM son las técnicas de mayor sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra antígenos específicos; sin embargo, la EIT tiene la desventaja de

ser cualitativa o semicuantitativa. Se fundamenta en el reconocimiento de anticuerpos que tienen especificidad por antígenos que se absorben en una membrana (de nitrocelulosa o nylon). Los antígenos adsorbidos en la membrana fueron previamente separados en geles de poliácridamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) y transferidos a las membranas. La unión de los anticuerpos a los antígenos específicos se detecta mediante la adición de un anticuerpo que reconoce la región Fc de las inmunoglobulinas humanas, el cual está acoplado a una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa). La unión se revela con la adición de un sustrato-cromogénico soluble (alfa-naftol/Fast red o NBT/BCIP [cloruro de azul de tetrasodio/sal de toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato], para cada enzima, respectivamente) el cual se precipita en el sitio en donde se encuentra el complejo antígeno-anticuerpo por la acción de la enzima. La EIT es una técnica accesible y de fácil interpretación ya que no requiere de ningún instrumento para su lectura, pues se hace de forma visual.

e. Nanoensayo luminométrico múltiple. El nanoensayo luminométrico múltiple (NALIA) es uno de los métodos de detección múltiple de reciente desarrollo. Permite identificar la reactividad simultánea contra 10 autoantígenos. Es una técnica que deriva de la EIT y se fundamenta en el reconocimiento de autoantígenos adsorbidos en pequeñas cantidades o puntos, en placas de 96 pozos de ELISA con fondo de membrana de nitrocelulosa. El complejo antígeno-anticuerpos se detecta por medio de un segundo anticuerpo que reconoce la región Fc de las inmunoglobulinas humanas, el cual está conjugado con un fluoróforo. La reactividad se mide por medio de un analizador de imágenes⁵. La técnica es cualitativa y requiere de un instrumento lector y de un programa de computadora para su interpretación.

Métodos para diferenciar los anticuerpos específicos de los anticuerpos anti-HLA.

La especificidad de los aloanticuerpos es de vital importancia en el diagnóstico de la PTNA y de la PTP. En ocasiones esto se hace difícil por la coexistencia de anticuerpos específicos de plaquetas y de especificidad HLA clase I. Este problema se resuelve parcialmente tratando las plaquetas con cloroquina, la cual incluye los antígenos HLA clase I. Después de 20 minutos de incubación con la cloroquina el 80% de los antígenos HLA es removido, mientras que las glicoproteínas no son afectadas. Sin embargo, después de una hora de incubación el 50% de la glicoproteína es removido.

Una alternativa para remover los antígenos de clase I es el tratamiento de las plaquetas con buffer de ácido cítrico. Existe la posibilidad de poder combinar los dos métodos anteriores, usando el difosfato de cloroquina en un medio acidificado. Esta combinación es más efectiva y se dañan menos plaquetas.

En cuanto a algunas consideraciones diagnósticas de las trombocitopenias y neutropenias inmunes, se tienen:

1. Púrpura trombocitopénica neonatal aloimmune.

Es una trombocitopenia ocasionada por aloanticuerpos maternos de tipo igg dirigidos contra antígenos plaquetarios del feto, heredados del padre, de los cuales la madre carece. La incidencia es de 1 por cada 2000-4000 recién nacidos. El 50% de los casos se produce en una primera gestación.

El diagnóstico de la PTNA debe incluir el pesquisaje del suero de la madre y la identificación de la especificidad del anticuerpo reactivo, para este fin debe usarse un panel de plaquetas homocigóticas para los antígenos de relevancia clínica, ya que algunos anticuerpos no reaccionan con plaquetas heterocigóticas. Un resultado negativo de anticuerpos antiplaquetarios no excluye la etiología aloimmune de la trombocitopenia. Esto puede ser debido a la baja sensibilidad de los métodos disponibles. En algunos casos los anticuerpos son detectables después de 3-6 meses del parto. Cuando los anticuerpos no son detectados el tipaje de la madre, el padre y el neonato es de gran ayuda. Las técnicas de biología molecular ofrecen la posibilidad de conocer el genotipo del niño, aun cuando la severa trombocitopenia no permita el fenotipaje usando un panel de antisueros. Las plaquetas del padre deben ser tipadas para el sistema antigénico responsable de la aloimmunización, con el propósito de determinar la cigocidad y predecir la probabilidad de afectación en futuros embarazos.

Las pruebas cruzadas entre el suero de la madre y las plaquetas del padre permiten detectar anticuerpos contra antígenos de baja frecuencia que pasan inadvertidos cuando se enfrenta el suero de la madre contra un panel celular. la utilización del maipa en las pruebas de compatibilidad ofrece la posibilidad de discriminar entre incompatibilidad debido a anticuerpos específicos de plaquetas y anticuerpos anti HLA.

Existe controversia acerca de los posibles beneficios que reportaría el tipaje para el antígeno hpa-1a, para todas las mujeres en su primer embarazo, y el pesquisaje de aloanticuerpos para las que resulten hpa-1a negativas. Al margen que resulte beneficioso o no realizar un programa a gran escala, las hermanas de las mujeres con niños afectados deben de ser tipadas para el

antígeno que estimulo la producción de aloanticuerpos. Es importante cerciorarse de que el conteo plaquetario de la madre sea normal, ya que los autoanticuerpos pueden ocasionar trombocitopenias neonatales.

2. Púrpura trombocitopénica postransfusional.

Es un cuadro clínico poco frecuente, caracterizado por una trombocitopenia que aparece entre los 7 a 10 días después de una transfusión de componentes sanguíneos en un paciente con historia de exposición a antígenos plaquetarios por embarazo o transfusiones anteriores. El diagnóstico se realiza por la detección de anticuerpos específicos de plaquetas. La especificidad debe ser determinada con vistas a obtener plaquetas compatibles, en caso de ser necesario aportarlas. el genotipaje del paciente se puede realizar a través de técnicas de biología molecular si no se dispone de la cantidad de plaquetas necesarias para realizar el tipaje utilizando un panel de antisueros.

Siempre que la cifra de las plaquetas lo permita, se deberá realizar el estudio del eluido, en el que se detectará el mismo anticuerpo que fue hallado en el suero. Este resultado permite diferenciar la ptp de la trombocitopenia inducida por drogas y de la pta, en la primera los resultados son positivos sólo cuando el fármaco está presente en el eluido, en la pta los anticuerpos contenidos en el eluido son reactivos con todas las plaquetas de un panel excepto con aquellas que no expresen determinadas glicoproteínas.

3. Refractariedad a la transfusión de plaquetas.

Es definida como la ausencia de un incremento en la cifra de plaquetas en el recuento efectuado una hora después de la transfusión.

Debido a que los aloanticuerpos que producen con mayor frecuencia refractariedad son de especificidad HLA-A y B, el uso de plaquetas compatibles produce incrementos postransfusionales satisfactorios. Si la especificidad es conocida, el uso de plaquetas carentes del antígeno puede conllevar a un incremento del recuento postransfusional. Desdichadamente por lo general es imposible definir la especificidad debido a la amplia exposición de alelos HLA a los que se han enfrentado los pacientes politransfundidos. Ante esta situación una alternativa es el uso de donantes HLA compatibles. El enorme polimorfismo de los antígenos del sistema HLA implica la necesidad de disponer de al menos 2500 donantes para la selección de un donante de plaquetas HLA compatible.

La solución más práctica en estos casos es la realización de pruebas de compatibilidad entre las plaquetas del donante y el suero del receptor y seleccionar los donantes con resultados negativos. Las técnicas más usuales empleadas en las pruebas cruzadas son las de ELISA, inmunofluorescencia y fase sólida. Los aloanticuerpos pueden desaparecer a lo largo del tiempo por lo que el suero de los pacientes aloinmunizados debe ser evaluado periódicamente. Si los anticuerpos desaparecen, el paciente puede ser tratado nuevamente con plaquetas de un donante escogido al azar.

A pesar de que los anticuerpos de especificidad HLA son los principales causantes de la refractariedad de causa inmunológica, los anticuerpos específicos de plaquetas, los autoanticuerpos y los anticuerpos producidos por drogas pueden también ocasionarla. Un pequeño porcentaje es debido a la infusión de anticuerpos presentes en el producto transfundido.

Técnicas de detección de autoanticuerpos.

La identificación de los anticuerpos sobre la membrana plaquetaria en los pacientes con PTA tiene mayor sensibilidad en el diagnóstico que los estudios serológicos. Sin embargo, la especificidad de estos ensayos es baja. Esto se debe a que la cantidad de IgG asociada a las plaquetas puede estar afectada por la presencia de inmunocomplejos circulantes, por la activación plaquetaria o por anticuerpos dependientes de drogas. Además, las plaquetas contienen IgG en sus gránulos α , cuyo contenido varía en dependencia de los niveles de IgG en el plasma y de la edad del paciente. Otro inconveniente que presentan los ensayos directos es la excesiva cantidad de sangre que se necesita en pacientes con trombocitopenia severa.

Prueba de inmunofluorescencia directa

Es similar a la descrita para aloanticuerpos con la diferencia que emplea plaquetas de pacientes con sospecha de padecer púrpura trombocitopénica autoinmune.

Radioinmunoanálisis

En caso de que se sospeche PTA y resulte negativa la prueba de inmunofluorescencia directa se puede realizar un radioinmunoanálisis empleando anticuerpos monoclonales (MARIA) en los cuales un gradiente de sucrosa separa los fragmentos, lo que evita que los anticuerpos detectados sean producto de la fragmentación plaquetaria.

Técnicas de elución de anticuerpos.

La elución consiste en liberar (despegar) los anticuerpos unidos o fijados en la membrana de los hematíes permitiendo su estudio e identificación.

Es muy útil para eluir anticuerpos tipo IgG. La elución de los anticuerpos es fundamental para confirmar que las inmunoglobulinas fijadas a las plaquetas del paciente se correspondan con anticuerpos antiplaquetarios y no son el resultado de uniones inespecíficas. Los métodos más usualmente empleados en la elución son el éter y la elución ácida.

Antígenos

1. Antígenos leucocitarios.

Los leucocitos presentan antígenos identificados por anticuerpos monoclonales que juegan un rol importante en la diferenciación celular, además actúan como moléculas de adhesión y como receptores en las múltiples funciones que tienen estas células. Estos antígenos no son reconocidos por aloantisueros y su identificación es importante en el diagnóstico de procesos hematológicos malignos por lo que serán tratados en otros capítulos. En este capítulo centraremos la atención en los antígenos capaces de generar una respuesta a lo o autoinmune, por lo que la identificación de anticuerpos contra ellos resulta valiosa en el diagnóstico de las neutropenias a lo y autoinmunes, en las reacciones febriles postransfusionales y en el daño pulmonar asociado a la transfusión sanguínea.

2. Antígenos granulocitarios.

Los antígenos de la membrana granulocitaria no están tan bien caracterizados como los plaquetarios. Resulta conveniente dividirlos en tres grupos:

- a. Antígenos específicos de granulocitos, de los cuales la mayor parte se localizan en el receptor de la IgG Fc γ IIIb (CD16).
- b. Antígenos compartidos, los que frecuentemente tienen una distribución limitada en otros tipos celulares, fundamentalmente en otros leucocitos. La mayoría se encuentra localizada en la molécula CD 11/18.
- c. Antígenos comunes. Están ampliamente distribuidos en otras células sanguíneas y del resto del organismo. Dentro de ellos están incluidos los antígenos de grupo sanguíneos I, P, Lex y sialyl-Lex (CD15) y los antígenos HLA de clase I.

La nomenclatura inicial empleada para los antígenos granulocitarios usa la letra N para indicar especificidad de neutrófilos, seguida por una letra mayúscula para designar el locus que controlaba la producción del antígeno, seguido de un número correspondiente al alelo específico del locus. Este sistema tiene el inconveniente de haberse descubierto un número importante de antígenos ampliamente distribuidos que no se ajustan a esta convención. Recientemente se ha propuesto una nueva nomenclatura que incluye tanto a los antígenos específicos como a los compartidos. En el caso de los antígenos de los que no se tenga información suficiente se continúa refiriéndose a ellos de acuerdo al nombre original que les fue asignado.

2.1. Antígenos específicos de granulocitos.

En la molécula Fc γ IIIb (CD16) se localizan los antígenos HNA-1a, HNA-1b, HNA-1c, LAN y SAR. Los dos primeros antígenos difieren en sus pesos moleculares debido a un patrón diferente de glicosilación. Sin embargo, a nivel del DNA ambos alelos difieren solamente en 5 nucleótidos lo que conlleva a la sustitución de 4 aminoácidos. El HNA-1c difiere solo del HNA-1b en la sustitución de un aminoácido.

El LAN y el SAR son antígenos de alta frecuencia que se han definido por antiseros humanos y su localización molecular en la molécula Fc γ IIIb se desconoce.

El antígeno HNA-2a se expresa en los granulocitos del 97% de la población y se encuentra localizado en una glicoproteína de 56-64 kDa expresada tanto en la membrana plasmática como en la membrana de los gránulos específicos. Los anticuerpos anti- NB2 no reaccionan con la glicoproteína de 56-64 kDa, esto sugiere que estos anticuerpos no reconocen un antígeno antitético al HPA-2a. El hallazgo de que el NB2 se localiza en una glicoproteína de 46-56 Da, constituye otra evidencia en contra de que ambos antígenos sean antitéticos.

A diferencia del resto de los antígenos específicos de granulocitos los antígenos ND1 y NE1 se definieron por autoanticuerpos procedentes de un paciente con neutropenia autoinmune. Hasta el momento no se conoce las bases moleculares, ni la naturaleza de tales antígenos.

2.2. Antígenos compartidos.

El antígeno 9a se definió en un principio como específico de granulocitos, investigaciones posteriores sugieren que este antígeno es idéntico al NB2 y al antígeno 1 de monocitos humanos (HMA 1). La localización molecular de este antígeno no se conoce aún.

Los antígenos del anteriormente nombrado sistema cinco, conformado por los antígenos 5a y 5b, este último conocido actualmente como HNA-3a, se expresa en granulocitos, plaquetas, linfocitos y en células del riñón, ganglios linfáticos y bazo. Existen algunas evidencias que sugieren que los mismos son específicos de granulocitos y que la amplia distribución encontrada inicialmente se deba a la contaminación de los antisueros con otros aloanticuerpos, probablemente de especificidad HLA. El HNA-3a se localiza en una glicoproteína granulocitaria de 70 a 95 kDa. Los antisueros contra el antígeno 5a son pocos frecuentes, por esta razón la significación clínica y la localización de dicho antígeno se desconoce.

Los antígenos HNA-4a y HNA-5a se localizan en las moléculas de adhesión CD11b/CD18 y CD11a/CD18 respectivamente. El HNA-4a se expresa en los granulocitos, monocitos y algunas subpoblaciones de linfocitos T. El HNA-5a se expresa en granulocitos, monocitos, linfocitos T y B.

El antígeno SL se identificó por un antisuero procedente de la madre de un neonato afectado de neutropenia aloinmune. El antígeno se expresa en granulocitos y en linfocitos, pero no se conoce la localización molecular del mismo.

2.3. Antígenos comunes

Están ampliamente distribuidos en otras células sanguíneas y del resto del organismo. Dentro de ellos están incluidos los antígenos de grupo sanguíneos I, P, Lex y sialyl-Lex (CD15) y los antígenos HLA de clase I.

3. Antígenos presentes en los linfocitos.

En los linfocitos han sido identificados dos sistemas alélicos uno en las células T γ , con los antígenos TCA 1 y TCA 2 y otro en las células T μ con los antígenos TCB1 y TCB2.

La significación clínica de los aloanticuerpos contra antígenos específicos de linfocitos es desconocida. Sólo se ha informado un caso de linfopenia aloinmune del recién nacido debido a aloanticuerpos maternos, los que provocaron inmunodeficiencia severa combinada.

En la literatura existen dos informes de hipogammaglobulinemia asociada a la presencia de autoanticuerpos citotóxicos. En uno de los casos, las dianas eran los linfocitos B y en el otro los T cooperadores.

4. Antígenos presentes en los monocitos.

Los monocitos expresan el antígeno Em, el cual se encuentra además en las células endoteliales. Los anticuerpos contra este antígeno están involucrados en el rechazo de los riñones trasplantados y pudieran participar también en la enfermedad de injerto contra huésped. La importancia clínica de los antígenos específicos de monocitos no se conoce a profundidad, por lo que se requiere investigaciones en este campo, lo que pudiera redundar en un mejor manejo de los pacientes trasplantados.

Tipificación de antígenos granulocitarios.

Originalmente los granulocitos, al igual que las plaquetas, se tipaban usando sueros humanos de individuos aloinmunizados. Estos métodos serológicos tienen las mismas limitaciones que las expuestas con anterioridad para las plaquetas. Sin embargo, antígenos como el HNA-3a, 5a, 9a, NB2 y SL sólo pueden ser tipados usando técnicas serológicas convencionales.

En la actualidad se dispone de técnicas de biología molecular de PCR-SSP para el genotipaje de los antígenos HNA-1a, HNA-1b y HNA-1c. La descripción de las bases moleculares del polimorfismo de los antígenos HNA-4a y HNA-5a abre la posibilidad de que en un futuro sea posible realizar el genotipaje de estos antígenos.

Técnicas de detección de anticuerpos contra antígenos de granulocitos.

Las técnicas de detección pueden ser directas e indirectas. Los ensayos directos son realizados en pacientes con sospecha de padecer neutropenias autoinmunes y se utilizan neutrófilos de estos pacientes. Los indirectos se emplean

mayormente en el diagnóstico de las neutropenias aloinmunes, aunque pueden ser también de utilidad en las neutropenias autoinmune en caso de que los anticuerpos se encuentren libres en el suero. En las pruebas indirectas se utilizan neutrófilos de donantes, a los cuales se enfrentan los sueros problemas. Las técnicas más empleadas en la detección de anticuerpos anti-granulocitos son: la leucoaglutinación, la inmunofluorescencia y en menor medida la quimioluminiscencia.

1. Leucoaglutinación

Inicialmente fue descrita por Lalezari como un macrométodo, pero actualmente se realiza en microplacas. la aglutinación producida por los anticuerpos de la clase igm es debida a un entrecruzamiento de la inmunoglobulina con el antígeno presente en la célula diana, de forma homóloga a como ocurre en los hematíes. sin embargo, la aglutinación producida por la igg es una respuesta activa de la célula al interaccionar con el anticuerpo.

2. Técnica de inmunofluorescencia

La detección se realiza a través de un reactivo antiglobulínico conjugado con isocianato de fluoresceína. En realidad, se deben emplear fragmentos Fab o F (ab')₂ de la fracción IgG anti –inmunoglobulinas humanas, para evitar uniones a través de los receptores Fc de los granulocitos.

La citometría de flujo es empleada para realizar la inmunofluorescencia. Esta técnica no requiere el aislamiento previo de los granulocitos, ya que los mismos son identificados de acuerdo a su patrón de dispersión de la luz. Además, la citometría hace posible la identificación al unísono de anticuerpos contra granulocitos, plaquetas y linfocitos.

3. Técnicas de quimioluminiscencia

Esta técnica emplea granulocitos y células mononucleares de donantes sanos. Los granulocitos sensibilizados son incubados con células mononucleares frescas y con luminol. Las células mononucleares con función fagocítica se activan producto de la sensibilización de los granulocitos por los anticuerpos contenidos en el suero. Esta activación trae como consecuencia la generación de radicales del oxígeno y la oxidación del luminol, la cual es leída en un luminoter. La sensibilidad de la técnica de quimioluminiscencia es similar a la de inmunofluorescencia.

Dificultades de las técnicas convencionales.

Uno de los problemas inherentes a las técnicas serológicas es la coexistencia de los antígenos HLA clase I con los antígenos específicos de granulocitos. Por esta razón los sueros a investigar deben ser sometidos al pesquisaje de detección de anticuerpos anti-HLA a través de ensayos de linfotoxicidad. En el caso de los sueros positivos por las dos técnicas, se debe descartar la coexistencia de anticuerpos de ambas especificidades. Con este propósito se debe absorber el suero problema con un pool de plaquetas para remover los anticuerpos anti-HLA clase I, o eluir los antígenos HLA de los granulocitos mediante un tratamiento con cloroquina. Ninguno de los dos procedimientos es efectivo. La absorción con las plaquetas puede ocasionar la pérdida de anticuerpos de baja afinidad para antígenos específicos de granulocitos. La elución puede dañar los granulocitos.

Otro inconveniente de las pruebas serológicas anteriormente explicadas es la interferencia ocasionada por los inmunocomplejos que pueden adherirse a los receptores de complemento y de IgG, lo que ocasiona resultados positivos falsos. Han sido ideadas tres posibilidades para distinguir entre anticuerpos unidos de manera específica e inmunocomplejos. Estas son: 1)- elución de los anticuerpos de los granulocitos, los que si son unidos de forma específica deben reaccionar nuevamente con otros granulocitos, 2)- realizar estudio de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), 3)- bloquear los receptores Fc usando anticuerpos monoclonales. En la práctica es difícil distinguir entre anticuerpos e inmunocomplejos debido a la disponibilidad de los granulocitos para realizar la elución y a lo difícil de interpretar los resultados de la técnica de ADCC.

Técnicas para la detección de anticuerpos específicos de granulocitos

La caracterización bioquímica de los antígenos específicos de granulocitos ha permitido el desarrollo de técnicas capaces de identificar anticuerpos contra dichos antígenos. Estos métodos incluyen captura de antígenos, inmunoblot y ensayos de inmunoprecipitación. El de mayor generalización es el MAIGRA (del inglés Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Granulocyte Antigens). Esta técnica es homóloga a la del MAIPA utilizada para las plaquetas.

Repercusión clínica de los anticuerpos específicos de granulocitos.

Los anticuerpos anti-granulocitos pueden ocasionar neutropenia neonatal alo e isoimmune, neutropenia autoimmune, reacción febril postransfusional y daño pulmonar agudo relacionado con la transfusión. Las complicaciones postransfusionales generadas por los anticuerpos antileucocitarios serán tratadas en otro capítulo por lo que haremos énfasis en las neutropenias inmunes.

Neutropenia neonatal aloimmune.

Este síndrome es análogo a la enfermedad hemolítica del recién nacido. Clínicamente se manifiesta por infecciones. El grado de neutropenia es severo y en el suero de la madre se pueden identificar potentes anticuerpos contra antígenos específicos de granulocitos. Se estima que la incidencia de este síndrome es de 0,2%.

El diagnóstico serológico requiere la demostración de aloanticuerpos antigranulocitarios en el suero de la madre. El anticuerpo causante del síndrome debe ser reactivo con los granulocitos paternos y con todas las células de un panel granulocitario en las que se encuentre el antígeno específico correspondiente. Los antígenos más comúnmente implicados son: el HNA-1a, el HNA-1b y el HNA-2a. La tipificación de los granulocitos de los padres ayuda a confirmar la especificidad del anticuerpo detectado.

Neutropenia neonatal isoimmune.

Las madres con deleciones en los genes de las glicoproteínas pueden desarrollar isoaglutininas contra determinantes no polimórficos. Neutropenias severas pueden ocurrir en neonatos hijos de madres con deleciones del gen FcR111b. El isoanticuerpo es reactivo con todos los granulocitos, excepto con los carentes de FcR111b. Este hecho asociado a un fenotipo NA "null" y a la ausencia de reacción de los granulocitos maternos frente a un monoclonal anti CD16 permiten establecer el diagnóstico.

Neutropenia autoimmune.

La neutropenia resulta de la presencia de autoanticuerpos antineutrófilos, que median la destrucción de los neutrófilos en el bazo. Los antígenos específicos de granulocitos involucrados en las neutropenias autoimmune son el

HNA-1a, el HNA-1b, el HNA-2a, el ND1, el NE1 y el 9a. Las integrinas leucocitarias CD11/CD18 han sido identificadas como dianas de autoanticuerpos en pacientes con neutropenias.

Un aspecto importante en el curso clínico de las neutropenias es la clonalidad de los autoanticuerpos. Las neutropenias seguidas de infecciones o exposiciones a medicamentos por lo general ofrecen un patrón policlonal y son de curso limitado. En contraste, anticuerpos dirigidos contra autoantígenos tienen un patrón monoclonal, lo que implica un defecto del sistema inmunológico y predice una neutropenia de mayor grado y duración.

A pesar de los logros alcanzados en la detección de los anticuerpos antiplaquetarios y antileucocitarios, aún persisten barreras técnicas difíciles de vencer. En las plaquetas las mayores dificultades se concentran en la inespecificidad de los ensayos directos, lo que hace compleja su interpretación. En la serología leucocitaria, el mayor inconveniente reside en la presencia de receptores para el complemento y la porción Fc de las inmunoglobulinas. Los ensayos indirectos tienen limitaciones, en ambas células, ya que en ocasiones se hace difícil definir si los anticuerpos están dirigidos contra antígenos específicos de estas células o contra moléculas HLA de clase I. Los métodos de detección de anticuerpos específicos permiten superar este inconveniente, pero son técnicas costosas que se encuentran al alcance de un número limitado de laboratorios.

Para interpretar correctamente los resultados de los métodos de detección de los anticuerpos antiplaquetarios y antileucocitario es imprescindible que el clínico conozca las ventajas y desventajas del método aplicado en cada paciente, así como también es importante que el profesional de laboratorio domine los datos clínicos, para de esta forma aplicar el método más adecuado en cada caso.

Reactivos principales de uso en inmunohematología.

El descubrimiento de los grupos sanguíneos ABO, por Karl Landsteiner en 1900, impulsó el desarrollo de la Inmunohematología y la Medicina Transfusional, a este le sucedieron el de numerosos sistemas de grupos sanguíneos, no obstante, el ABO es el más importante en la práctica transfusional.

Los primeros resultados en la producción de anticuerpos se remontan a principios del siglo XX, los reactivos para uso en Inmunohematología se producen después de ciertos avances en el campo de la Inmunohematología y

la Hemoterapia aparejados al desarrollo de la Inmunología. Reactivos como el suero antiglobulínico y los sueros hemoclasificadores de grupos sanguíneos, paneles de células reactivas y algunos equipos constituyen la piedra angular para la investigación y la producción en Inmunoematología.

Cuando se habla de producción de anticuerpos se piensa en grandes centros de obtención de anticuerpos, sin embargo, estos reactivos no sólo se obtienen a escala industrial sino también en laboratorios docentes y de investigaciones biomédicas. Los anticuerpos pueden producirse por inmunización in vitro o mediante la inmunización o inoculación inducida del inmunógeno in vivo en animales y en humanos inmunocompetentes (donantes voluntarios sanos o sensibilización por transfusión sanguínea), por inmunización natural en mujeres sensibilizadas durante el embarazo, por técnicas biotecnológicas y de ingeniería genética.

Después de los años 80 los reactivos hemoclasificadores de los antígenos de los grupos sanguíneos, compuestos por anticuerpos policlonales obtenidos a partir de plasma animal o humano, son desplazados por reactivos que contienen anticuerpos monoclonales (AcMo), producidos por un clon celular inmortalizado. Los reactivos monoclonales han incrementado considerablemente la calidad de los ensayos inmunohematológicos y en consecuencia la seguridad transfusional.

A continuación, se brinda un panorama referente a la producción y control de la calidad de los principales reactivos usados en Inmunoematología, ellos son: reactivos hemoclasificadores policlonales y monoclonales, reactivos antiglobulínicos humano y la albúmina sérica bovina.

Reactivos hemoclasificadores policlonales

Karl Landsteiner desarrolló un procedimiento para la determinación del grupo sanguíneo al analizar muestras de sangre de sus colegas, mezcló sueros de unos con suspensiones de hematíes de otros, de esta forma descubrió el sistema de grupo sanguíneo ABO. El hallazgo temprano del sistema ABO se debe al ingenio de este investigador, y a que este es el único sistema en el que los anticuerpos recíprocos se encuentran constante y predeciblemente en el suero de personas normales cuyos hematíes no poseen el o los antígenos correspondientes.

Los restantes sistemas de grupo sanguíneo se descubrieron sucesivamente por anticuerpos obtenidos al inmunizar animales con hematíes humanos

(sistemas P y MN), por anticuerpos responsables de la enfermedad hemolítica del recién nacido presentes en el suero de puérparas (sistema Rh, antígeno D; sistema Kell y sistema Kidd antígeno Jka) y por anticuerpos responsables de reacciones postransfusionales presentes en el suero de pacientes transfundidos (sistema Rh, antígenos C, c, E, e y sistema Kidd, antígeno Jkb).

Estos anticuerpos son policlonales y con características heterogéneas, ya que son producidos por diferentes células plasmáticas provenientes de diferentes clones de células B, su heterogeneidad se manifiesta en la naturaleza de los anticuerpos sintetizados, los cuales están dirigidos contra sitios diferentes de la molécula de antígeno y reaccionan con distintos grados de afinidad.

Los reactivos hemoclasificadores policlonales se obtienen mediante un esquema de inmunización en animales o en humanos (donantes voluntarios sanos), con sustancias específicas de grupos, ya sean antígenos solubles humanos o portados por los eritrocitos de humanos, en otros casos el reactivo se produce a partir del suero de pacientes aloinmunizados que pueden ser pacientes politransfundidos o puérparas.

Cuando se ha alcanzado un título conveniente de los anticuerpos dirigidos contra el antígeno en cuestión, se procede a la extracción de sangre para realizar la producción del reactivo, si este se realiza por inmunización en conejos se sacrifica el animal, ya que el volumen de suero que se extrae resulta insuficiente para una producción a gran escala, no así cuando los animales inmunizados son carneros o caballos. En humanos el suero se colecta mediante la exanguinotransfusión cuando se trata de personas politransfundidas, como los pacientes con hemoglobinopatías, o a partir del plasma obtenido en la plasmaféresis si se trata de una puérpara o un donante.

Un título superior a 1/64 es suficiente para decidir la extracción del suero, este debe procesarse ya que puede contener además de los anticuerpos de interés para producir un reactivo hemoclasificador, anticuerpos que reaccionen con otros antígenos eritrocitarios y contra antígenos de otras entidades celulares. Estos anticuerpos indeseables se eliminan tras adsorciones del suero con eritrocitos humanos lavados; una vez terminado el proceso de adsorción y si es necesario el suero se concentra para aumentar su título, en otras ocasiones se debe restituir con diluentes como la albúmina sérica bovina, o el suero humano de grupo AB libre de anticuerpos irregulares, que son aquellos anticuerpos contra antígenos de grupos sanguíneos diferentes al ABO.

La finalidad de la producción de un reactivo de este tipo es su comercialización y uso en los laboratorios de Inmunología e Inmunohematología, Ser-

vicios de Transfusiones y Bancos de Sangre; para ello el reactivo debe pasar previamente un riguroso control de calidad que consiste en la demostración de sus características funcionales, estas deben responder al propósito para el cual fue diseñado el producto.

Dentro de los requisitos generales que debe cumplir el reactivo hemoclasificador como producto terminado es su esterilidad, transparencia y ausencia de partículas, debe contener preservativos antimicrobianos, envasarse en frascos apropiados y mantener la actividad biológica y características físico-químicas durante el período de validez declarado, a la temperatura de conservación recomendada por el productor.

En el ensayo funcional deben utilizarse al menos tres muestras, una debe obtenerse del inicio y otra del final del proceso de llenado; el productor debe realizar un estudio de estabilidad, es decir, conservar tres muestras del lote en las condiciones por las recomendadas, como mínimo 6 meses después de la fecha de vencimiento del producto.

Los colorantes usados no deben afectar las características biológicas del reactivo, ni variar significativamente durante el período de validez del mismo, además deben permitir observar el contenido y la detección de partículas o turbiedad en el preparado durante el uso.

Estos requisitos son extensivos a los reactivos hemoclasificadores monoclonales, antiglobulínicos y albúmina sérica bovina que se trataran más adelante.

El control de calidad se determina mediante la evaluación de la potencia, avides, especificidad y reproducibilidad del producto. La potencia es el recíproco de la mayor dilución del reactivo donde la aglutinación es de 1+, la avides es el tiempo que tarda el reactivo en aglutinar los eritrocitos, la especificidad se produce cuando el producto identifica certeramente muestras carentes del antígeno en cuestión y en la reproducibilidad se obtienen iguales resultados al repetir un ensayo en días sucesivos.

Estas cuestiones sólo se abordarán para los hemoclasificadores policlonales que reconocen los antígenos de los grupos sanguíneos eritrocitarios ABO y Rh por ser los más frecuentemente utilizados en Bancos de Sangre, Servicios de Transfusión sanguínea y laboratorios de Inmunohematología.

Reactivos hemoclasificadores policlonales del sistema de grupos sanguíneos ABO (anti-A, anti-B, anti-AB)

La potencia se realiza en la técnica de tubo por centrifugación, el reactivo anti-A frente a eritrocitos A₁ debe tener una potencia no menor que 64 y no menor que 16 con tres muestras de eritrocitos A₂B; el reactivo anti-B se ensaya con eritrocitos B con una potencia no menor que 64 y no menor que 32 con tres muestras de eritrocitos A₁B y el reactivo anti-AB con eritrocitos A₁ y B debe tener una potencia no menor que 64 y no menor que 32 con eritrocitos A₂. La avidéz se efectúa en la técnica de lámina, para cada reactivo se utilizan los mismos fenotipos que en la prueba de potencia y deben observarse aglutinados en un intervalo no mayor de 60 segundos, estos no excederán 1 mm de diámetro a los 2 minutos según inspección visual.

En la prueba de especificidad el hemoclasificador anti-A se ensaya con 2 muestras de fenotipo A₁, 2 A₂B, 2 B y 2 O; el anti-B con 2 A₁, 2 A₁B, 2 B y 2 O y el anti-AB con 1 A₁, 2 A₂, 2 B y 4 O. Los hemoclasificadores deben reaccionar con al menos 2+ de aglutinación con los fenotipos que contengan el antígeno específico y no reaccionar con los fenotipos carentes del mismo; además no deben presentar anticuerpos contra los antígenos de grupos sanguíneos H, I, Le^a, Le^b, K, k, Kp^b, Js^b, P1, D, C, c, E, e, C^w, M, N, S, s, U, Lu^b, Jk^a, Jk^b, Fy^a, Fy^b, Xg^a, no deben hemolizar, no deben provocar una falsa aglutinación donde los eritrocitos se agrupan en formación de "pilas de monedas" (fenómeno Rouleaux) y no deben aglutinar eritrocitos de grupo O con prueba de Coombs positiva con 3+ o 4+ obtenidos de pacientes con anemia hemolítica autoinmune (AHA) o preparados in vitro.

La reproducibilidad se estudia con un ensayo de al menos 300 muestras de sangre de donantes, en cada uno de los métodos para los que se recomienda el hemoclasificador, además el grupo sanguíneo ABO de las muestras debe verificarse al determinar las isoaglutininas en el plasma o suero del donante con el uso o no de un producto de referencia.

Reactivos hemoclasificadores policlonales del sistema de grupo sanguíneo Rh (anti-D)

El sistema Rh posee más de 45 antígenos, después de los antígenos A y B el RhD es el de mayor importancia en la práctica transfusional, a diferencia del A y el B los individuos cuyos hematíes carecen del antígeno D no presentan de manera regular anti-D en el suero, su formación se produce por exposición a hematíes que contiene el antígeno D bien por transfusión o embarazos.

El control de calidad, en especial la prueba de potencia, de los hemoclasificadores anti-D varía en dependencia del tipo de anti-D, es decir, si es un reactivo albuminoideo usado para el tipaje Rh₀ (D) y recomendado para la prueba D^u (Grupo I), reactivo de bajo contenido proteico o salino usado para el tipaje Rh₀ (D) (Grupo II), reactivo químicamente modificado usado para el tipaje Rho (D) y recomendado para la prueba D^u (Grupo III), reactivo recomendado únicamente para la prueba D^u (Grupo IV).

La potencia se realiza en la prueba de tubo por centrifugación y en todos los casos los eritrocitos se suspenden al 2% en salina con albúmina al 2%, los reactivos del grupo I se diluyen en albúmina bovina del 20 al 22 % y se incuban 15 minutos a 37°C, los del grupo II se incuban 15 minutos a 37°C o de 20 a 30°C en dependencia de lo recomendado por el productor, los del grupo III se incuban 15 minutos a 37°C y los del grupo IV 30 minutos a 37°C (se realiza prueba de Coombs indirecta); el diluyente de los reactivos de los grupos II, III y IV es salina con albúmina al 2%. Los reactivos hemoclasificadores anti-D deben tener una potencia no menor que 32 frente a eritrocitos de fenotipo ccDee (R₀r).

La avidéz se efectúa en la técnica de lámina con incubación sobre una lámpara, se utiliza el mismo fenotipo que en la prueba de potencia y deben observarse aglutinados en un intervalo no mayor de 60 segundos, estos no excederán 1 mm de diámetro a los 2 minutos según inspección visual, esta prueba no se le realiza a los reactivos del grupo IV.

En la prueba de especificidad los hemoclasificadores anti-D deben cumplir varios requisitos: reaccionar con al menos 2+ de aglutinación con 2 muestras de eritrocitos de fenotipo CcDee (R₁r) y ccDee (R₀r), no aglutinar eritrocitos de fenotipo Ccddee (r'r), ccddEe (r''r), A1ccddee, Bccddee, A1Bccddee y Occddee (rr), no presentar anticuerpos contra los antígenos de grupos sanguíneos H, I, Le^a, Le^b, K, k, Kp^b, Js^p, P1, C, c, E, e, C^w, M, N, S, s, U, Lu^p, Jk^a, Jk^b, Fy^a, Fy^b, Xg^a y no hemolizar ni provocar fenómeno Rouleaux. Los reactivos del grupo IV deben además reaccionar con al menos 2+ de aglutinación con 3 muestras de eritrocitos de fenotipo Du y los de reactivos de los grupos II y III no deben aglutinar eritrocitos de grupo Occddee con prueba de Coombs directa positiva con 3+ o 4+ obtenidos de pacientes con AHAI o preparados in vitro.

La reproducibilidad se estudia con un ensayo de al menos 350 muestras de sangre de donantes, en cada uno de los métodos para los que se recomienda el hemoclasificador, el estudio se realiza en paralelo con un suero anti-D de iguales características al obtenido por el productor.

En el control de calidad de los hemoclasificadores anti-D además de la potencia, avidez, especificidad y reproducibilidad del producto, se evalúa el efecto de prozona, término usado para definir la ausencia o presencia de aglutinaciones débiles en exceso de anticuerpos. En este caso los hemoclasificadores anti-D no deben mostrar disminución de la aglutinación, con el incremento del tiempo de incubación al estudiarse con eritrocitos de fenotipo R1r, en la técnica de tubo y en tiempos de incubación de 15, 30 y 60 minutos. En todos los tiempos debe observarse al menos 2+ de aglutinación.

Reactivos hemoclasificadores monoclonales

La tecnología de hibridoma fue iniciada por George Köhler y Cesar Milstein en 1975, después de describir una producción de anticuerpos in vitro de especificidad predeterminada, observaron que por primera vez se podían producir AcMo dirigidos contra un epítoto en particular.

Una línea celular productora de anticuerpos generada por esta vía proviene de la integración física, mediante un agente fusógeno, de células B productoras de anticuerpos de un animal inmunizado y células de una línea de mieloma (plasmacitoma) con un similar estadio de diferenciación. La hibridoma resultante puede preservar la capacidad de producir y secretar inmunoglobulinas específicas y la posibilidad de reproducirse indefinidamente.

El desarrollo de este tipo de hibridoma fue exitoso con células de ratón y de rata, a diferencia de las células humanas; una vía para la obtención de hibridomas humanos fue la inmortalización de linfocitos de sangre periférica con virus de Epstein-Barr (VEB). Este último procedimiento tenía como desventaja la corta vida de las células en cultivo, como alternativa fusionaron células B inmortalizadas con VEB a células de mieloma de ratón para dar lugar a un heterohibridoma humano-ratón. La hibridación de linfocitos humanos ha sido necesaria para producir determinados anticuerpos contra antígenos eritrocitarios que no son reconocidos por el sistema inmune del ratón (antígenos del sistema Rh).

Esta tecnología y otras modificaciones introducidas subsecuentemente permitirían la producción ilimitada de anticuerpos de singulares especificidades, estos podían prepararse con la eliminación de variabilidades de lote a lote. En todas las disciplinas en las que se utilizan los anticuerpos como rutina y/o investigación, la introducción de la producción de monoclonales in vitro modificaron las prácticas de trabajo y los conceptos teóricos.

Los AcMo, a diferencia de los policlonales, son homogéneos ya que son producidos por una célula plasmática proveniente de un clon de células B, su homogeneidad se manifiesta en la naturaleza de los anticuerpos sintetizados, los cuales están dirigidos contra un epítope de la molécula de antígeno y reaccionan con un grado de afinidad determinado.

La aplicación de la tecnología monoclonal desarrollada por Köhler y Milstein a los anticuerpos de grupos sanguíneos, ha devenido en la generación de miles de AcMo dirigidos contra muchos antígenos eritrocitarios, en la actualidad se producen AcMo hemoclasificadores por la tecnología del hibridoma, a partir de sustancias específicas de grupo obtenidas por síntesis química o de los eritrocitos correspondientes, sólo algunos de estos reactivos han mostrado ser mejores que los reactivos convencionales por su excelente especificidad, estabilidad y efectividad de costo.

Los reactivos que detectan los antígenos del sistema ABO son los más ampliamente usados, por ello no sorprende que hayan sido los primeros en producirse por esta tecnología. Algunos reactivos monoclonales anti-A reaccionan fuertemente con el fenotipo Ax, y con otros subgrupos de A de la misma manera que con A1 y A2, estos subgrupos no siempre son detectados con el uso de anti-A policlonal humano. Otros reactivos monoclonales anti-A no producen una aglutinación rápida y completa de células A1 y A2, lo que hace necesaria la utilización del reactivo en forma de mezclas de al menos dos AcMo de la clase IgM, uno que permita detectar con relativa facilidad subgrupos de A y otro que asegure una reacción con avidez de células A1 y A2.

Se han desarrollado muchos AcMo contra el antígeno D, tanto de la clase IgG como de la IgM, la generación de estos reactivos monoclonales ha contribuido significativamente, al estudio de los eritrocitos con antígenos D parciales de personas RhD positivas que pueden aloimmunizarse y producir anti-D.

El reactivo hemoclasificador monoclonal como producto terminado, debe cumplir los requisitos generales del control de calidad descritos para los hemoclasificadores policlonales, también debe cumplir con los requisitos de potencia, avidez, especificidad, reproducibilidad, y el efecto de prozona para el hemoclasificador anti-D, en este último al evaluar la especificidad se investiga además la reacción con eritrocitos de las categorías D^{IV}, D^V y D^{VI}.

Estos reactivos, como cualquier otro producto, no están exentos de beneficios y riesgos, ventajas y desventajas, ellas son:

- Ventajas

- a. No se producen reacciones positivas indeseadas debidas a la presencia de anticuerpos contaminantes (Anti-HLA, -LFA, -T), proteínas y virus.
- b. Cada monoclonal es una aglutinina directa, de una sola clase de inmunoglobulina (IgM, IgA o IgG), de una sola especificidad y avides.
- c. Pocos anticuerpos se producen mediante el uso de células B humanas inmortalizadas.
- d. Se dispone de cantidades de anticuerpos ilimitadas.
- e. Se producen reactivos estandarizados con poca variación de lote a lote.
- f. La especificidad de un único epítotope puede revelar nueva información acerca de los antígenos de grupos sanguíneos.
- g. Se desarrollan reactivos altamente confiables aún cuando el AcMo posee una pequeña diferencia de especificidad.
- h. Se puede hacer una selección de los anticuerpos a priori por su potencia, avides y especificidad.
- i. La concentración de anticuerpos es la única fuente de variabilidad y esta puede medirse mediante diferentes métodos estandarizados (ELISA, Citometría, etc.).
- j. La calidad del material crudo se puede certificar farmacéuticamente.
- k. El control de calidad es simple, así como, la ejecución de los ensayos en los que esté involucrado.
- l. No se necesita inmunizar y realizar plasmaféresis a donantes humanos.
- m. En Inmunohematología la producción de AcMo permitirá el desarrollo de nuevas generaciones de ensayos.

- Desventajas

- a. La especificidad de un único epítotope puede ser restrictiva para el tipaje, este problema en ocasiones puede resolverse con el uso de mezclas de AcMo.
- b. Algunos AcMo pueden fallar al aglutinar eritrocitos.

- c. Algunos AcMo pueden ser dependientes de la técnica (pH, temperatura, etc.).
- d. Algunos AcMo pueden tener reacción cruzada (define los epítopes compartidos de diferentes antígenos).
- e. El uso de sobrenadante de cultivo o fluido ascítico pueden resultar en aparentes diferencias de especificidad.
- f. Debido a los dos aspectos antes mencionados algunos AcMo no son apropiados para los ensayos de adsorción-elución.

El desarrollo de métodos para la producción y obtención de AcMo humanos y murinos han permitido resolver, al menos parcialmente, los problemas del suplemento de plasmas ricos en anticuerpos y han mejorado la calidad y la estandarización de los reactivos usados en Inmunoematología.

Las hibridomas y AcMo no se utilizan únicamente para la producción de reactivos hemoclasificadores, ellos se aplican también en la identificación de marcadores fenotípicos únicos de tipos celulares particulares, en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas y sistémicas, en el diagnóstico y terapia tumoral, en el control del rechazo de trasplante y en el control funcional de moléculas de superficie celular y secretadas.

Reactivos antiglobulínicos humano

Para 1945, Coombs, Mourant y Race describieron una prueba para detectar anticuerpos Rh no aglutinantes en suero, posteriormente se utilizó la misma prueba para demostrar recubrimiento de anticuerpos y componentes del complemento sobre el hematíe in vivo. Esta prueba se conoce en la actualidad como prueba de antiglobulina o sencillamente prueba de Coombs en honor al investigador, la misma impulsó el desarrollo de la Inmunoematología y ciencias afines, y permitió el descubrimiento de varios sistemas de grupos sanguíneos.

El reactivo antiglobulínico humano o suero de Coombs, se obtiene al inmunizar animales con globulinas del suero humano, estas pueden ser inmunoglobulinas purificadas (IgG, IgM, IgA) y/o fracciones de complemento (C3b, C3d), produciéndose antiproteínas humanas en el suero animal, las que se purifican tras adsorción con eritrocitos humanos lavados que eliminan las aglutininas no deseadas.

Con este reactivo se demuestran anticuerpos eritrocitarios y/o complemento recubriendo hematíes in vivo, a esta prueba se le conoce como prueba de antiglobulina directa (PAD) o Coombs directo. Con la utilización de un panel eritrocitario se realiza la prueba de antiglobulina indirecta (PAI) o Coombs indirecto, al demostrar la presencia de anticuerpos libres en suero mediante la reacción antígeno-anticuerpo in vitro.

Los sueros antiglobulínicos se obtienen de forma policlonal y mediante la tecnología de hibridomas, ambos pueden ser poliespecíficos o monoespecíficos, los primeros contienen anticuerpos anti-inmunoglobulinas y anti-complemento, los segundos pueden ser monoespecíficos Anti-IgG, Anti-IgA, o Anti-IgM si no tienen actividad anti-complemento, o monoespecíficos Anti-C3d si no tienen actividad anti-inmunoglobulina.

El reactivo de Coombs en su evaluación como diagnosticador, debe cumplir los requisitos generales descritos para los hemoclasificadores policlonales y con los requisitos de potencia, especificidad y reproducibilidad. Para el control de calidad los sueros antiglobulínicos se dividen en tres grupos, el grupo I está compuesto por los sueros antiglobulínicos poliespecíficos (anti-IgG, -C3 y en ocasiones -IgA), el grupo II lo integra el suero anti-IgG y el grupo III el suero anti-complemento (anti-C3).

Para la prueba de potencia de los reactivos de los grupos I y II deben utilizarse sueros anti-D y anti-Fya (clase IgG) de título 16 a 64 en la PAI. Los sueros de estos dos grupos y sus diluciones 1:2 y 1:4 deben aglutinar eritrocitos de grupo RhD positivos, Fy(a+b+) sensibilizados con la dilución 1:16, 1:32 o 1:64 (dependerá del título de los anticuerpos usados) de anti-D y anti-Fya. Los reactivos de los grupos I y III deben aglutinar eritrocitos recubiertos con C3b con título no menor que 4 y deben aglutinar eritrocitos recubiertos de C3d con un título no menor que 1 y reacción de 2+ de aglutinación. Los reactivos del grupo I con actividad anti-IgA deben aglutinar eritrocitos recubiertos de IgA con título no menor que 4.

En la prueba de especificidad los reactivos del grupo I no deben aglutinar eritrocitos recubiertos con C4d, los del grupo II no deben aglutinar eritrocitos recubiertos con C3b, C3d, C4d, y los del grupo III no deben aglutinar eritrocitos recubiertos de IgG y C4d. Los sueros antiglobulínicos no deben aglutinar ni hemolizar eritrocitos de los grupos A1, B y O tratados con papaína, tampoco cuando se incuben muestras de estos grupos durante 30 minutos a temperaturas de 4°C, de 20 a 30°C y 37°C.

Los reactivos antiglobulínicos no deben aglutinar ni hemolizar, suspensiones de eritrocitos en salina y en solución de baja fuerza iónica (LISS), provenientes de 2 donantes de cada uno de los grupos A₁, B y O, las muestras deben colectarse del segmento de las unidades de sangre, que estén almacenadas entre 2 y 8°C durante 10 a 15 días. Así mismo no deben reaccionar en la PAI con los eritrocitos referidos anteriormente y el suero de 6 donantes. Los sueros de los donantes deben obtenerse antes de las 24 horas de realizarse el estudio, deben estar libres de anticuerpos irregulares y ser ABO compatibles con las muestras de los eritrocitos colectados.

La reproducibilidad se determina al realizar la PAI y la PAD en al menos 300 muestras de sangre de donantes, 5 muestras de pacientes AHAI y 5 muestras de pacientes con anticuerpos irregulares. Estos ensayos se deben realizar en paralelo con un producto de referencia.

Los reactivos antiglobulínicos junto a los hemoclasificadores monoclonales y policlonales, se aplican en la detección e identificación de anticuerpos, pruebas de compatibilidad, determinación de grupos sanguíneos, diagnóstico de AHAI, estudios de hemólisis inducida por fármacos, estudios de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, investigación de reacciones transfusionales hemolíticas y conformación de paneles celulares.

Albúmina sérica bovina

La albúmina constituye el 60% del total de proteína presentes en el plasma, en ese medio es la proteína de mayor talla (585 aminoácidos), sus funciones en el organismo son el establecimiento de la presión coloidosmótica para regular los volúmenes intra y extracelular, transporta sustancias como hormonas, fármacos, enzimas y toxinas, participa en el secuestro de radicales libres, regula el equilibrio ácido-base y se une a lípidos para formar lipoproteínas.

En Inmunohematología la reacción antígeno-anticuerpo puede medirse in vitro por diferentes técnicas como las pruebas de ELISA, de hemólisis, de inhibición de la aglutinación y de aglutinación, estas últimas son las más utilizadas. En las técnicas de aglutinación, si el anticuerpo que participa en la reacción antígeno-anticuerpo es de la clase IgG (molécula monomérica), necesita el concurso de otros agentes que faciliten su acercamiento al antígeno en los eritrocitos, estos agentes potenciadores de la aglutinación son las enzimas proteolíticas, los reactivos antiglobulínicos humano y la albúmina sérica bovina.

La obtención de albúmina a partir del plasma bovino se realiza, por tres vías, electroforésis, purificación por columna y termocoagulación. En la corrida electroforética se toma la banda de la albúmina, que posteriormente se electroeluye y en la purificación por columna de gel se purifica por peso molecular. Estos dos métodos son caros por ello se prefiere la termocoagulación a temperatura controlada de 70°C, a esta temperatura la albúmina termocoagula con un alto grado de pureza. Para su uso en Inmunohematología la albúmina debe polimerizarse con glutaraldehído, para formar un polímero de alto peso molecular.

La albúmina sérica bovina como producto terminado, debe cumplir los requisitos generales descritos anteriormente. Los requisitos particulares que debe cumplir este tipo de reactivo son: concentración de 200 y 300 g/L para su uso en Inmunohematología, habilidad potenciadora de la reacción de aglutinación, los títulos de anticuerpos anti-D y anti-c obtenidos con la albúmina evaluada deben ser iguales o superiores a los obtenidos con una albúmina de referencia, las reacciones de aglutinación observadas con la albúmina evaluada deben ser iguales o mayores a las obtenidas con la albúmina de referencia y no debe provocar fenómeno de prozona.

En la prueba de falsos positivos la albúmina no debe provocar hemólisis ni fenómenos Rouleaux al ser añadida a eritrocitos de los grupos A1, B y O; no debe presentar proteínas IgG, su ausencia se investiga por técnicas electroforéticas o por ensayos serológicos de inhibición de la reacción de anticuerpos anti-D, con el reactivo antiglobulínico humano poliespecífico; no debe presentar sustancias de grupos sanguíneos como A, B, Lea y Leb, esto se determina al realizar ensayos de inhibición de la aglutinación con eritrocitos y anticuerpos anti- A, -B, -Lea y -Leb; por último no debe presentar sustancias con actividad tipo neuraminidasa capaces de exponer el criptoantígeno T en los eritrocitos.

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1^{ra} Edición

Referencias



Jiménez J. Xataka. [Online].; 2016. Available from: HYPERLINK «<https://www.xataka.com/medicina-y-salud/sangre-de-mi-sangre-karl-landsteiner-y-el-descubrimiento-de-los-grupos-sanguineos>» <https://www.xataka.com/medicina-y-salud/sangre-de-mi-sangre-karl-landsteiner-y-el-descubrimiento-de-los-grupos-sanguineos> .

Méndez D. ResearchGate. [Online].; 2010. Available from: HYPERLINK «https://www.researchgate.net/figure/Figura-10-Antigenos-de-superficie-de-eritrocitos-y-grupos-sanguineos-La-figura_fig1_279461489» https://www.researchgate.net/figure/Figura-10-Antigenos-de-superficie-de-eritrocitos-y-grupos-sanguineos-La-figura_fig1_279461489 .

Torres A., Navarro B. Eritrocitos; 2023.

Torres A. Kenhub. [Online].; 2023. Available from: HYPERLINK «<https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es/eritrocitos>» <https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es/eritrocitos> .

Piedras J. AccessMedicina. [Online].; 2016. Available from: HYPERLINK «<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1858§ionid=134364550>» <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1858§ionid=134364550> .

Cortés A., León G., Muñoz M., Jaramillo S. Aplicaciones y prácticas de la medicina transfusional Tomo I. Colombia: Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional; 2012.

Bencomo A., Alfonso Y., Alfonso M., González R., Fernández J., Ballester A. Frecuencia de los grupos sanguíneos A1, A2, Aint, Ael, B y O en donantes de sangre. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 1997; 13(2): p. 124-131.

American Association of Blood Banks. Manual Técnico. 12th ed. Buenos Aires: Edigraf; 1997.

Universidad Autónoma del Estado de Morales (UAEM). Grupos sanguíneos; 2015.

Cisnero N. Incidencia de Enfermedad Hemolítica Perinatal en los Hospitales Bertha Calderón y Fernando Vélez Paiz Managua. Enero-diciembre del 2007 Managua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN); 2008.

Dávila M. Manual de Guías de Laboratorio - Inmunohematología Básica Managua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN); 2013.

Torres-Alarcón C., García-Ruiz A., Cañete-Ibáñez C., Morales-Pogoda I., Muñoz-Arce C., Cid-Domínguez B, et al. Antígenos del Sistema sanguíneo ABO como factor de riesgo para la gravedad de la infección por SARS-CoV-2. *Gaceta Médica de México*. 2021; 157: p. 181-187.

Copoo L. Grupos Sanguíneos Argentina: Universidad Nacional del Noreste; 2003.

Pareras J. Laboratorio clínico. [Online]; 2015. Available from: HYPERLINK «[http://gsdl.bvs.sld.cu/cgi-bin/library?e=d-00000-00---off-0preclini--00-0----0-10-0---0---0direct-10---4-----0-1l--11-mi-50---20-about---00-0-1-00-0-0-11-1-0gbk00&a=d&c=preclini&cl=CL1&d=HASH092e43c34fe527df7c1340.9.11.1.9.8](http://gsdl.bvs.sld.cu/cgi-bin/library?e=d-00000-00---off-0preclini--00-0----0-10-0---0---%20direct-10---4-----0-1l--11-mi-50---20-about---00-0-1-00-0-0-11-1-0gbk00&a=d&c=preclini&cl=CL1&d=HASH092e43c34fe527df7c1340.9.11.1.9.8)» <http://gsdl.bvs.sld.cu/cgi-bin/library?e=d-00000-00---off-0preclini--00-0----0-10-0---0---0direct-10---4-----0-1l--11-mi-50---20-about---00-0-1-00-0-0-11-1-0gbk00&a=d&c=preclini&cl=CL1&d=HASH092e43c34fe527df7c1340.9.11.1.9.8>.

González J. Grupos sanguíneos y enfermedad. *Medicina Clínica*. 2005; 125(10): p. 382-388.

Vázquez M., Castillo D., Pavez Y., Maldonado M., Mena A. Frecuencia de antígenos del Sistema Sanguíneo Rh y del Sistema Kell en donantes de sangre. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2015.

Roback J., Grossman B., Harris T., Hillyer C. Manual técnico. 17th ed. Argentina: American Association of Blood Banks; 2012.

Baptista H. El sistema Rh, una mirada a fondo. *Revista Médica del IMSS*. 2005; 43: p. 2-3.

Cruz C., Alcívar W. Reducción de las complicaciones transfusionales inmediatas y tardías mediante la aplicación del sistema de hemovigilancia a pacientes atendidos por el servicio de Medicina Transfusional del Hospital Provincial General Docente de Riobamba (Enero a julio 2014). 2016.

Peralta Z., Estrada C., González Y. Importancia de anticuerpos irregulares en Medicina Transfusional.; 2015.

Cruz J. Caracterización genotípica del gen RHCE México: Instituto Politécnico Nacional.

Hernández P., Bencomo A., Rivero R. Variantes fenotípicas y moleculares del antígeno RhD. *Revista Argentina de Transfusión*. 2000; XXVI(2): p. 131-142.

Wilkinson SL. The Kell Blood Group System. IN: *Textbook of Blood Banking*

and Transfusion Medicine. 1st ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1995.

Ulloa A. Análisis retrospectivo de la frecuencia y tipo de anticuerpos irregulares en donantes voluntarios de sangre en el Hemocentro de la Cruzada Roja Ecuatoriana, Quito 2009-2012 Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2013.

Chargoy E., Azcona M., Ramírez R. Prevalencia del antígeno Kell (K +) en muestras obtenidas en un banco de sangre. Revista de hematología. 2016.

Cortés A., Muñiz-Díaz E., León G. Inmunohematología básica y aplicada Santiago de Cali: GCIAMT; 2014.

Valdés A., Hernández Y., Hernández B., Antoni O. Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 2001 mayo-ago; 17(2).

Bautista J., Arévalo C., Castillo R. Taller de inmunohematología. Revista Mexicana de Medicina Transfusional. 2014 enero - abril; 7(1).

Alfonso Y., Bencomo A. Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 2001 mayo-ago; 17(2).

Cheng MS. Delayed reaction following ABO-incompatible transfusion (letter).: Transfusion; 1995.

Brecher ME. Technical manual. Fourteenth edition ed. Banks AAOB, editor. Maryland: Bethesda; 2003.

Banks AA. Manual Técnico Maryland: Bethesda; 2007.

Hernández D., Cabiedes J. Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes.; 2009.

INMUNOHEMATOLOGÍA E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

1^{ra} Edición



Publicado en Ecuador
Julio 2023

Edición realizada desde el mes de febrero del 2023 hasta junio del año 2023, en los talleres Editoriales de MAWIL publicaciones impresas y digitales de la ciudad de Quito.

Quito – Ecuador

Tiraje 30, Ejemplares, A5, 4 colores; Offset MBO
Tipografía: Helvetica LT Std; Bebas Neue; Times New Roman.
Portada: Collage de figuras representadas y citadas en el libro.