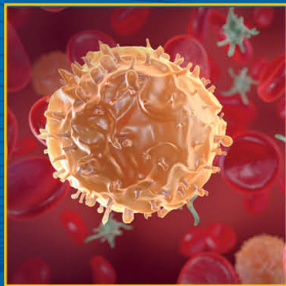


Inmunohematología básica y aplicada

1^{ra} EDICIÓN



Armando Cortés Buelvas
Eduardo Muñiz-Díaz
Graciela León de González

GCIAMT

Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional



INMUNOHEMATOLOGÍA BÁSICA Y APLICADA

Inmunohematología básica y aplicada Primera edición

ARMANDO CORTÉS BUELVAS, MD

Especialista en Anatomía Patológica y Patología Clínica. Profesor titular y Jefe del Departamento de Patología de la Universidad del Valle. Director del Hemocentro del Valle del Cauca. Director del Servicio de Transfusión del Hospital Universitario del Valle. Cali, Colombia.

EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ, MD

Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España.

GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ, MD

Médico especialista en Hematología. Jefe del Banco de Sangre del Instituto Diagnóstico, Caracas. Médico Consultivo del Banco Municipal de Sangre del DC, Caracas, Venezuela.

GCIAMT

Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional



Santiago de Cali, Colombia, marzo de 2014

Inmunoematología básica y aplicada / autor, editor y compilador ...
Armando Cortés Buelvas ... [et al.]. -- Cali : Feriva, 2014.
512 p. : il. fotos ; 28 cm.
ISBN: 978-958-46-4106-9
1. Hematología 2. Inmunoematología 3. Transfusión de sangre
4. Sangre - Análisis I. Cortés Buelvas, Armando.
616.15 cd 21ed.
A1436594

CEP-Banco de la República-Biblioteca Luis Ángel Arango



INMUNOHEMATOLOGÍA BÁSICA Y APLICADA
Primera edición

© Armando Cortés Buelvas

ISBN: 978-958-46-4106-9

Director del libro y compilador:

Armando Cortés Buelvas

Coordinación editorial:

Eduardo Muñoz-Díaz
Graciela León de González

Diagramación:

Departamento de Arte y Diseño de Feriva

Impreso en los talleres gráficos

de Impresora Feriva S.A.

Calle 18 No. 3-33

PBX: 524 9009

Feriva@feriva.com

www.feriva.com

Cali, Colombia

Comité Directivo GCIAMT

Presidente: Dra. Graciela León de González

Vicepresidenta: Dra. Paula Castellanos

Secretaria General: Dra. Nelly Vásquez de Martínez

Tesorero: Dr. Alejandro Chiera

Vocal 1: Dr. Oscar Walter Torres

Vocal 2: Dra. Anna Bárbara Carneiro Proietti

Vocal 3: Dr. Salvador Oyonarte

Vocal 4: Dra. Amalia Bravo

Vocal 5: Dra. Ina Pérez

Vocal 6: Dr. Armando Cortés Buelvas

Vocal 7: Dra. María Dolores Pérez-Rosales,
representante de la OPS.

Vocal suplente: Dra. Adela Zelaya

Revisor de cuentas: Dr. Jorge Curbelo

Suplente: Dra. Regina Bolaños

La mención de productos o equipos específicos por los colaboradores de esta publicación no representa un aval del GCIAMT, ni indica preferencias por esos productos sobre otros productos similares.

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra, por cualquier medio sin autorización escrita del editor.

Comité Científico

- Armando Cortés Buelvas, MD** *Especialista en Anatomía Patológica y Patología Clínica. Profesor titular y Jefe del Departamento de Patología de la Universidad del Valle. Director del Hemocentro del Valle del Cauca. Director del Servicio de Transfusión del Hospital Universitario del Valle. Cali, Colombia.*
- Eduardo Muñoz-Díaz, MD** *Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España.*
- Graciela León de González, MD** *Hematóloga. Jefe del Banco de Sangre del Instituto Diagnóstico. Médico consultivo del Banco Municipal del Distrito Capital. Colaboradora docente del posgrado de Hematología de la Universidad Central de Venezuela. Coordinadora del Programa de Educación Continuada en Medicina Transfusional de la Sociedad Venezolana de Hematología. Caracas, Venezuela.*
- Marcela Contreras, MD FRCPATH,
FRCP, FMedSci, DBE** *Chairman of Blood Transfusion International. Londres, Reino Unido.*
- Carmen Martín Vega, MD** *Médico especialista en Hematología y Hemoterapia. Doctor en Medicina y Cirugía. Exjefe de Servicio del Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España.*
- Oscar Walter Torres, MD** *Jefe de Unidad de Hemoterapia. Hospital Materno-Infantil Ramón Sardá. Esteban de Luca 2151. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.*

Autores y coautores de capítulos

Álvarez Do Barrio Manuel. Especialista en Análisis clínicos; Servicio de Tipificación Celular Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. alvarez_man@gva.es

Arroyo Rodríguez José Luis. Médico Especialista en Hematología y Hemoterapia. Doctor en Medicina y Cirugía. Director del Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria, España. director@bscan.org

Barbolla García Luz. Médico Especialista en Hematología y Hemoterapia. Doctora en Medicina y Cirugía. Directora Gerente del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid, España. lbarbolla.trans@salud.madrid.org

Bernardez Amparo. Técnico especialista de laboratorio. Diplomada universitaria en enfermería. Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana. España. ampa_bv@hotmail.es

Callao Molina Virginia. Médico especialista en Hematología y Hemoterapia. Doctora en Medicina y Cirugía. Jefe de sección Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. callao_vir@gva.es

Canals Surís Carmen. Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. ccanals@bst.cat

Cardoso Regina. Biomédica. Máster en Biotecnología Médica, especialista en Inmunohematología. Responsable por el Laboratorio de Inmunohematología del Banco de Sangre del Hospital Sírio Libanês en São Paulo - Brasil. Consultora y Asesora Científica para Inmunohematología. Docente Coordinadora del Curso de posgrado en Hemoterapia de la escuela SENAC en São Paulo, Brasil. rcardoso@uol.com.br

Cotorruelo Carlos. Profesor asociado. Área Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Investigador adjunto. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina. ccotorru@fbioyf.unr.edu.ar

Contreras Marcela, MD, FRCPath, FRCP, FMedSci, DBE. Chairman of Blood Transfusion International. Londres, Reino Unido. prof.mcontreras@gmail.com

Cortés Buelvas Armando, MD. Especialista en Anatomía Patológica y Patología Clínica. Profesor titular y Jefe del Departamento de Patología de la Universidad del Valle. Director del Hemocentro del Valle del Cauca. Director del Servicio de Transfusión del Hospital Universitario del Valle. Cali, Colombia. acortes59@gmail.com

De la Vega Elena Carlos Daniel, PhD. Responsable del Laboratorio de Inmunoematología. Servicio de Hematología y Medicina Transfusional. Hospital Italiano Garibaldi (STEM SRL). Co-Director de la Carrera de Especialización en Hematología. Instituto Universitario Italiano de Rosario, Rosario. Argentina. daniel.delavega@yahoo.com

Dos Santos José Alisson. Psicólogo Clínico por la Universidad FUMEC-MG-Brasil. Inmuno-hematólogo por la Sociedad Brasileira de Hematología y Hemoterapia. Especialización en el Instituto Nacional de Transfusión Sanguínea (INTS) y Centro Nacional de Transfusión Sanguínea (CNTS-Hospital Saint Antoine), París, Francia. Consultor de Inmunoematología. Director de la empresa Scan Diagnóstica Ltda, Brasil. jalisson@uol.com.br

Fuenmayor Jaheli. Laboratorio de Patología Celular y Molecular. Centro de Medicina Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela. jfuenmay@ivic.gob.ve

Leão Silvia Bonifacio. Bióloga. Especialista en Análisis Clínico e Inmunoematología. Responsable por el Departamento de Control de Calidad del Laboratorio de Inmunoematología Clínica de la Fundación Pró-Sangue/Hemocentro en São Paulo, Brasil. Coordinadora Técnica de la Agencia Transfusional del Instituto del Cáncer del Estado de São Paulo. Brasil. Consultora y asesora científica para Inmunoematología, Brasil. bonifaciosilvia@ig.com.br

León de González Graciela. Médico especialista en Hematología. Jefe del Banco de Sangre del Instituto Diagnóstico, Caracas. Médico Consultivo del Banco Municipal de Sangre del DC, Caracas, Venezuela.

gracieleon@gmail.com

Llanes Ribes Vicente. Diplomado en Enfermería. Servicio de Tipificación Celular Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España.

llanes_vicrib@gva.es

Martín Vega Carmen. Médico especialista en Hematología y Hemoterapia. Doctor en Medicina y Cirugía. Exjefe de Servicio del Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España.

cmartinvega@telefonica.net

Martínez Reig Francisco. Diplomado en Enfermería. Servicio de Tipificación Celular. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España.

martinez_frarei@gva.es

Más Castaño Luisa. Técnico especialista de laboratorio. Laboratorio de Inmunoematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. luisamascastanyo@gmail.com

Montaño Ramón E., MSc, PhSc en Inmunología. Investigador asociado en el Laboratorio de Patología Celular y Molecular. Centro de Medicina Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. rmontano@ivic.gob.ve

Montero Rosa. Diplomada en Enfermería. Coordinadora del Laboratorio de Inmunoematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. rmontero@bst.cat

Montoro Alberola José. Especialista en Hematología-Hemoterapia. Jefe del Servicio Tipificación Celular Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. montoro_jos@gva.es

Muñiz-Díaz Eduardo. Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. emuniz@bst.cat

Navarrete Cristina, PhD, FRCPath. Directora Nacional de los Servicios de Histocompatibilidad e Inmunogenética, National Health Service Blood and Transplant, Inglaterra Profesora asociada en Inmunología, División de Infecciones e Inmunidad, University College London. Londres, Reino Unido. Cristina.Navarrete@nhsbt.nhs.uk

Nogués Núria. Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. nnogues@bst.cat

Ortiz Murillo Pilar. Directora técnica. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. portiz@bst.cat

Oyonarte Salvador, MD, PhD. Director Centro de Transfusión Sanguínea de Sevilla, España. soyonarte@aehh.org

Perón Ana Claudia. Bióloga. Especialista en Inmunohematología. Consultora y asesora científica para Inmunohematología. MBA en Marketing. Gerente de productos para la línea de inmunohematología en la empresa Bio-Rad/Brasil, Brasil. clauperon@hotmail.com

Pinacho Oyarzábal Asunción. Especialista en Hematología. Servicio de

Transfusión. Banc de Sang i Teixits Lleida. Barcelona, España.

apinacho@bst.cat

Planelles Silvestre Dolores. Doctora en Biología por la Universidad de Valencia. Servicio de Tipificación Celular Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España.

planelles_dol@gva.es

Plasencia Forner Isabel. Diplomada universitaria en Enfermería. Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. callao_vir@gva.es

Puig Alcaraz Nieves. Especialista en Hematología-Hemoterapia. Doctora en Medicina por la Universidad de Valencia. Jefe de Sección del Servicio de Tipificación Celular Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana. Valencia, España. puig_nie@gva.es

Riol Rodríguez Casi. Diplomada universitaria en Enfermería. Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. cruzriol@hotmail.com

Roig Oltra Roberto. Especialista en Hematología-Hemoterapia. Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia. Director del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. roig_rob@gva.es

Téllez Paz Daniel Alberto. Bacteriólogo y Laboratorista Clínico. Máster en Medicina Transfusional y Terapia Celular y Tisular. Especialista en Inmunohematología y asesor científico de Biocientífica Ltda. Bogotá, D.C. Colombia. datep100@hotmail.com

Terrón Sáez Isabel. Técnico especialista de laboratorio. Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. isabeleta.terror@hotmail.com

Torres Oscar Walter. Jefe de Unidad de Hemoterapia. Hospital Materno-Infantil Ramón Sardá. Esteban de Luca 2151. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. owtorres@gmail.com



Agradecimiento a Biocientífica Ltda. (Colombia) por su contribución a la educación con la financiación para la impresión de esta obra.

Contenido

Pág.	
xv	Prólogo
1	SECCIÓN I Inmunoematología de glóbulos rojos
3	CAPÍTULO 1 Conceptos fundamentales del sistema inmune <i>José Alisson dos Santos</i>
39	CAPÍTULO 2 La prueba de la antiglobulina (test de Coombs) <i>Virginia Callao Molina, Luisa Más Castaño, Isabel Terrón Sáez</i>
55	CAPÍTULO 3 Principios de la genética aplicada a la Inmunoematología <i>Carlos Cotorruelo, Núria Nogués</i>
85	CAPÍTULO 4 Nomenclatura y clasificación de los grupos sanguíneos eritrocitarios. Grupos ABO, H, Lewis y antígenos relacionados <i>Eduardo Muñiz-Díaz, Núria Nogués, Rosa Montero, Carmen Canals Surís</i>
103	CAPÍTULO 5 Sistema Rh <i>Eduardo Muñiz-Díaz, Carlos Cotorruelo, Núria Nogués</i>
137	CAPÍTULO 6 Otros sistemas de grupos sanguíneos y otros antígenos no incluidos en sistemas <i>Eduardo Muñiz-Díaz, Núria Nogués, Rosa Montero, Carmen Canals Surís</i>
157	CAPÍTULO 7 Anticuerpos eritrocitarios y su significado clínico <i>Marcela Contreras</i>
173	CAPÍTULO 8 Pruebas pretransfusionales <i>Graciela León de González</i>
195	CAPÍTULO 9 Transfusión de sangre de fenotipo compatible. Indicaciones actuales <i>Eduardo Muñiz-Díaz, Asunción Pinacho Oyarzábal, Pilar Ortiz Murillo</i>

Pág.	
211	SECCIÓN II Inmunoematología de plaquetas
213	CAPÍTULO 10 Antígenos y anticuerpos de las plaquetas Técnicas de estudio e importancia clínica <i>Carlos Daniel De la Vega Elena, Eduardo Muñiz-Díaz</i>
233	SECCIÓN III Inmunoematología de leucocitos
235	CAPÍTULO 11 El sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos o Human Leucocyte Antigens (HLA) <i>Cristina Navarrete</i>
251	CAPÍTULO 12 Antígenos y anticuerpos de los leucocitos. Técnicas de estudio e importancia clínica <i>Carlos Daniel De la Vega Elena, Eduardo Muñiz-Díaz</i>
271	SECCIÓN IV Inmunoematología en la práctica y el diagnóstico de los procesos
273	CAPÍTULO 13 Anemia hemolítica autoinmune <i>Eduardo Muñiz-Díaz, Carmen Canals Surís</i>
293	CAPÍTULO 14 Anemia hemolítica inmune inducida por fármacos <i>Carmen Martín Vega</i>
305	CAPÍTULO 15 Reacciones hemolíticas transfusionales <i>Armando Cortés Buelvas</i>
323	CAPÍTULO 16 Importancia clínica del sistema HLA en la transfusión y el trasplante <i>Cristina Navarrete</i>
341	CAPÍTULO 17 Reacciones alérgicas asociadas a transfusión <i>Armando Cortés Buelvas</i>
353	CAPÍTULO 18 Púrpura postransfusional (PPT) <i>Carmen Canals Surís, Eduardo Muñiz-Díaz</i>

Pág.	
361	CAPÍTULO 19 Complicaciones inmuno hematológicas del trasplante de células madre hematopoyéticas <i>José Luis Arroyo Rodríguez, Luz Barbolla García</i>
371	CAPÍTULO 20 Breve historia de la enfermedad hemolítica del recién nacido <i>Carmen Martín Vega</i>
377	CAPÍTULO 21 Enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad Rh: Profilaxis con gammaglobulina anti-D <i>Ramón F. Montaña, Jaheli Fuenmayor, Oscar Walter Torres</i>
399	CAPÍTULO 22 Control inmuno hematológico de la gestante <i>Eduardo Muñiz-Díaz</i>
413	CAPÍTULO 23 Conducta en el diagnóstico y seguimiento de gestantes isoinmunizadas <i>Salvador Oyonarte</i>
431	CAPÍTULO 24 Enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido Pruebas inmuno hematológicas en el posparto <i>Virginia Callao Molina, Isabel Plasencia Forner, Amparo Bernardez, Casi Riol Rodríguez</i>
447	CAPÍTULO 25 Contribución de las técnicas moleculares a la EHFRN <i>Núria Nogués, Carlos Cotorruelo</i>
453	CAPÍTULO 26 Trombocitopenia fetal neonatal aloinmune <i>Carmen Canals Surís, Eduardo Muñiz-Díaz</i>
467	CAPÍTULO 27 Neutropenias neonatales aloinmunes (NNA) <i>Nieves Puig Alcaraz, Francisco Martínez Reig, Vicente Llanes Ribes, Dolores Planelles Silvestre, Manuel Álvarez Do Barrio, José Montoro Alberola, Roberto Roig Oltra</i>
477	SECCIÓN V Calidad en el laboratorio de inmuno hematología
479	CAPÍTULO 28 Control de la calidad en el laboratorio de inmuno hematología <i>Ana Claudia Perón, Daniel Alberto Téllez Paz, Regina Cardoso, Silvia Bonifacio Leño</i>

Prólogo

Agradezco al doctor Armando Cortés, editor principal, por haberme seleccionado para hacer el prólogo de este nuevo libro, fruto de una extraordinaria iniciativa y esfuerzo de destacados científicos miembros del Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional, cuya principal meta es cumplir con los fines establecidos en el Capítulo II de los Estatutos.

La Inmunohematología muestra en este momento un extraordinario dinamismo y son muchos los progresos registrados en los últimos años. Cabe destacar el aumento en el uso de las técnicas en biología molecular, el incremento y refinamiento de técnicas de cinética celular, el avance en los nuevos protocolos de trasplante. La hemovigilancia ha mejorado globalmente, la inactivación de patógenos y las técnicas de aféresis se han refinado y la terapia génica y de medicina regenerativa nos impactan constantemente. De ahí la importancia del libro que estamos presentando.

Este nuevo texto es la segunda publicación en un corto tiempo, que complementa la anterior en la cobertura del inmenso campo que comprende la Medicina Transfusional.

Bajo el título de *Inmunohematología Básica y Aplicada* se ha seleccionado una serie de temas de gran actualidad, distribuidos en capítulos documentados –cada uno con una amplia y actualizada bibliografía– que abarcan parte de la Inmunohematología, ciencia que también se incluye en el área de Medicina Transfusional. El libro es un texto de estudio y consulta cuya finalidad es ofrecer al lector una rica fuente de información actualizada sobre el campo de la Inmunohematología diagnóstica y terapéutica. Es fundamental para aquellos clínicos cuya primera responsabilidad es el manejo de pacientes con problemas inmunohe-

matológicos y especialmente si requieren transfusiones; de igual forma para patólogos clínicos, hematólogos, personal técnico responsable del manejo del banco de sangre y, por supuesto, de la mayor utilidad para estudiantes de medicina. Sin embargo, su fin no fue hacer una revisión enciclopédica, por lo cual en algunos capítulos el interesado debe acudir a fuentes más especializadas.

El temario comprende 28 capítulos distribuido en 5 secciones, que se resumen en la siguiente forma:

Sección I: En gran parte dedicada a la actualización de nuevos aspectos y conceptos del sistema inmune y de la genética aplicada en este campo, pasando a la revisión de la nomenclatura y clasificación de los sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios, con especial atención a los sistemas ABH-Lewis, Rh, así como otros sistemas y grupos sanguíneos. La sección continúa con la importancia de los anticuerpos eritrocitarios, su significado clínico y las pruebas pretransfusionales. Termina con las indicaciones actuales para la transfusión de sangre con fenotipo compatible.

Sección II: Dedicada a las plaquetas, se revisan la importancia en clínica del estudio de antígenos y anticuerpos antiplaquetarios y las técnicas usadas.

Sección III: Aquí se define el Sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA), antígenos y anticuerpos anti-leucocitarios y los métodos de estudio.

Sección IV: Se ha definido como la Inmunohematología en la práctica y el diagnóstico de los procesos inmunes con especial referencia a la anemia hemolítica autoinmune y a la anemia autoinmune inducida por drogas; las reacciones postransfusionales hemolíticas, alérgicas y anafilácticas; la importancia clínica del sistema HLA en la transfusión y el trasplante. También se analiza el cuadro de la trombocitopenia fetal aloinmune, las complicaciones inmunohematológicas del trasplante de células madre hematopoyéticas, así como la neutropenia neonatal aloinmune.

Los temas contenidos en los capítulos 20 al 25 se refieren a una excelente actualización de la enfermedad hemolítica del recién nacido secundaria a la incompatibilidad Rh. Abarca desde la fascinante historia de este proceso, su pro-

filaxis, el control inmunohematológico de las gestantes, la conducta en el diagnóstico y el seguimiento de las gestantes isoinmunizadas, el manejo clínico y de laboratorio del feto y del recién nacido afectado y por último, la contribución de las técnicas moleculares en el estudio del feto y del neonato afectados.

Sección V: Control de la calidad en el laboratorio de inmunohematología.

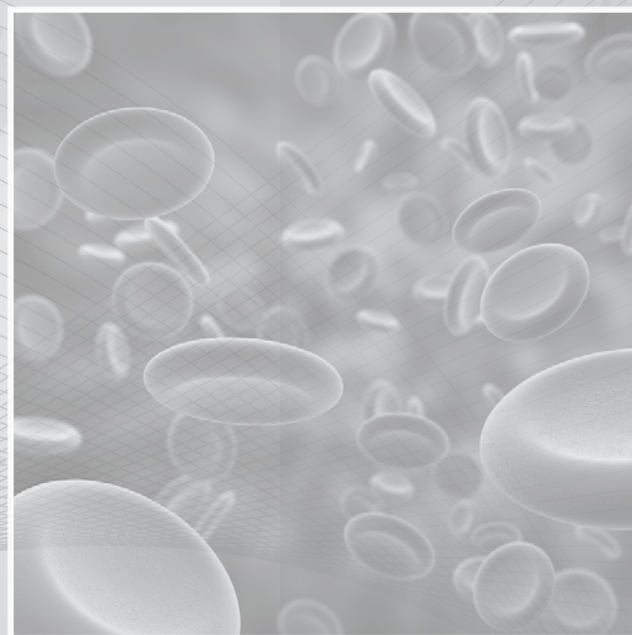
Para terminar, siento que sería descortés no reconocer el extraordinario trabajo del grupo de colegas que han dedicado su valioso tiempo al estudio y actualización de cada tema, cuya meta es contribuir de manera efectiva en el progreso científico de cada miembro del GCIAMT. Pero además, quiero expresarle mi especial admiración y agradecimiento al doctor Eduardo Muñiz-Díaz, quien apoyado por todos sus colaboradores inmediatos ha contribuido sustancialmente con los contenidos del libro. También deseo hacer llegar mis palabras de agradecimiento al doctor Armando Cortés, no solo por su colaboración como coautor, sino en la etapa de edición del libro.

Jesús Linares

Miembro fundador, expresidente y miembro honorario
del Grupo Cooperativo Iberoamericano
de Medicina Transfusional - GCIAMT

Inmunohematología
básica y aplicada

SECCIÓN I



Inmunohematología
de glóbulos rojos

Conceptos fundamentales del sistema inmune

JOSÉ ALISSON DOS SANTOS *

Introducción

La primera línea de defensa de nuestro organismo es mecánica, y está representada por la piel y las membranas mucosas que revisten el tracto digestivo y respiratorio. La mayoría de los microorganismos son destruidos antes de que consigan invadir los tejidos del cuerpo. Estas superficies de defensa, aunque eficaces, son eventualmente lesionadas, lo que permite la penetración de patógenos u otros elementos extraños en el organismo. A partir de entonces, se desarrolla una respuesta inmune en función del tipo de agente invasor.

Los diferentes tipos de respuestas inmunitarias se pueden clasificar en

* *Psicólogo Clínico por la Universidad FUMEC-MG-Brasil. Inmunohematólogo por la Sociedad Brasileira de Hematología y Hemoterapia. Especialización en el Instituto Nacional de Transfusión Sanguínea (INTS) y Centro Nacional de Transfusión Sanguínea (CNTS-Hospital Saint Antoine), París, Francia. Consultor de Inmunohematología. Director de la empresa Scan Diagnóstica Ltda, Brasil. jalisson@uol.com.br*

dos categorías: la respuesta inmune innata (no adaptativa) y la respuesta inmune adaptativa. En los vertebrados, los sistemas inmunes innato y adaptativo se comunican y actúan en reciprocidad, de modo que las células y moléculas del sistema inmune innato, mientras brindan protección inmediata al organismo activan el sistema inmune adaptativo, que a su vez refuerza los mecanismos innatos de defensa.

Inmunidad innata (no adaptativa)

Tres tipos básicos de leucocitos son capaces de unirse a los agentes invasores dentro de los tejidos y destruirlos por diferentes mecanismos. Estos son los macrófagos, las células dendríticas, los neutrófilos polimorfonucleares y las células asesinas naturales (NK = natural killer).

Los macrófagos circulan en los fluidos extracelulares y son derivados de monocitos que salen de la circulación y se diferencian en los diversos tejidos. Así, los macrófagos del hígado, denominados células de Kupffer, y los del bazo tienen la misma función de eliminar los restos de células viejas, como los glóbulos rojos.

Los macrófagos que fagocitan y digieren microorganismos y células tumorales pueden dividirse y sobrevivir por meses en el tejido conjuntivo del órgano. Después de la ingestión de material extraño al organismo, secretan citoquinas que atraen las células del sistema inmune a los sitios de inflamación. También son células muy eficientes en la presentación de antígenos a los linfocitos T.

Las células dendríticas (DC) son fagocíticas, también derivadas de monocitos circulantes diferenciados. Son particularmente importantes en la activación de linfocitos T inmaduros, a diferencia de los macrófagos y linfocitos B que activan células de memoria.

Los neutrófilos polimorfonucleares son leucocitos, que como los macrófagos migran de la sangre a los tejidos donde fagocitan y digieren microorganismos invasores. Son, sin embargo, células de vida corta que mueren conjuntamente con el contenido fagocitado.

Las células “NK” son un tipo especial de linfocitos que no expresan receptores de antígenos en sus membranas. No atacan directamente los microorganismos invasores, pero destruyen células del organismo infectadas por virus. Estas células producen proteínas especiales llamadas “perforinas”, las cuales son capaces de introducirse en las membranas de células blancas, con el fin de crear poros que permiten la entrada de agua en las células promoviendo la lisis celular. Otra importante función de las células “NK” es el reconocimiento y destrucción de células cancerosas.

Además de las células implicadas en la inmunidad innata (no adaptativa), un sistema de veinte proteínas del suero, llamado sistema del complemento, constituye una línea de defensa química muy eficiente contra microorganismos y otros agentes invasores. Debido a la importancia del sistema de complemento en inmunohematología, lo trataremos en tópico especial.

Inmunidad adaptativa

Otro tipo de leucocito está involucrado en las respuestas inmunes adaptativas. Son los linfocitos capaces de reconocer específicamente patógenos individuales y otros elementos extraños al organismo. Hay varios tipos de linfocitos, pero pueden ser clasificados en dos categorías básicas: linfocitos B y linfocitos T.

Los linfocitos B producen anticuerpos, proteínas especiales capaces de reconocer y unirse a antígenos en la superficie de patógenos y otros invasores del organismo, o toxinas producidas por patógenos. Los anticuerpos son secretados en la circulación sanguínea o fluidos corporales promoviendo la “inmunidad humoral”.

Los linfocitos T presentan diferentes funciones. Algunos controlan el desarrollo de linfocitos B y la producción de anticuerpos, mientras que otros interactúan con las células fagocíticas, ayudándolas en la destrucción de patógenos fagocitados, y otro grupo de células T reconocen y destruyen células infectadas por virus. Estas células promueven la “inmunidad celular”.

Los linfocitos T salen de la médula ósea y migran hacia el timo, donde desarrollan la capacidad de reconocer epítopes antigénicos expresados en la superficie de patógenos, a través de un receptor en su membrana llamado TCR (receptor de células T). Se produce una amplia variedad de linfocitos T, y cada tipo es capaz de reconocer un antígeno específico. Por lo tanto, cualquier agente invasor será reconocido por algunos clones de linfocitos T.

Un grupo de linfocitos T, llamado ayudadores (Th = T helper), interactúa con linfocitos B, induciéndolos a dividirse, diferenciarse y producir anticuerpos. Este grupo también estimula fagocitos mononucleares a destruir patógenos intracelulares. Otro grupo es el de linfocitos T citotóxicos (Tc), capaces de reconocer y destruir células infectadas por virus y otros patógenos intracelulares. La acción de los linfocitos T se producen por la interacción directa con la célula blanco o a través de señales por factores solubles llamados citoquinas.

Los linfocitos B no migran al timo y completan su maduración en la médula ósea, de donde son liberados al sistema circulatorio sanguíneo y al sistema linfático. Cada linfocito B es capaz de reconocer directamente un antígeno específico de un agente invasor, a través de la inmunoglobulina expresada en su membrana celular, y de procesar y presentar el antígeno a un linfocito T auxiliar (Th). Los receptores de antígenos de los linfocitos T (TCR) y las inmunoglobulinas de superficie de los linfocitos B tienen una estructura y función similar.

Inmunidad humoral e inmunidad celular

En la inmunidad humoral, los antígenos de la superficie celular de agentes invasores del organismo son reconocidos por linfocitos B; cada uno expresa una inmunoglobulina específica para un único epítopo antigénico. Aleatoriamente, un antígeno encuentra un linfocito B específico y lo activa promoviendo su reproducción y diferen-

ciación. Mientras se producen clones de memoria, otros clones se diferencian en células plasmáticas capaces de producir múltiples copias de la misma inmunoglobulina expresada en sus membranas celulares. Los anticuerpos generados por las células plasmáticas se unen específicamente a los epítopes antigénicos en la superficie de los agentes invasores, y producen efectos tales como inmovilización, opsonización de sus superficies marcándolos para ser fagocitados por macrófagos con receptores para la porción “Fc” de anticuerpos humanos, o incluso la activación del sistema de complemento.

En la inmunidad celular, macrófagos y células dendríticas fagocitan y digieren patógenos o células infectadas y expresan en sus membranas celulares epítopes antigénicos del material digerido. Estas células, llamadas células presentadoras de antígenos (APC), presentan antígenos a dos grupos de linfocitos T llamados CD4 y CD8. La designación CD4+ o CD8+ es dada en función de la presencia de estos correceptores asociados con el receptor TCR de los linfocitos T. Los linfocitos T CD8+ se diferencian y producen clones de memoria y clones efectoros de linfocitos T citotóxicos (Tc), que actúan directamente contra agentes invasores o células infectadas. Las células T CD4+ se diferencian en clones de memoria y clones efectoros de linfocitos T auxiliares (Th) que actúan a través de estímulo químico sobre macrófagos y células “NK”, y además estimulan la maduración de otros linfocitos T citotóxicos.

Los linfocitos Th interactúan también con linfocitos B de las mismas especificidades, estimulándolos a di-

vidirse y diferenciarse en células plasmáticas, incrementando la producción de anticuerpos. Los linfocitos B, a su vez, actúan como presentadores de antígenos a los linfocitos Th y estimulan su actividad sobre linfocitos T CD8+ inmaduros, lo cual aumenta la producción de linfocitos T citotóxicos, y además estimula células fagocíticas, tales como macrófagos y células dendríticas.

Los linfocitos Th son las células centrales de la respuesta inmune. Integran los mecanismos humoral y celular de la defensa adaptativa, y conectan las inmunidades innata y adaptativa, mediante estimulación química de células fagocíticas.

Los linfocitos T y la inmunidad celular

Los macrófagos y células dendríticas inspeccionan todas las células que encuentran verificando la estructura de glicoproteínas de membranas, comunes a casi todas las células de vertebrados, llamadas proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o, en el caso de los humanos, de HLA (antígenos leucocitarios humanos). Estas proteínas son producidas por genes altamente polimórficos, lo que hace rarísimo dos individuos del mismo genotipo, y en consecuencia, las proteínas del MHC son como firmas moleculares de cada individuo, que permiten al sistema inmune distinguir lo que es “propio y no propio” del organismo. Cuando un agente invasor es fagocitado y digerido por macrófagos o células dendríticas, partículas antigénicas del patógeno se combinan con las proteínas del MHC, para facilitar que linfocitos T reconoz-

can estos antígenos asociados con el MHC.

Hay dos clases de proteínas del MHC. La clase MHC-I está presente en todas las células nucleadas del organismo, mientras que el MHC-II sólo está presente en macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T CD4+, lo que posibilita que estas células se reconozcan. Los linfocitos Tc sólo interactúan con antígenos presentados en combinación con las glicoproteínas del MHC-I (Figura 1), mientras que los linfocitos Th interactúan sólo con antígenos combinados con el MHC-II. El correceptor CD8, asociado al TCR de los linfocitos Tc, sólo interactúa con el MHC-I de células infectadas, mientras que el correceptor CD4, asociado al TCR de linfocitos Th, sólo con el MHC-II de otros linfocitos.

El reconocimiento de un antígeno por un linfocito Th, cuando es presen-

tado por una APC, representa el primer paso de la respuesta inmune celular. A continuación, moléculas reguladoras de la respuesta inmune son producidas por la APC (célula dendrítica o macrófago), y se unen a los receptores de membrana del linfocito Th, actuando como co-estimuladores celulares. Así, la segunda señal es dada por las moléculas co-estimuladoras B7.1 y B7.2, expresadas en la membrana de la APC cuando es activada, al combinar con CD28, que es un receptor presente en la membrana del linfocito Th. Una vez activada por el reconocimiento del antígeno y por la coestimulación B7-CD28, la APC libera interleucina-1 que estimula la proliferación de linfocitos Th específicos (Figura 2). Los linfocitos Th, a su vez, liberan interleucina-2 que estimula la proliferación de linfocitos Tc específicos para el antígeno presentado. Estos linfocitos Tc atacan

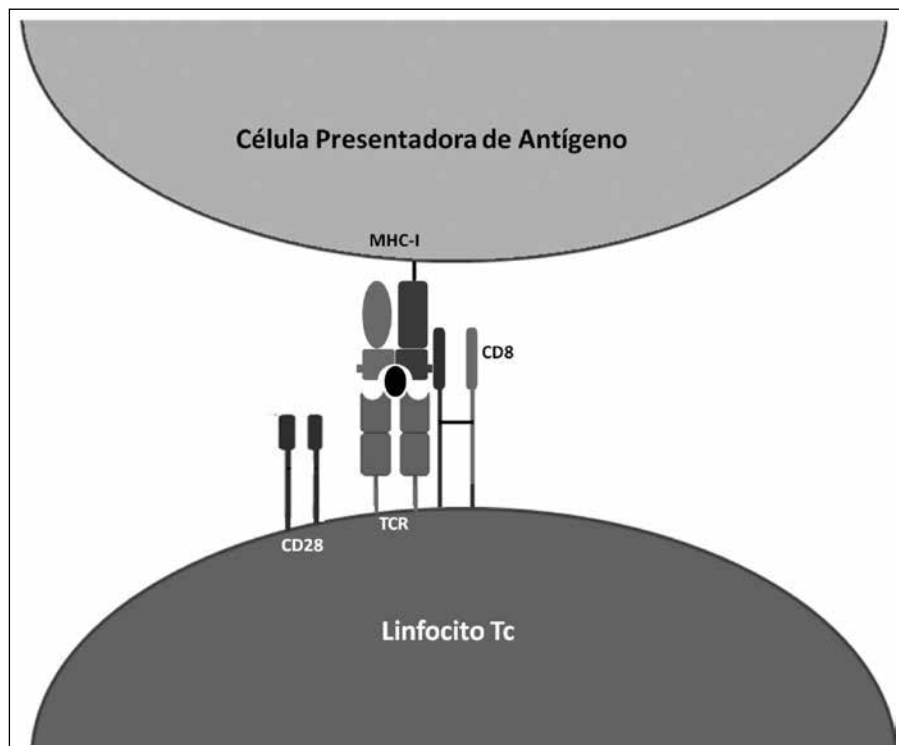


Figura 1. Linfocito Tc reconoce antígenos presentados en combinación con MHC-I

y destruyen las células infectadas que expresan este antígeno asociado a su MHC-I. La interleucina-2 activa también linfocitos B.¹

El control de las células implicadas en la respuesta inmune es mediado por moléculas coinhibidoras después de un cierto nivel de proliferación de

linfocitos Th, excepto las células de memoria. Cuando los linfocitos Th comienzan a expresar moléculas de CTLA-4 en sus membranas, éstas se unen con alta afinidad a las moléculas de B7.1/B7.2, inhibiendo su unión al CD28 (Figura 3) y silencian la respuesta inmune.

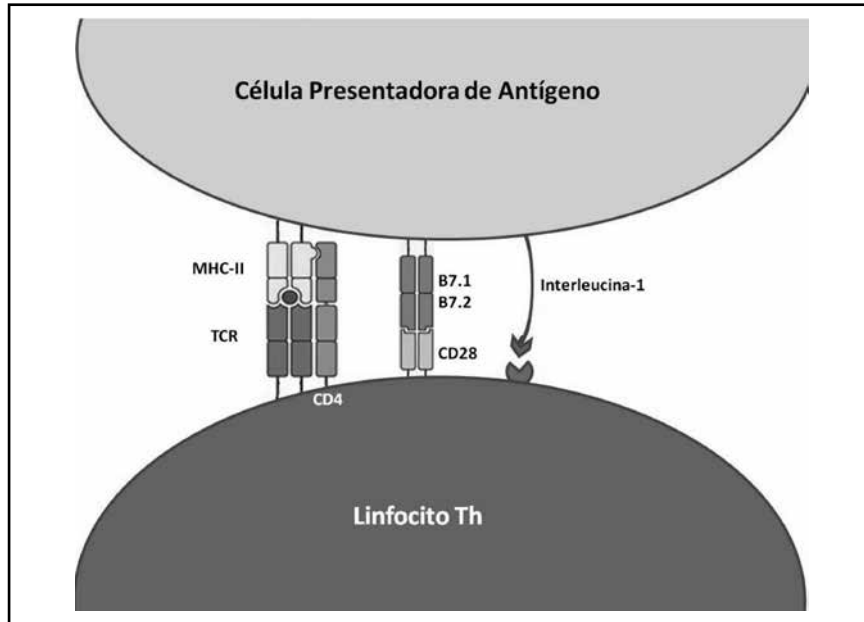


Figura 2. La APC activada por el reconocimiento del antígeno y la coestimulación B7-CD28, libera IL-1 que estimula la proliferación de linfocitos Th específicos

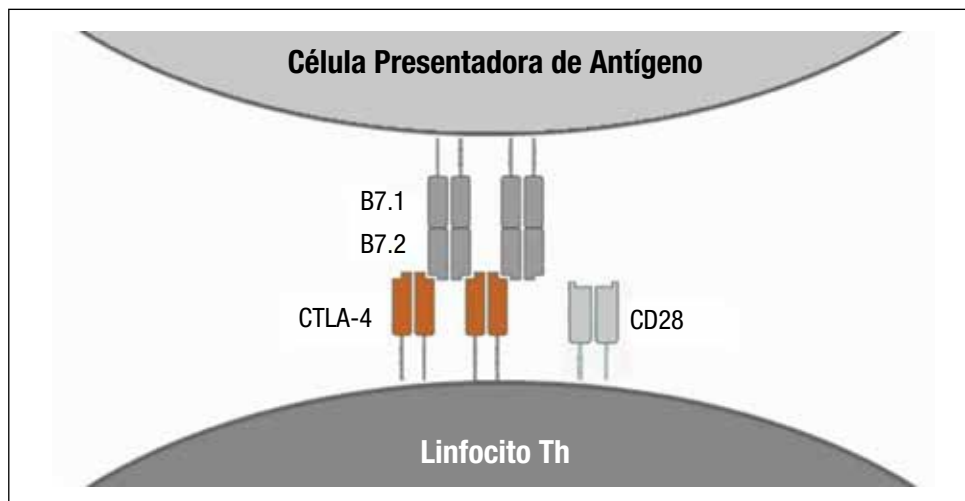


Figura 3. CTLA-4 se une con alta afinidad al B7.1/B7.2, inhibiendo su unión con CD28

Los linfocitos B y la inmunidad humoral

Los linfocitos B son capaces de reconocer y unirse a antígenos no procesados por las células presentadoras de antígenos, mediante la inmunoglobulina expresada en su membrana celular responsable por su especificidad. El antígeno reconocido por el linfocito B es englobado por un proceso denominado “endocitosis”. El antígeno es digerido, procesado y después presentado en asociación con glicoproteínas de su MHC-II, a un linfocito Th específico. Al mismo tiempo, el linfocito B expresa las moléculas de B7.1 / B7.2 y CD40 en su membrana celular. A través de su receptor de antígenos TCR CD4, el linfocito Th reconoce el antígeno presentado, al mismo tiempo que sus receptores CD28 y CD40L se ligan, respectivamente, con las moléculas de B7.1/B7.2 y CD40 expresadas en el linfocito B. A continuación, el linfocito Th libera interleucina-2 (IL-2) e interleucina-4 (IL-4). La IL-2 estimula el

linfocito B a dividirse y diferenciarse en clones de memoria y en clones de células plasmáticas, que son las células efectoras capaces de producir múltiples copias de anticuerpos de la misma especificidad de inmunoglobulina de superficie del linfocito B. La IL-4, cuyos efectos dependen de su unión al receptor de membrana IL-4R, es multifuncional y tiene un papel crítico en el mantenimiento de la respuesta inmune, por el estímulo al crecimiento celular, resistencia a la apoptosis y activación y diferenciación de los genes (Figura 4).

Los anticuerpos producidos son liberados en el plasma sanguíneo, en el sistema linfático y en los fluidos extracelulares, uniéndose a los agentes invasores que pasan a ser reconocidos por células fagocíticas como macrófagos y células NK, y además por proteínas del sistema de complemento.

La necesidad de coestimulación, para el éxito de la respuesta inmune, favorece las interacciones específicas y limita las posibles reacciones no es-

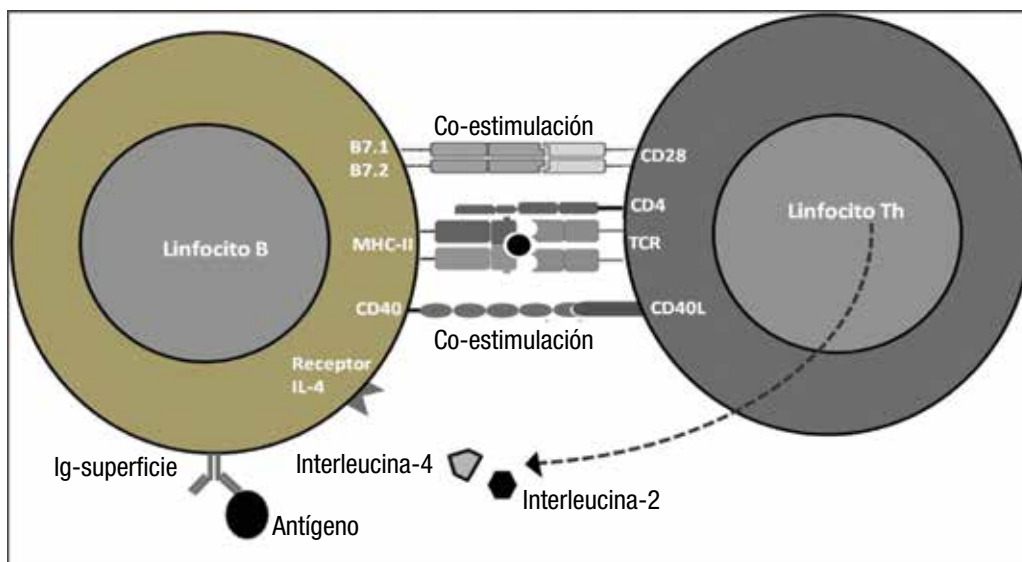


Figura 4. Presentación de antígeno al linfocito Th por el linfocito B

pecíficas. Además, ayuda a prevenir la activación de clones autorreactivos de linfocitos B y T en los órganos linfoides periféricos.

El mecanismo más importante de control, para silenciar la respuesta inmune, está vinculado a la expresión de las moléculas Fas y FasL en células activadas. Linfocitos Th pueden expresar Fas y FasL, mientras que linfocitos B solo expresan Fas. Cuando un linfocito Th expresando FasL encuentra un linfocito B expresando Fas, induce a la muerte por apoptosis. Del mismo modo, linfocitos Th expresando FasL inducen a la apoptosis de otros linfocitos Th expresando Fas.²

Hipersensibilidad tipo II y transfusión sanguínea

Hipersensibilidad significa una respuesta inmune adaptativa exagerada producida por diversos tipos de antígenos y que varía de un individuo a otro. Las reacciones se producen después de repetidos contactos con un antígeno particular.

Se han descrito cuatro tipos de hipersensibilidad, siendo el tipo II de particular interés en la práctica transfusional. Hipersensibilidad de tipo II o citotóxica se produce cuando inmunoglobulinas de las clases IgM o IgG se unen a antígenos de superficie e inducen daños selectivamente a las células o tejidos que poseen dichos antígenos.

Las reacciones transfusionales contra los glóbulos rojos transfundidos son producidas por anticuerpos dirigidos a los antígenos de grupos sanguíneos. Tales anticuerpos pueden ser naturales o resultantes de estímulos antigénicos

anteriores por transfusiones sanguíneas, embarazos o transplantes de órganos.

Los mecanismos de hemólisis extra e intravasculares postransfusionales, así como de las reacciones no hemolíticas, serán discutidos en los capítulos 7 y 15.

Membrana eritrocitaria y antígenos de grupos sanguíneos

Las biomembranas son estructuralmente muy similares, sean vegetales o animales. Son compuestas de lípidos en la forma de fosfolípidos (40%-80%), proteínas (50%-70%) y carbohidratos glicosilando lípidos y proteínas.

Los fosfolípidos emparejados y dispuestos en doble capa forman la matriz de la membrana que contiene el citoplasma de la célula. La cantidad de colesterol presente en esta matriz lipídica es responsable por la rigidez de cada membrana celular, de modo que cuanto mayor sea la concentración de colesterol, mayor será la rigidez de la membrana.

Las proteínas de la membrana tienen múltiples funciones fisiológicas, por esto las membranas celulares no son simplemente barreras pasivas para contener el citoplasma, sino barreras activas responsables por lo que podríamos llamar “vida social de las células”. De acuerdo con la forma de inserción en la membrana, estas proteínas pueden ser clasificadas como integrales o intrínsecas y periféricas o extrínsecas.

Las proteínas integrales o intrínsecas atraviesan la matriz fosfolipídica de la membrana una vez (un solo paso) o

varias veces (múltiples pasos). Las proteínas periféricas o extrínsecas no atraviesan la membrana y se encuentran en el exterior sobre un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) o en su parte interna, formando un grupo de proteínas que constituyen una especie de “citoesqueleto”.

Los carbohidratos pueden estar ligados a los fosfolípidos en la forma de glicolípidos o a las proteínas en la forma de glicoproteínas.

Las proteínas y los carbohidratos de la membrana constituyen nuestro mayor objeto de estudio en Inmunohematología, ya que los antígenos de grupos sanguíneos son, básicamente, de estas dos naturalezas bioquímicas: glicídica y proteica (Figura 5).

Así, tenemos sistemas de grupos sanguíneos, tales como ABO, H, LE, I, GLOB y P1PK, cuyos antígenos son azúcares aportados por las cadenas glicídicas de glicoproteínas o ligados directamente en los fosfolípidos de la

matriz de la membrana (glicolípidos). Los antígenos proteicos, como los de los sistemas RH, KEL, FY, JK, MNS, DI, LU y otros, están representados por puntos o segmentos de polimorfismos en las cadenas peptídicas de glicoproteínas o de proteínas puras intrínsecas y extrínsecas de la membrana eritrocitaria.

Estructura y origen de los anticuerpos

Como vimos anteriormente, los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas producidas por linfocitos B, presentes en el plasma y en los fluidos extracelulares de todos los mamíferos y en las membranas de los linfocitos B, donde actúan como receptores para antígenos.

Hay cinco clases de inmunoglobulinas definidas por el tipo de cadena pesada presente en su estructura y son denominadas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

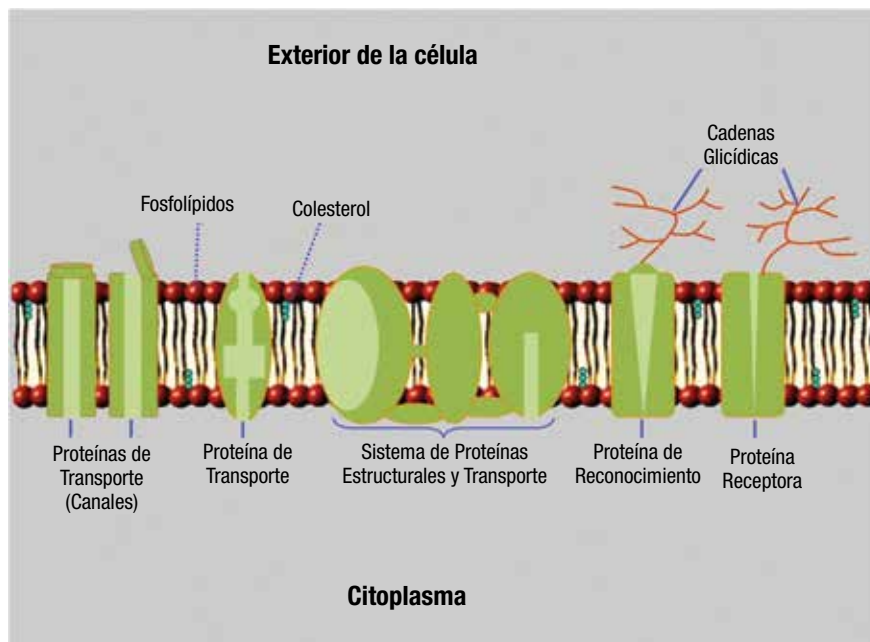


Figura 5. Membrana celular

La estructura de los anticuerpos humanos está aquí representada por moléculas de inmunoglobulinas de clase IgG (monómero = 1 unidad básica) y de clase IgM (pentámero = 5 unidades básicas). Cada unidad básica es constituida por dos secuencias largas de 450 a 550 aminoácidos, denominadas cadenas pesadas, y dos secuencias cortas de 211 a 217 aminoácidos, denominadas cadenas ligeras. Puentes disulfuro a lo largo de las cadenas peptídicas mantienen la estructura espacial de la inmunoglobulina y promueven la unión entre estas cadenas, creando regiones que permiten cierto grado de movilidad al anticuerpo.

Las secuencias peptídicas de las regiones constantes de las cadenas ligeras y pesadas (CL, CP1-CP2-CP3) constituyen la fracción “Fc” común a todos los anticuerpos humanos y que pueden ser reconocidas por los macrófagos con receptores de “Fc”. Las secuencias peptídicas de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas (VL, VP) forman los sitios de unión a los antígenos

y son por lo tanto responsables por la especificidad del anticuerpo (Figura 6).

La diversidad de anticuerpos con diferentes especificidades, que constituye el repertorio de respuestas inmunes de un individuo, es heredada genéticamente. Las regiones variables (VP, VL) de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos son producto de una serie de reordenamientos genéticos en el DNA de precursores de los linfocitos B, lo que permite una gran variedad de inmunoglobulinas específicas. Así, la producción de clones de linfocitos B autorreactivos, es decir, productores de autoanticuerpos, se vuelve inevitable. Sin embargo, después de la expresión de las inmunoglobulinas de superficie (sIg) en los linfocitos B maduros, clones autorreactivos empiezan a ser eliminados por un mecanismo llamado autotolerancia.

La mayoría de los clones de linfocitos B autorreactivos son eliminados en la médula ósea. Otros son inactivados, pero pueden permanecer en la circulación linfoide periférica, y even-

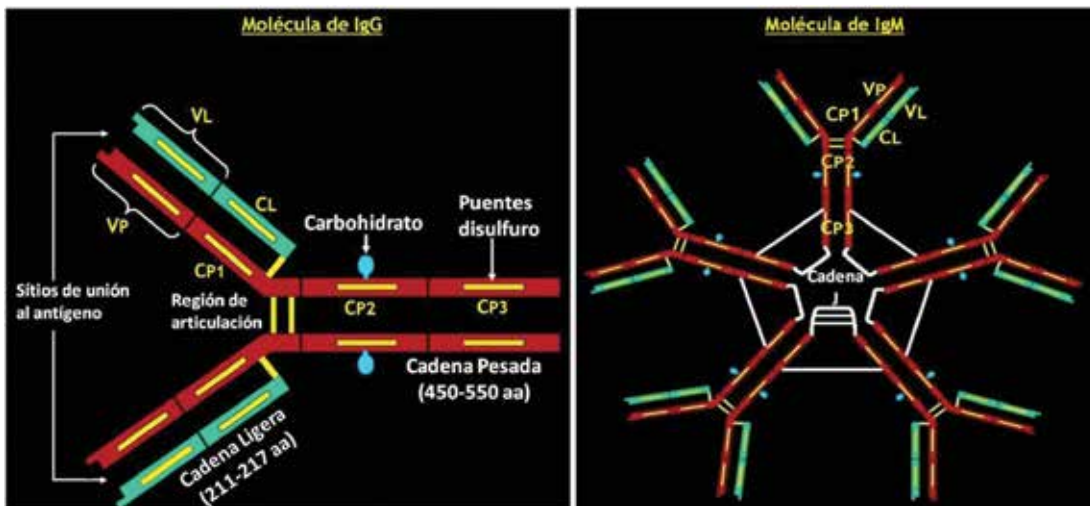


Figura 6. Estructura de las inmunoglobulinas de las clases IgG e IgM

tualmente ser activados produciendo respuestas autoinmunes transitorias o permanentes.

Especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo

La característica básica de la reacción antígeno-anticuerpo es la “especificidad”, la cual está representada por una estrecha relación de complementariedad entre las estructuras tridimensionales de las dos moléculas. Esta complementariedad permite la máxima aproximación entre los sitios de unión de las moléculas de antígeno (Ag) y an-

ticuerpo (Ac). Las fuerzas de interacción molecular en el complejo “Ag-Ac” no son covalentes y, aunque individualmente débiles, en conjunto producen una fuerte energía de cohesión.

La estabilidad del complejo “Ag-Ac” es mantenida por fuerzas que actúan a corta distancia, como puentes entre átomos de hidrógeno, atracción electrostática entre grupos con cargas opuestas, fuerzas de Van Der Waals producidas por la reorganización de las nubes de electrones del antígeno y del anticuerpo, además de las uniones hidrófobas por asociación de grupos no polares (Figura 7).

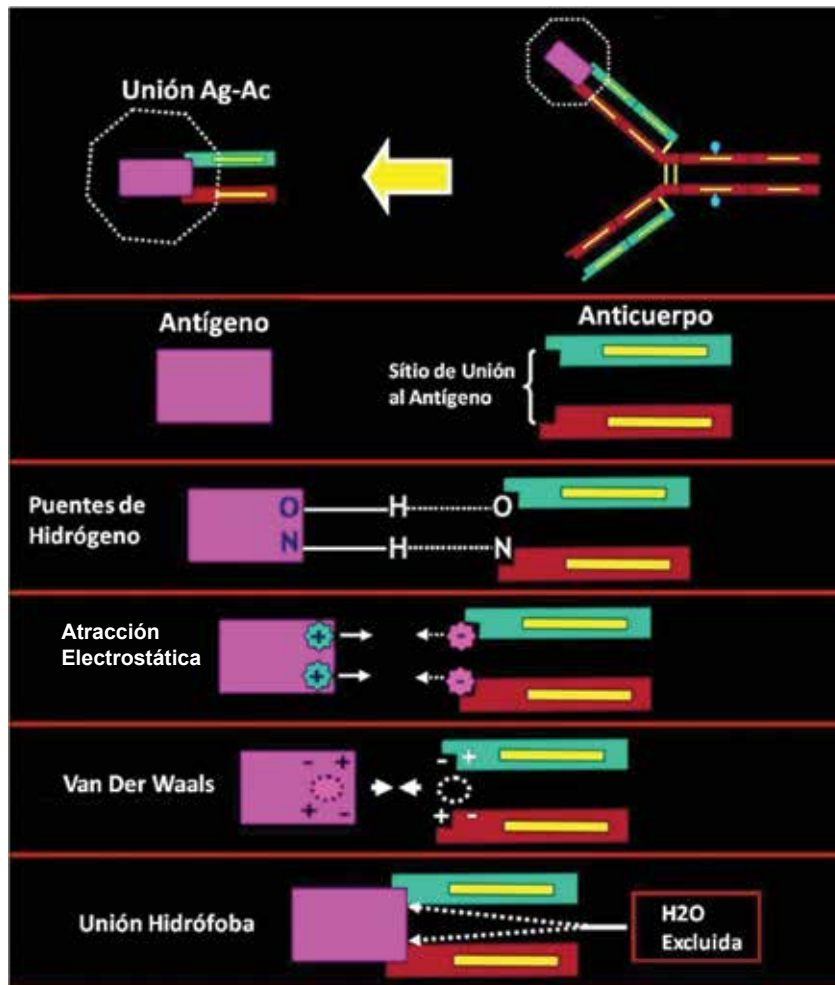
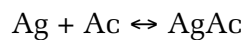


Figura 7. Fuerzas de cohesión entre antígeno y anticuerpo

Reversibilidad de la reacción antígeno-anticuerpo

Las uniones no covalentes entre el anticuerpo y el antígeno pueden disociarse, demostrando la reversibilidad de la reacción “Ag-Ac”, que es su segunda característica básica. Esta disociación (elución) puede generarse por varios procesos: calor, cambio del pH, fuerza iónica, disolventes orgánicos, etc.

Como se trata de una reacción bimolecular reversible, es posible aplicar la ley de acción de masas y determinar la constante de equilibrio o afinidad en la reacción.



Si (Ag) representa la concentración del antígeno (mol/L), (Ac) la concentración de anticuerpos (mol/L), la aplicación de la ley de acción de masas, en equilibrio, nos permite considerar:

$$\frac{(\text{AgAc})}{(\text{Ag})(\text{Ac})} = K$$

“K” representa la “constante de equilibrio del sistema” y mide la estabilidad del complejo “Ag-Ac” y la afinidad del anticuerpo por el antígeno correspondiente. Cuanto mayor es la constante K, mayor es la afinidad del anticuerpo.

Termodinámica de la reacción antígeno-anticuerpo

Es importante la correcta comprensión de la termodinámica de las reacciones “Ag-Ac”, ya que esto facilitará mucho el entendimiento del concepto de anticuerpos “fríos y calientes” en inmunohematología.

La reacción antígeno-anticuerpo es exotérmica, es decir, siempre provoca una liberación de calor, cuyas variaciones o entalpía (ΔH°) es más negativa cuanto más exotérmica es la reacción. Un anticuerpo típicamente frío, tal como el anti-I, libera una gran cantidad de calor en su reacción con el antígeno específico y tiene un rango térmico corto. En este caso, la constante de equilibrio del sistema (K) varía fuertemente en temperaturas de 4 °C a 37 °C y la afinidad del anticuerpo por el antígeno es máxima en baja temperatura (4 °C), más débil a 25 °C y hasta nula a 37 °C. La aglutinación de los glóbulos rojos producida por anticuerpos fríos es más visible a 4 °C.

Por el contrario, un anticuerpo típicamente caliente, como el anti-RhD, tiene calor de reacción (ΔH°) muy débil y amplio rango térmico. En este caso, la variación de la constante de equilibrio del sistema (K) es muy baja y la afinidad del anticuerpo por el antígeno varía poco en reacciones de 4 °C a 37 °C y la aglutinación de los glóbulos rojos es más visible a 37 °C.

La aglutinación de los glóbulos rojos

Si producimos ciertos cambios físico-químicos en suspensiones de partículas de coloides³ o de células, como bacterias o glóbulos rojos, estas suspensiones pierden la estabilidad y los coloides o células se aglutinan, formando grumos a los cuales llamamos “aglutinados”.

En inmunohematología eritrocitaria, el fenómeno de aglutinación de los glóbulos rojos producido por la reac-

ción entre anticuerpos y antígenos de grupos sanguíneos constituye la base de casi todas las técnicas aplicadas en la “serología de los grupos sanguíneos”.

La aglutinación de glóbulos rojos en suspensiones fisiológicas puede ocurrir por dos mecanismos básicos: específico e inespecífico.

Aglutinación específica

Sabemos que los glóbulos rojos permanecen en suspensión cuando están en solución salina fisiológica (NaCl 0,85%), es decir, las células se mantienen a una cierta distancia unas de las otras. Esta estabilidad puede ser cambiada por la introducción de anticuerpos específicos que se fijan en antígenos de la membrana eritrocitaria, produciendo la aglutinación de estas células.

Por un modelo conocido como “teoría de los puentes”, las moléculas de anticuerpos son capaces de fijarse sobre sitios antigénicos de células adyacentes formando puentes entre ellas. La aglutinación se produce cuando una gran cantidad de células son atrapadas en la red creada. Por este modelo, la mejor actividad aglutinante de los anticuerpos de clase IgM está ligada a su estructura pentamérica, la cual es capaz de hacer puentes entre más de dos células. Veremos que esta concepción es incompleta y que resulta de una simple analogía con los fenómenos de precipitación de antígenos solubles. La “teoría de los puentes” es un modelo simplista del fenómeno de aglutinación de glóbulos rojos en suspensión, y no permite comprender los ejemplos de aglutinaciones inespecíficas, o sea, en la ausencia de anticuerpos.⁴

Aglutinación inespecífica

Este fenómeno es conocido como “panaglutinación”, y corresponde a la aglutinación de glóbulos rojos producida por otras sustancias, que no son anticuerpos, cuando se añaden al medio de la suspensión, como: detergentes, sílice coloidal, iones metálicos y macromoléculas (albúmina, polibreno, ficol, dextran). Algunas fitoaglutininas o lecitinas pueden reconocer antígenos de grupos sanguíneos y producir la aglutinación de los glóbulos rojos como los anticuerpos antieritrocitarios.

Procesos físicoquímicos de la aglutinación (Potencial Zeta)

Para la comprensión de los fenómenos de hemaglutinación específica e inespecífica, necesitamos de un modelo más complejo con base en procesos físicoquímicos, donde el factor más importante a ser considerado es la distancia que separa los glóbulos rojos en suspensión. Por la adición de anticuerpos u otras sustancias al medio, esta distancia puede ser disminuida hasta un punto crítico en que la aglutinación ocurre.

Los glóbulos rojos se comportan como partículas electronegativas en estudios de migración electroforética. Las proteínas de la membrana, principalmente las sialoglicoproteínas, son responsables de la electronegatividad.

En medio salino (NaCl 0,85%), iones positivos de sodio (Na⁺) son atraídos hacia los glóbulos rojos, y se crea una doble capa de cargas positivas que genera una fuerte repulsión interglobular. La nube de iones positivos, que involucra cada glóbulo, se vuelve menos

densa mientras se aleja del glóbulo. La diferencia de potencial eléctrico creada entre la doble capa de iones positivos (Na+) cerca del glóbulo y el medio con iones de sodio (Na+) y cloruro (Cl-) en equilibrio (neutro), se llama “Potencial Zeta” (Figura 8). La fuerza de repulsión entre los glóbulos rojos, en medio salino, depende del valor del potencial Zeta.

Considerando la carga eléctrica del glóbulo rojo (γ), la fuerza iónica del medio de la suspensión (μ) y la constante dieléctrica del medio (D), Pollack⁵ desarrolló la siguiente expresión del potencial Zeta (Z): $Z = f \{ \gamma, 1/D, 1/\sqrt{\mu} \}$, esto es, la diferencia del potencial Zeta es una función que varía directamente con la electronegatividad de la mem-

brana eritrocitaria (γ) e inversamente con la constante dieléctrica del medio de suspensión (D) y con la raíz cuadrada de su fuerza iónica ($\sqrt{\mu}$).

En términos físicoquímicos, la aglutinación ocurre por la agregación de los glóbulos rojos (aglutinados), cuando la distancia entre ellos se reduce hasta un valor mínimo. Esta distancia depende de la “tensión interfacial” (fuerza de cohesión), que tiende a agregar los glóbulos rojos, y de la “fuerza de repulsión”, debida a los escudos de cargas positivas creados alrededor de los glóbulos (cargas iguales se repelen). En la ausencia de agentes aglutinantes, la fuerza de repulsión predomina y mantiene la suspensión globular estable en medio salino (Figura 9).

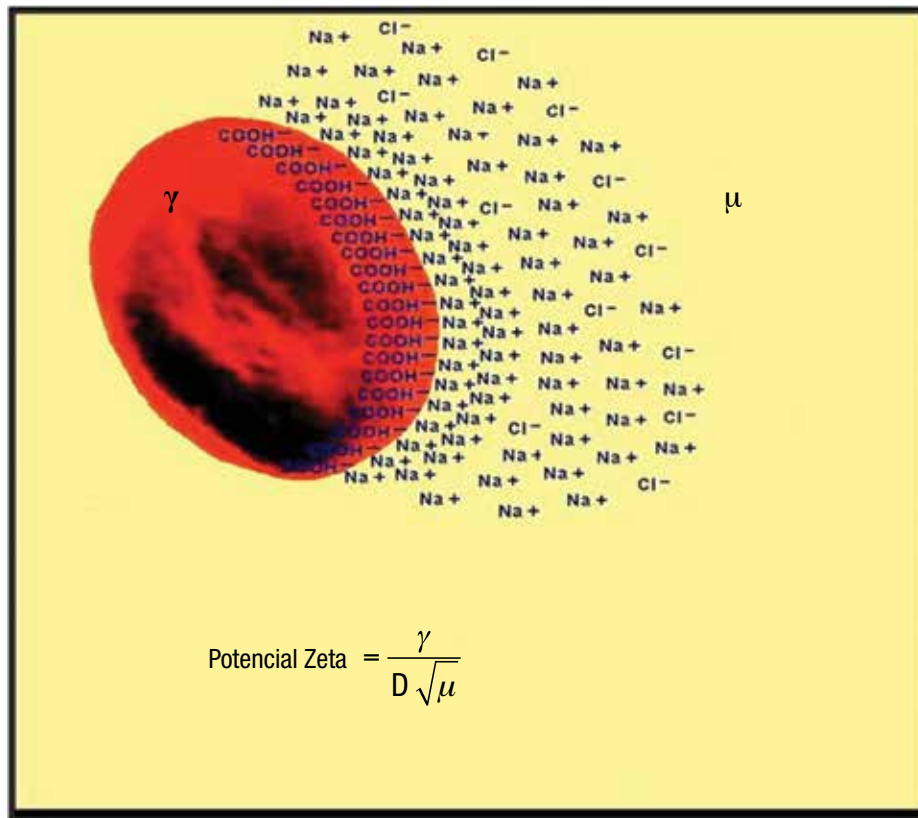


Figura 8. El potencial Zeta varía directamente con la electronegatividad del glóbulo rojo e inversamente con la constante dieléctrica (D) y la fuerza iónica (μ) del medio

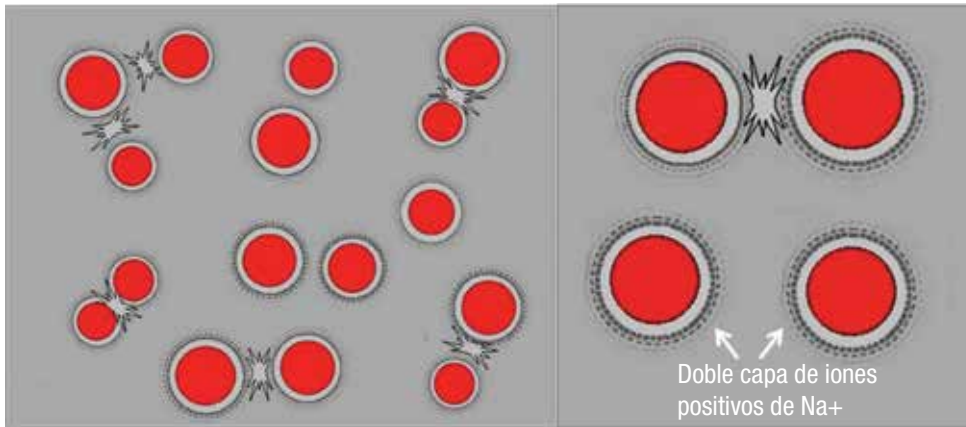


Figura 9. Tensión interfacial y fuerza de repulsión interglobular

La noción de “Potencial Zeta Crítico (Zc)” definida por Abramson, muestra que para valores elevados del potencial Zeta, los glóbulos rojos no se aglutinan, incluso en la presencia de anticuerpos específicos. Al disminuirse lentamente el potencial Zeta del sistema, se constata que la aglutinación ocurre en un

valor determinado, que denominamos el “Potencial Zeta Crítico” (Figura10).

El potencial Zeta (Z) de un sistema puede ser modificado de dos maneras:

- Reducción de la carga eléctrica de la membrana eritrocitaria:

Los efectos del tratamiento de los glóbulos rojos con enzimas proteo-

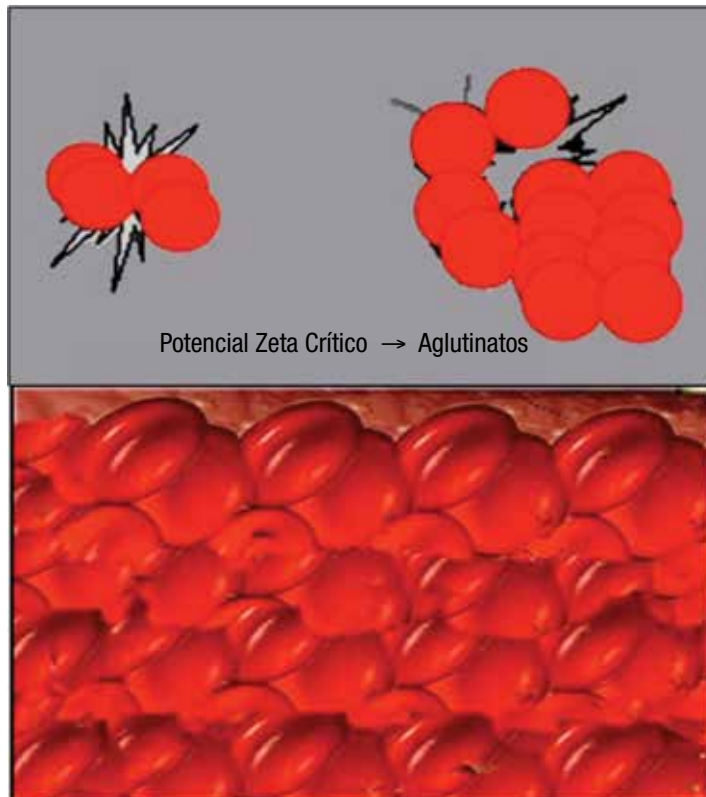


Figura10. El Potencial Zeta Crítico

líticas, tales como bromelina, papaína, ficina, tripsina, entre otras, que sacan fragmentos de glicoproteínas de la membrana y el efecto de la fijación de anticuerpos sobre la membrana eritrocitaria, reducen la electronegatividad de los glóbulos rojos (γ).

- Cambios en la composición del medio:

Se consideran los efectos debidos a los cambios de la fuerza iónica y/o de la constante dieléctrica del sistema. La aglutinabilidad de un sistema es más alta mientras más bajo sea el valor del potencial Zeta.

Pollack relacionó así los términos en su ecuación del potencial Zeta:

$$Z = \frac{\gamma}{D\sqrt{\mu}}$$

Esta ecuación nos muestra que el potencial Zeta puede bajar y aumentar la aglutinabilidad del sistema, o hasta puede promover la aglutinación de los glóbulos rojos en suspensión, si el Potencial Zeta Crítico (Z_c) es alcanzado, en tres condiciones:

- Disminución de la carga eléctrica del glóbulo rojo (γ)
- Aumento de la constante dieléctrica del sistema (D)
- Aumento de la fuerza iónica del medio (μ)

Las condiciones mencionadas son los principales parámetros utilizados para comprender las reacciones de aglutinación y los métodos de producción de aglutinación utilizados en los laboratorios de inmunohematología.

Pollack explicó en bases físicoquímicas las diferencias de comportamiento de los anticuerpos de clase IgG y de clase IgM en la aglutinación de los glóbulos rojos, cuando reaccionan con antígenos de grupos sanguíneos.

El potencial Zeta mensurado para una suspensión de glóbulos rojos RhD positivos en solución salina fisiológica (NaCl al 0,85%) es del orden de -15 mV a -16 mV (mV = milivoltio).⁶ Si por medio de ajustes en la fuerza iónica (μ) o en la constante dieléctrica (D) del medio de la suspensión se hace bajar el potencial Zeta del sistema, se observa que los glóbulos rojos RhD positivos tienden a aglutinarse espontáneamente, aún en ausencia de anticuerpos anti-RhD, cuando el valor del potencial Zeta llega alrededor de -7 mV. Este valor para el Potencial Zeta Crítico (Z_c), donde ocurre una aglutinación inespecífica de los glóbulos rojos, no varía con diferentes suspensiones celulares, y por esto permite evaluar el valor de la “tensión interfacial” (fuerza de cohesión) entre glóbulos rojos en suspensión salina fisiológica (NaCl 0,85%).

Los mismos ajustes anteriores son hechos en suspensiones de glóbulos rojos RhD positivos, ya sensibilizados con anticuerpos anti-RhD de las clases IgM e IgG, para establecerse el potencial Zeta crítico (Z_c) de cada sistema. El valor del Zeta crítico (Z_c) para las suspensiones tratadas con anti-RhD de clase IgM es del orden de -18 a -23 mV, mientras que las tratadas con anti-RhD de clase IgG es del orden de -8 a -10 mV (Figura 11).

Como el Potencial Zeta Crítico (Z_c) de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados por anticuerpos anti-RhD de clase IgM es superior en valor absoluto

POTENCIAL ZETA CRÍTICO Y CLASES DE ANTICUERPOS	
POTENCIAL ZETA (mV)	
- 23	Aglutinación imposible a partir de este punto.
-18	Potencial Zeta crítico para IgM.
-16	Potencial Zeta de una suspensión de GR (NaCl 0,85%)
-10	Potencial Zeta crítico para IgG.
-7	Aglutinación inespecífica debajo de este punto.

Figura 11. Potencial Zeta Crítico para anticuerpos aglutinantes, no aglutinantes y para aglutinación inespecífica

Fuente: P. Rouger y C. Salmon; La pratique de l'agglutination des Érythrocytes et du Tes de Coombs

al de la propia suspensión de glóbulos rojos no sensibilizados, estos anticuerpos producen aglutinación directa en medio salino (NaCl 0,85%) y son llamados “aglutinantes”. Al contrario, el Potencial Zeta Crítico (Zc) en la presencia de anticuerpos anti-RhD de clase IgG, siendo inferior al de la suspensión de glóbulos rojos no sensibilizados, estos anticuerpos no producen aglutinación directa en medio salino (NaCl 0,85%) y son llamados “no aglutinantes”. La ventaja de la molécula de IgM sobre la de IgG está ligada a su mayor peso molecular y a su estructura pentamérica en vez de la monomérica presente en la molécula de la IgG que es mejor adaptada a la función aglutinante, por desplazar más iones de la doble capa de iones positivos (Na⁺) alrededor de los glóbulos rojos, cuando reacciona con un antígeno de grupo sanguíneo.

La aglutinación de los glóbulos rojos, en una suspensión, no está relacionada simplemente con las clases de los anticuerpos, sino también con el número y ubicación de los antígenos.

Anticuerpos anti-A de clase IgM, por ejemplo, aglutinan glóbulos rojos A₁ o A₂ en suspensión de NaCl al 0,85%, pero no aglutinan glóbulos A_m. De la misma manera, anticuerpos anti-RhD, de clase IgG, no aglutinan glóbulos RhD positivos en suspensión de NaCl al 0,85%, pero aglutinan glóbulos del fenotipo D⁻/D⁻ (variante rara del sistema Rh). El número de sitios antigénicos es responsable por las diferencias de comportamientos de los anticuerpos anti-A y anti-RhD en presencia de glóbulos rojos A_m y D⁻/D⁻, respectivamente. Los glóbulos A_m poseen un número de sitios antigénicos “A” alrededor de 1.000 receptores por

membrana, mientras que los glóbulos A_1 poseen alrededor de 1.000.000. Los fenotipos RhD más comunes poseen entre 10.000 hasta 30.000 sitios por membrana, mientras que el fenotipo D⁻/D⁻ posee alrededor de 100.000. Existe una relación clara entre aglutinabilidad de los glóbulos rojos y el número de sitios antigénicos presentes en la membrana.⁷ Hay un número crítico de sitios antigénicos para producir la aglutinación, cuyo valor depende del sistema de grupo sanguíneo estudiado. En el sistema ABO, el número crítico de antígenos “A” es de 2.000 a 3.000 receptores por célula, lo que explica el hecho de no generar aglutinaciones directas con los glóbulos “A_m”.

La ubicación de los antígenos en la membrana del glóbulo rojo es otro factor importante en la reacción de aglutinación. Los antígenos pueden estar total o parcialmente involucrados (cripto-antígenos) e inaccesibles a los anticuerpos. El ejemplo más conocido es el antígeno “T” que normalmente no es reactivo en glóbulos íntegros, pero que después de la acción de enzimas proteolíticas bacterianas en pacientes con septicemia o muestras de sangre antiguas, quedan accesibles y poliaglutinables dado que los sueros humanos contienen autoanticuerpos anti-T.

Técnicas inmunohematológicas de producción de la aglutinación

Como se ha presentado anteriormente, los anticuerpos denominados “no aglutinantes” se fijan sobre las membranas de los glóbulos rojos sin producir aglutinación. Por ello, la visualización

de las reacciones de estos anticuerpos con sus respectivos antígenos, depende de técnicas especiales para producir la aglutinación de los glóbulos rojos.

En inmunohematología, estas técnicas son esenciales en la detección e identificación de aloanticuerpos anti-eritrocitarios, en el fenotipaje del glóbulo rojo, para el diagnóstico de las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI) y de las enfermedades hemolíticas del recién nacido (EHRN), ya que la mayoría de los anticuerpos de importancia clínica son de clase IgG y “no aglutinantes”. Además, la mayor parte de los antígenos de grupos sanguíneos implicados en inmunizaciones tiene un bajo número de sitios antigénicos en la membrana eritrocitaria.

A continuación, los fundamentos de las técnicas más importantes bajo la ecuación de Pollack para el potencial Zeta:

- Tratamiento de los glóbulos rojos por enzimas proteolíticas

La papaína, la bromelina, la ficina y la tripsina son enzimas proteolíticas utilizadas en las técnicas enzimáticas de hemaglutinación.⁸ Estas enzimas son capaces de sacar fragmentos peptídicos electronegativos de sialoglicoproteínas de la membrana eritrocitaria, disminuyendo la carga negativa de los glóbulos rojos. Como consecuencia de la reducción de la electronegatividad de los glóbulos, los escudos de iones positivos (Na^+) atraídos hacia las membranas eritrocitarias disminuyen, y el valor de la diferencia de potencial eléctrico (potencial Zeta) entre estos escudos electropositivos y el medio de suspensión en equilibrio (neutro), también

disminuye. Para valores más bajos del potencial Zeta, las suspensiones de glóbulos se tornan más aglutinables. Esto está de acuerdo con el modelo electrostático de Pollack, donde el potencial Zeta (Z) es directamente proporcional a la electronegatividad del glóbulo rojo (γ). Como ejemplo, glóbulos rojos RhD positivos tratados por las enzimas proteolíticas citadas, pueden ser aglutinados en medio salino, por anticuerpos anti-RhD de clase IgG (no aglutinantes).

- Adición de sustancias macromoleculares

Macromoléculas como albúmina, dextran, ficol y polietilenglicol (PEG), cuando son añadidas al medio de suspensión de los glóbulos rojos, aumentan su constante dieléctrica (D), hecho que disminuye el valor del potencial Zeta de la suspensión. Estas macromoléculas poseen una extremidad positiva (amínica) y otra negativa (carboxílica), las cuales se polarizan en el campo eléctrico de los glóbulos rojos en suspensión y son atraídas hacia los glóbulos, neutralizando cargas negativas en sus membranas y promoviendo la dispersión de iones positivos (Na^+) cerca de ellos. La disminución de este escudo de cargas positivas baja el valor del potencial Zeta y disminuye la fuerza de repulsión interglobular facilitando la hemaglutinación. La albúmina bovina (BSA) al 20%-30% y el polietilenglicol (PEG) son los medios macromoleculares más utilizados en inmunohematología.

Reacciones falso-positivas pueden ser producidas por el propio medio macromolecular, cuando un exceso de polímeros aumenta la constante dieléctrica

(D) hasta un punto donde el Potencial Zeta Crítico (Z_c) es alcanzado, y el fenómeno de la aglutinación ocurre espontáneamente en la ausencia de anticuerpos (panaglutinación). La presencia de autoanticuerpos puede producir reacciones positivas en medios macromoleculares e inducir a errores en tipificaciones sanguíneas. Las reacciones falso-positivas pueden ser evidenciadas por la utilización de sueros-control producidos por el propio fabricante, los cuales contienen el mismo medio macromolecular de los sueros de clasificación sanguínea. El uso de estos controles es obligatorio por las normas técnicas vigentes.

- Cambio de la fuerza iónica del medio

Una concentración muy elevada de ciertos cationes (Cr^{3+} , Si^{3+}) puede producir una “panaglutinación” de una suspensión de glóbulos rojos no sensibilizados. Los cationes introducidos en el medio cambian poco la doble capa iónica alrededor de los glóbulos, ya que la densidad de esta nube de cationes depende de la carga negativa de los glóbulos. La diferencia de potencial (potencial Zeta) disminuye entre los escudos de cargas positivas alrededor de los glóbulos rojos y el medio de suspensión que se queda más iónico por el exceso de cationes, dando como resultado una disminución de la fuerza de repulsión interglobular que favorece la aparición del fenómeno de aglutinación. Sin embargo, concentraciones iónicas elevadas compiten con los anticuerpos e inhiben su fijación sobre los antígenos. Por consiguiente, los medios

con alta fuerza iónica no son utilizados en inmunohematología.

Técnicamente, en reacciones hechas en dos tiempos (LISS/Coombs), la etapa de sensibilización ocurre en medio isotónico de baja fuerza iónica (LISS).⁹ La disminución de la fuerza iónica del medio (μ) produce un aumento del potencial Zeta y el consecuente aumento de la distancia media entre los glóbulos rojos en suspensión. Esto incrementa la fijación inicial de los anticuerpos sobre los antígenos correspondientes en la membrana eritrocitaria, aumentando la sensibilidad de la reacción y reduciendo el tiempo de incubación. La etapa de revelación de los anticuerpos fijados sobre la membrana eritrocitaria, por la adición de la antiglobulina humana (suero de Coombs), es ejecutada después de una serie de lavados de los glóbulos rojos con salina (NaCl 0,85%), que es un medio de fuerza iónica normal. Por tanto, solamente la etapa de sensibilización ocurre en baja fuerza iónica, mientras que la revelación ocurre en fuerza iónica normal, cuando los anticuerpos se fijan sobre la membrana eritrocitaria.

En la técnica de “Gel-centrifugación”, las reacciones de LISS/Coombs no presentan la etapa de lavados de los glóbulos rojos después de la etapa de incubación. En estos casos, la solución de baja fuerza iónica es cambiada por la adición de una mínima cantidad de albúmina, que produce un pequeño aumento de su constante dieléctrica (D) para compensar el efecto de la disminución de la fuerza iónica (μ) del medio de la suspensión sobre el potencial Zeta (Z). Observen que se puede trabajar en más de una variante de la

ecuación de Pollack para el potencial Zeta (Z).

- Prueba de la antiglobulina humana o prueba de Coombs

La prueba de la antiglobulina humana o prueba de Coombs representa la técnica más importante de producción de aglutinación en inmunohematología.

Por un procedimiento inmunológico, esta reacción nos permite revelar la presencia de anticuerpos “no aglutinantes” en la membrana eritrocitaria. Decimos “procedimiento inmunológico” porque los sueros de Coombs son compuestos de anticuerpos contra anticuerpos humanos. Son producidos por la inyección de cadenas leves y pesadas de IgGs humanas en animales como conejos u ovejas, que producen anticuerpos contra las fracciones “Fc” de las inmunoglobulinas humanas. Estos anticuerpos pueden reconocer cualquier inmunoglobulina humana, por esto en la ejecución de la prueba de Coombs es necesario lavar los glóbulos rojos, después de la etapa de sensibilización (incubación) y antes de añadirse el suero de Coombs, con el propósito de remover los anticuerpos libres. Los glóbulos rojos quedan involucrados solamente con los anticuerpos que se ligaron específicamente con antígenos de membrana.

Cuando se añade el suero de Coombs, los anticuerpos antiglobulinas humanas (AGH) se ligan en las fracciones “Fc” de los anticuerpos antieritrocitarios fijados en la membrana eritrocitaria. Considerando su estructura tridimensional, se observa que cada fracción “Fc” de un anticuerpo fijado

en la membrana eritrocitaria, puede reaccionar con múltiples moléculas de antiglobulinas humanas (AGH), quedando más larga y desplazando más iones de sodio (Na^+) de la doble capa alrededor del glóbulo rojo. La capacidad de aglutinación de los anticuerpos de la clase IgG + AGH es similar a la de los de clase IgM que son naturalmente “aglutinantes” (Figura 12).

En la técnica de “Gel-centrifugación”, la separación de los anticuerpos libres de los fijados sobre antígenos de membrana ocurre por un gradiente de centrifugación.

Los sueros de Coombs pueden ser “poliespecíficos o monoespecíficos”.

Los llamados poliespecíficos contienen, además de los anticuerpos contra fracciones “Fc” de las inmunoglobulinas humanas, anticuerpos contra la fracción C3d del complemento que puede estar presente sensibilizando la membrana eritrocitaria en la presencia o ausencia de anticuerpos fijados. Los sueros monoespecíficos contienen anticuerpos contra solamente un tipo de inmunoglobulina (IgG, IgM o IgA) o contra fracciones del Complemento (C3c o C3d). Los anticuerpos contra la fracción C4 no deben estar presentes en los sueros poliespecíficos, para evitarse reacciones cruzadas con antígenos

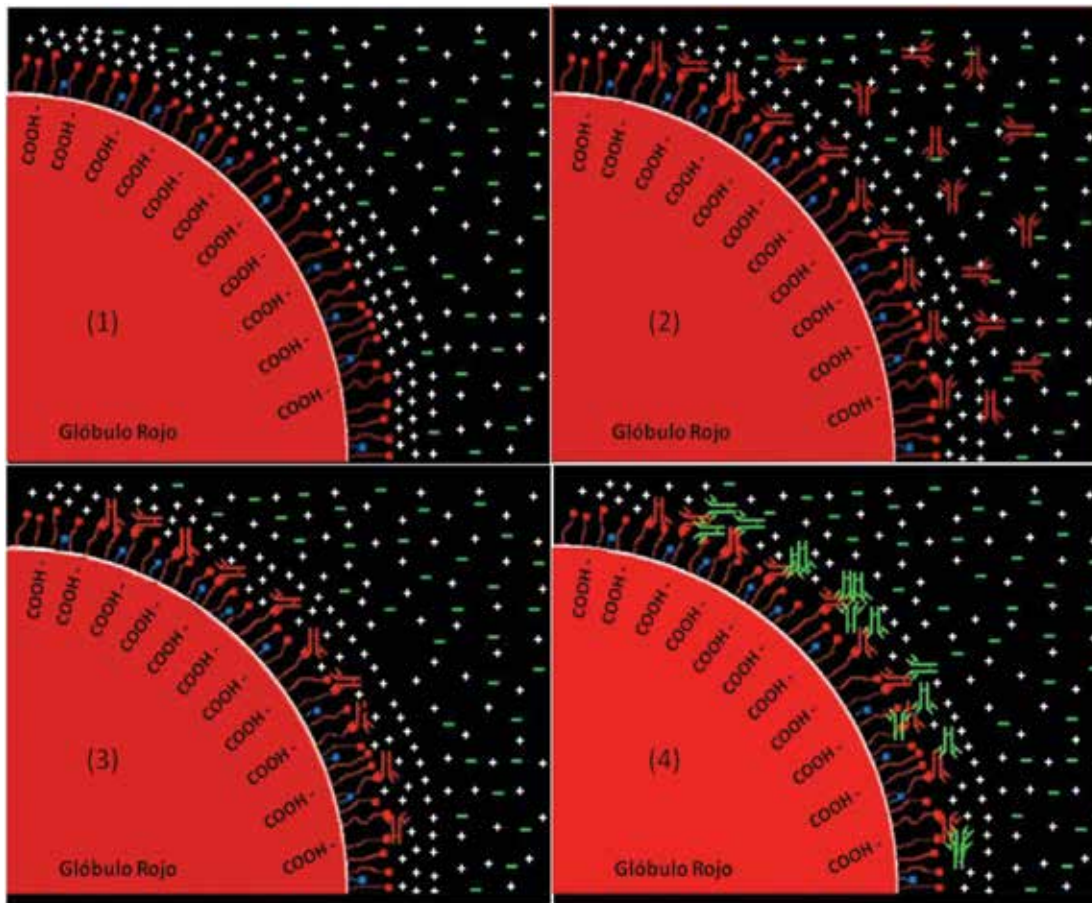


Figura 12. (1) Suspensión de glóbulos rojos; (2) adición del suero e incubación; (3) lavados para remoción de anticuerpos libres; (4) adición de la AGH

del grupo sanguíneo Chido/Rodgers (ISBT= 017- CH/RG).

La prueba de Coombs puede ser realizada de dos maneras: directa e indirecta.

Con la prueba de Coombs directa (PCD) demostramos glóbulos rojos sensibilizados *in vivo* por anticuerpos y/o fracciones del complemento. Se usa en el diagnóstico de la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), de la anemia hemolítica auto-inmune (AHAI), de la hemólisis inducida por drogas y en el diagnóstico de las reacciones hemolíticas postransfusionales.

La prueba de Coombs indirecta (PCI) representa la reacción-clave y de más grandes posibilidades en inmunohematología, y nos permite ejecutar una serie de pruebas como: investigación e identificación de anticuerpos antieritrocitarios, pruebas de compatibilidad pretransfusionales y determinación de antígenos eritrocitarios que no pueden ser evidenciados por aglutinación directa (ejemplos: variantes débiles de RhD, antígenos Duffy, Kidd, Kell y otros). La sensibilidad de la prueba de Coombs indirecta (PCI) puede ser aumentada por procedimientos que cambian la primera etapa de la reacción, es decir, de la fijación de los anticuerpos durante la incubación. Los más utilizados son: adición de albúmina al 22% (BSA) o polietilenglicol (PEG) al medio, uso de medios de baja fuerza iónica (LISS) y la utilización de glóbulos rojos tratados por enzimas proteolíticas.

La adición de albúmina o polietilenglicol (PEG) aumenta la constante dieléctrica (D) del medio de suspensión y baja el valor del potencial Zeta (Z), lo cual favorece la aglutinación de los gló-

bulos rojos. Facilita también la fijación inicial de los anticuerpos a la membrana eritrocitaria por la disipación de iones positivos cerca de la membrana, sin embargo, este procedimiento es menos eficaz que la disminución de la fuerza iónica del medio.

El uso de un medio isotónico de baja fuerza iónica (LISS), en la etapa de sensibilización de los glóbulos rojos, aumenta considerablemente la velocidad de fijación y la cantidad de anticuerpos fijados sobre la membrana eritrocitaria. Este hecho nos permite aumentar la sensibilidad y disminuir el tiempo de incubación de la prueba.

El uso de glóbulos rojos pretratados con enzimas proteolíticas (tripsina o papaína) en prueba de Coombs indirecta (PCI) es un procedimiento indicado para mejorar la detección de anticuerpos contra antígenos del sistema Kidd.

Otros factores que influyen en la reacción de aglutinación de los glóbulos rojos

La temperatura de la reacción y el pH del medio de suspensión influyen en la fijación de los anticuerpos sobre sus antígenos y sobre el fenómeno de aglutinación, ya que los dos aspectos de la reacción no son dissociables.

Como se ha discutido anteriormente, distinguimos dos temperaturas de reacción: un primer grupo presenta reacciones óptimas en bajas temperaturas, y un segundo grupo presenta reacciones óptimas en temperaturas más elevadas. Los anticuerpos activos en temperaturas bajas (4 °C), también llamados “anticuerpos fríos”, corresponden principalmente a las especificida-

des anti-I, -H, -A, -B, -AB, -Le, -M, -N y -P1. Se trata normalmente de anticuerpos naturales regulares o irregulares. Los anticuerpos “inmunes” reaccionan mejor en 37 °C, y también son llamados “anticuerpos calientes”. Este es el caso, por ejemplo, de los anticuerpos de los sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Diego, etc.

Los cambios de pH entre 6,0 y 8,0 tienen poca o ninguna influencia sobre la reactividad de los anticuerpos. Fuera de estos límites se puede observar hemólisis de los glóbulos rojos para valores extremos del pH, o una inhibición de la aglutinación debida a una disminución importante de la constante de afinidad de los anticuerpos.

Pruebas serológicas en inmunohematología

Las pruebas serológicas en tubo o microplacas, la centrifugación en columnas con gel o microcuentas de vidrio y la técnica de captura en fase sólida son las técnicas más utilizadas en los estudios inmunohematológicos. Mediante estas técnicas se pueden realizar todas las pruebas serológicas de control inmunohematológico de las transfusiones sanguíneas y de la relación feto-materna, o sea, determinación de antígenos de grupos sanguíneos, inves-

tigación e identificación de anticuerpos antieritrocitarios.

Las pruebas serológicas “en tubo” representaron un avance técnico en relación con las pruebas en láminas y placas de opalina. Además, ampliaron la gama de pruebas realizadas en el laboratorio de inmunohematología y siguen utilizándose en la mayoría de los laboratorios clínicos y en bancos de sangre (Figura 13).

La ejecución de esta técnica todavía presenta aspectos básicos de no estandarización y subjetividad que pueden comprometer la calidad de los resultados:

- Variación de los volúmenes de reactivos pipeteados y de la concentración de las suspensiones celulares llevan a una variación de la relación antígeno-anticuerpo de una prueba a otra y de un servicio a otro.
- Los lavados ejecutados en las pruebas de Coombs, si son demasiados producen elución de anticuerpos, lo cual disminuye la sensibilidad de la prueba. Si son insuficientes producen resultados falso-negativos, debido a la neutralización de la antiglobulina humana (suero de Coombs) por anticuerpos libres no removidos.
- La centrifugación de los tubos en alta rotación antes de la interpreta-



Figura 13. Interpretación de los resultados de la técnica en tubo

ción de las pruebas pueden producir resultados falso-positivos.

- La interpretación de los resultados varía de un profesional a otro, principalmente si las reacciones son débiles.
- Los profesionales necesitan ser muy bien entrenados para evitar errores atribuidos a la subjetividad de las pruebas “en tubo”.

El uso de las microplacas, aunque resultó similar al reemplazo de los tubos por microtubos, representó un pequeño avance técnico de las pruebas inmunohematológicas, una vez que permitió la automatización de los procesos de ejecución e interpretación de resultados. Cuando se realiza manualmente, la técnica en microplacas presenta problemas relacionados con la subjetividad.

Las técnicas de centrifugación en columnas utilizan matrices de gel o microcuentas de vidrio en microtubos, con el propósito de atrapar glóbulos rojos aglutinados producidos por la reacción entre antígenos de la membrana eritrocitaria y anticuerpos antieritrocitarios,

después de una centrifugación en baja rotación (Figura 14).

Existen tres formulaciones básicas de matrices de gel o microcuentas de vidrio:

- Matriz neutra: solo contiene la matriz de gel-sephadex o microcuentas de vidrio, pero sin adición de anticuerpos, para detección de aglutinados producidos por anticuerpos aglutinantes. Es utilizada para la prueba inversa ABO, la investigación de anticuerpos fríos y pruebas enzimáticas.
- Matriz específica: es una mezcla de la matriz de gel-sephadex o microcuentas de vidrio con anticuerpos contra antígenos de grupos sanguíneos. Se utiliza para determinación de antígenos de grupos sanguíneos.
- Matriz antiglobulina: es una mezcla de la matriz de gel-sephadex o microcuentas de vidrio con anti-globulinas humanas y/o fracciones del complemento. Se utiliza en las pruebas de Coombs para investigación e identificación de anticuerpos antieritrocitarios incapaces de producir aglutinaciones directas.

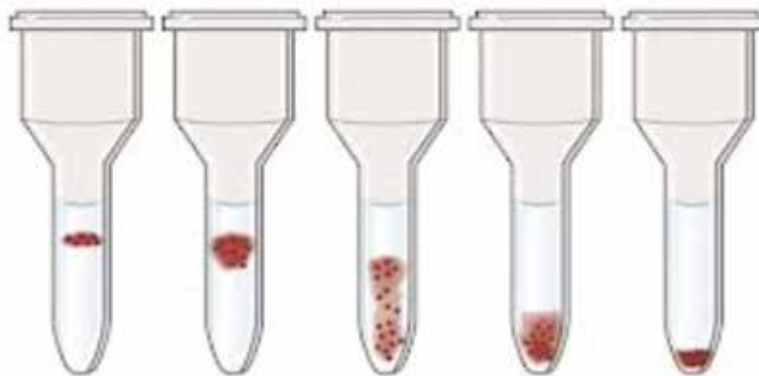


Figura 14. Interpretación de los resultados en la técnica de centrifugación en columnas

Las técnicas de centrifugación en columnas representan un avance técnico sobre la técnica “en tubos y en microplacas” por algunas razones fundamentales:

- Estandarización de procedimientos, reacciones e interpretaciones de resultados. Sin aspectos subjetivos.
- La prueba de Coombs sin lavados disminuye las posibilidades de errores técnicos, aumenta la sensibilidad de la prueba y permite el procesamiento de una gran cantidad de muestras simultáneamente.
- Utiliza bajos volúmenes de muestras (microtécnica).
- Las reacciones son estables, lo cual permite lecturas posteriores y por diferentes profesionales. Además, las reacciones pueden ser fotopiadas o leídas por lectores automáticos.
- Formación técnica muy simplificada. El entrenamiento de profesionales es rápido y seguro.
- Pueden ser automatizadas.

La técnica de captura en fase sólida es específica para la detección e identificación de anticuerpos IgG clínicamente significativos. Los reactivos celulares en forma de estroma de glóbulos rojos son fijados, en el momento

de la fabricación, a los pocillos de microplacas que contienen doce tiras con ocho pocillos cada una.

El procedimiento técnico consiste en la adición a los pocillos de una solución de baja fuerza iónica (LISS) y el plasma o suero de la muestra investigada y controles. Sigue una etapa de incubación y una de lavados. Después se añade a los pocillos, los glóbulos rojos indicadores que están cubiertos con antiglobulina anti-IgG y luego se centrifuga. Si no hay anticuerpos adheridos a los glóbulos rojos fijados en el pocillo, los glóbulos indicadores migran completamente hacia el fondo de este pocillo y el resultado es negativo. En una prueba positiva, los glóbulos indicadores forman una camada intacta sobre la superficie del pocillo (Figura 15).

La técnica de captura en fase sólida es sensible y específica en la detección de anticuerpos clínicamente significativos. No presenta aspectos subjetivos en la ejecución e interpretación de los resultados. Los procedimientos técnicos son simples y pueden ser automatizados.

Ensayos funcionales celulares en inmunohematología

Aunque sea poco frecuente, hay pacientes que presentan múltiples anti-



Figura 15. Interpretación de los resultados en la técnica de captura en fase sólida

cuerpos irregulares contra antígenos de grupos sanguíneos o anticuerpos contra antígenos de alta frecuencia, tornando difícil la obtención de unidades de glóbulos rojos compatibles. En este punto es importante determinar si todos los anticuerpos involucrados son clínicamente significativos, en vista de que algunos no son capaces de producir reacciones hemolíticas postransfusionales contra unidades de sangre antígeno positivas.

La técnica llamada Monocyte Monolayer Assay (MMA)¹⁰ es utilizada como una forma de evaluar *in vitro*, la reacción *in vivo* contra unidades de sangre incompatibles por las técnicas serológicas.

La ejecución del MMA comprende cuatro etapas:

- La separación de los monocitos autólogos a partir del plasma rico en leucocitos con el uso de una solución ligeramente hiperosmótica. Esta solución va a aumentar la osmolalidad del medio promoviendo la pérdida de agua por los leucocitos que se quedan más densos. Como los linfocitos son más sensibles que los monocitos, la diferencia de densidad entre los dos se amplía, permitiendo la obtención de monocitos puros.
- Preparación de una monocapa de monocitos en una superficie de plástico o vidrio y de una suspensión de glóbulos rojos sensibilizados con los anticuerpos a los que se desea verificar el significado clínico.
- Incubación por 1-2 horas de la mezcla de monocitos y glóbulos rojos sensibilizados. Después se hacen

lavados para la remoción de los glóbulos rojos no fijados sobre la monocapa de monocitos.

- Preparación de un extendido sobre un portaobjetos teñido con colorantes hematológicos para recuento de los monocitos con glóbulos rojos adheridos o fagocitados.

El cálculo del índice MI (Monocyte Index) es determinado por el porcentual de monocitos con glóbulos rojos adheridos o fagocitados relativos al número total de monocitos. Valores de MI iguales o inferiores al 5% indican que la sangre, aunque sea incompatible por técnicas serológicas, puede ser transfundida con bajo riesgo de reacción transfusional hemolítica.

Una variación de la técnica MMA es el Test de Quimioluminiscencia (CL)¹¹, en el que los monocitos autólogos son mezclados a los glóbulos rojos sensibilizados con el anticuerpo a ser estudiado y un compuesto orgánico llamado luminol (C₈H₇O₃N₃) con propiedades de quimioluminiscencia. Sigue una incubación a 37 °C. En el proceso de fagocitosis de glóbulos rojos sensibilizados, los monocitos producen una respuesta metabólica oxidativa y los radicales oxigenados reaccionan con el luminol produciendo luz que puede ser medida por un luminómetro. Una comparación con una mezcla hecha con glóbulos rojos no sensibilizados permite evaluar el grado de hemólisis y el significado clínico del anticuerpo antieritrocitario.

Otra técnica utilizada para evaluar el significado clínico de anticuerpos contra antígenos de grupos sanguíneos es el test *Antibody-dependent cell-me-*

diated cytotoxicity (ADCC). Glóbulos rojos marcados con cromo radiactivo (Cr^{51}) y sensibilizados con el anticuerpo antieritrocitario en estudio son mezclados con monocitos y linfocitos e incubados a 37 °C. Después se centrifuga la mezcla y se hace una búsqueda del cromo radiactivo (Cr^{51}) en el sobrenadante a través de un contador gama. La cantidad de Cr^{51} libre en el sobrenadante es proporcional a la cantidad de glóbulos rojos hemolizados.

Los tres ensayos funcionales descritos pueden ser utilizados para evaluación del significado clínico de anticuerpos contra antígenos de grupos sanguíneos en transfusiones sanguíneas y en la relación feto-materna.

El complemento

El sistema del “Complemento” se compone de una serie compleja de aproximadamente veinte proteínas plasmáticas que funcionan como enzimas o proteínas de unión y que desempeñan un papel esencial en la defensa del or-

ganismo contra agentes infecciosos y en los procesos inflamatorios.¹²

Además de las proteínas plasmáticas, el sistema del complemento incluye múltiples receptores de membrana en células del sistema inmune que reconocen fracciones específicas del complemento. Otras proteínas de membrana con funciones reguladoras (DAF, MIRL) previenen el ataque del complemento contra células autólogas.

Las tres principales actividades biológicas del complemento son (Figura 16):

- Oponización por la adhesión de fracciones del complemento a las membranas celulares, lo cual facilita la fagocitosis del antígeno.
- Activación de células del sistema inmune (por ejemplo, macrófagos) por moléculas con actividad inflamatoria como C3a y C5a, que son anafilotoxinas liberadas en el plasma sanguíneo durante el proceso de activación del complemento.
- Lisis de células blanco (citólisis).



Figura 16. Principales actividades biológicas del complemento

Hay dos vías de activación del complemento: clásica y alternativa. Por la vía clásica, la activación se produce por “complejos antígeno-anticuerpo” siendo los anticuerpos de clase IgM o de las subclases IgG1, IgG3, y en menor grado IgG2. La vía alternativa de activación del complemento no es dependiente de anticuerpos y es activada principalmente por microorganismos invasores, para constituirse en una defensa innata contra las infecciones bacterianas. Entonces, tenemos dos vías de clivaje de la proteína C3, lo que representa el evento central en el proceso de la activación del sistema del complemento. Las dos vías generan una enzima “C3 convertasa”, que convierte C3 a C3b, que a su vez activa la secuencia terminal C5 hasta C9 del complemento que es capaz de provocar la lisis celular (citólisis).

Haremos una breve descripción de las vías clásica y alternativa de activación del sistema del complemento:

- Vía clásica (en la presencia de anticuerpos)

Por esta vía, la primera etapa de la activación del complemento es representada por la fijación del complejo proteico C1 (C1qrs) por las inmunoglobulinas (IgM, IgG1, IgG2 e IgG3) ligadas a sus antígenos específicos. El subcomponente C1q del complejo C1 se une directamente a la inmunoglobulina por los carbohidratos presentes en su fracción “Fc”. Se necesitan al menos dos moléculas de IgG o una sola molécula de IgM para la fijación de C1 (Figura 17).

A continuación, el complejo activado C1qrs cliva la proteína C4 en el plasma cerca del sitio catalítico C1s, liberando el fragmento C4a. El fragmento principal C4b se une a C2, que a su vez es también clivado por C1s, liberando el fragmento C2b. El principal fragmento C2a permanece unido al C4b para formar la “C3 convertasa” (C4b2a).

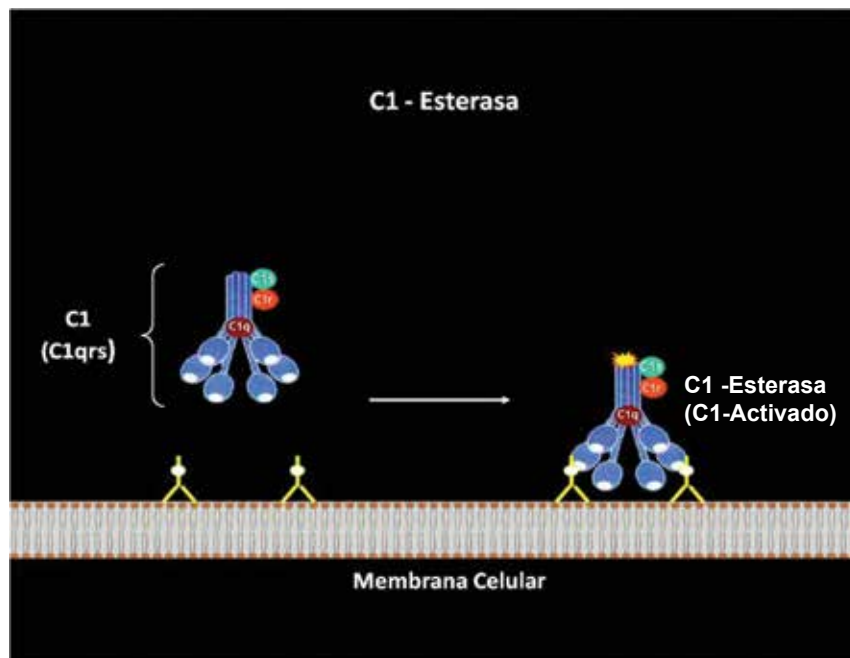


Figura 17. Fijación de la C1-esterasa

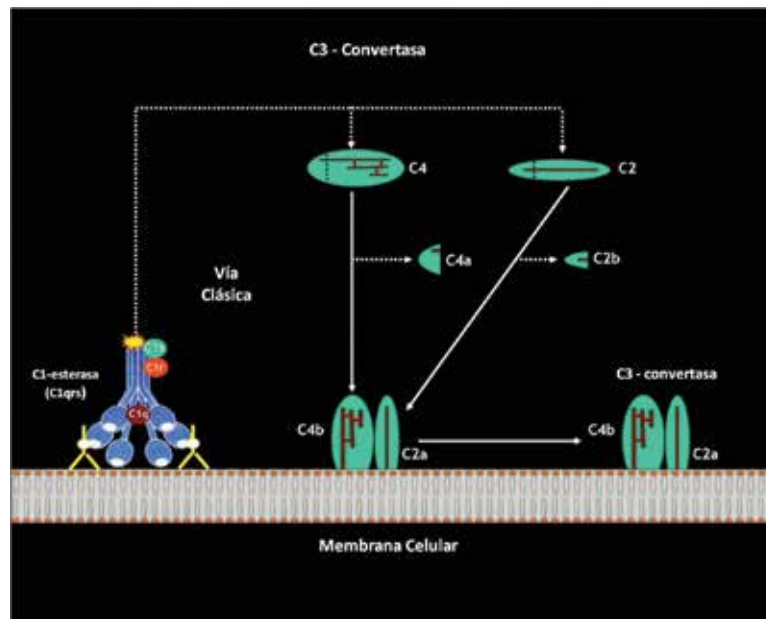


Figura 18. Formación de la C3-convertasa

La C3 convertasa es la enzima central en el proceso de la activación del complemento, una vez que cliva la proteína más abundante del sistema del complemento llamada C3 (Figura 18). Como resultado del clivaje se producen fracciones C3a, que es una anafilatoxina, y C3b, que es capaz de opsonizar membranas celulares

y complejos inmunes para que sean reconocidos por macrófagos con receptores de C3b. Además, la C3-convertasa se une aleatoriamente a una molécula de C3b para formar la C5-convertasa (Figura 19), la cual va a iniciar la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b, C6, C7, C8 y múltiples C9).

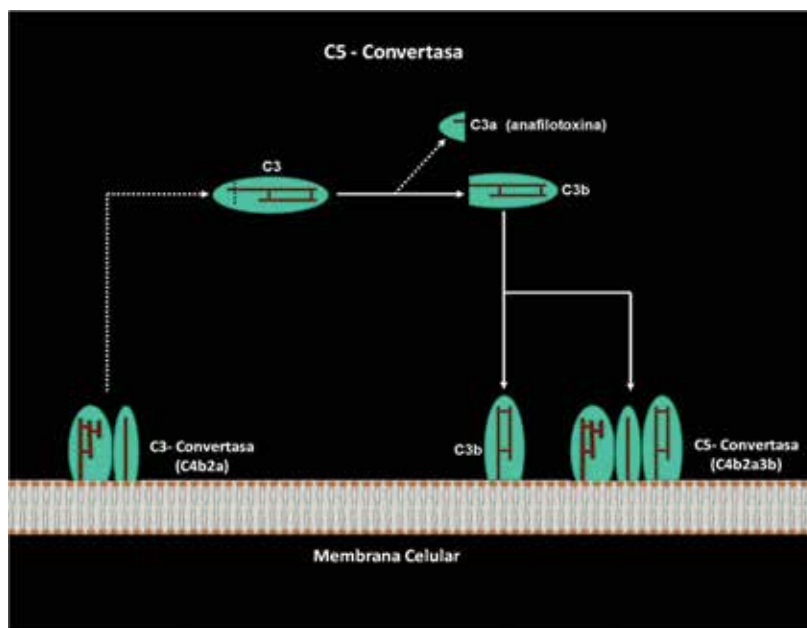


Figura 19. Formación de la C5-convertasa

La “C5-convertasa” (C4b2a3b) actúa sobre C5, clivando esta proteína en C5a, que es una anafilatoxina, y C5b que se une a la membrana celular, creando la base sobre la cual se construye el complejo de ataque a la membrana (Figura 20).

En la etapa de formación del complejo de ataque a la membrana, la unión secuencial de C6, C7 y C8 sobre C5b forma el complejo estable C5b678

que rompe la membrana celular. A continuación, varias moléculas de C9 se fijan sobre la fracción C8, que ya está introducida en la matriz de fosfolípidos de la membrana y se polimerizan aumentando el diámetro del poro creado por C8 (Figura 21). Estos poros en la membrana celular permiten el intercambio de contenidos extra e intracelulares, causando la lisis celular (hemólisis en el caso de los glóbulos rojos).

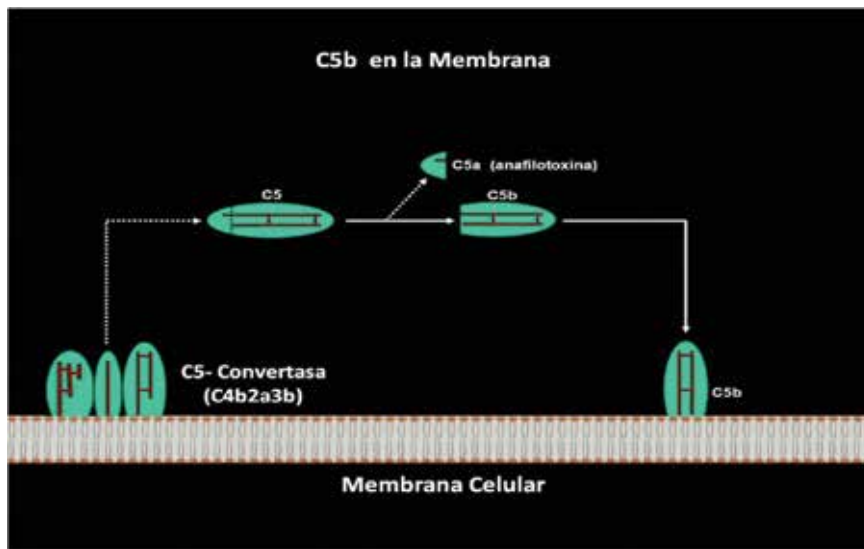


Figura 20. Fijación de la fracción C5b

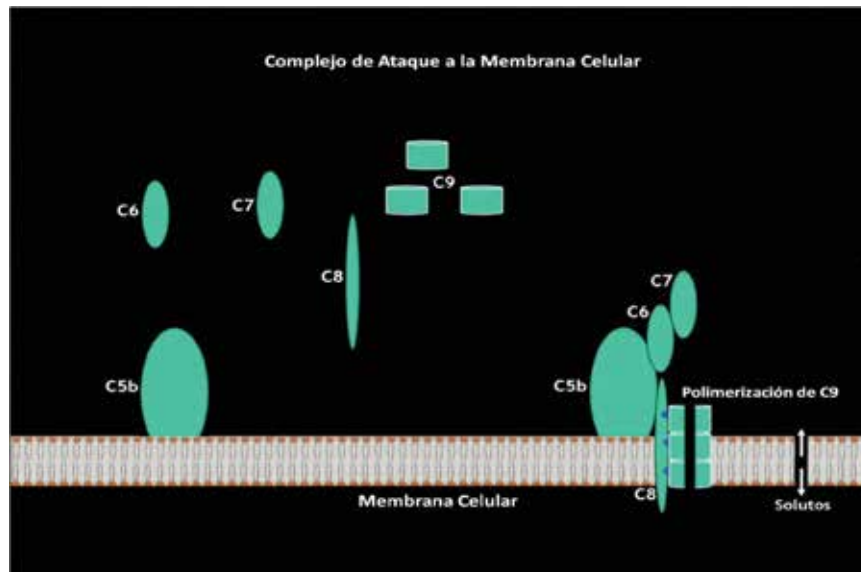


Figura 21. Formación del complejo de ataque a la membrana

- Vía alternativa (en la ausencia del complejo Ag-Ac)

El sistema del complemento también puede ser activado en la ausencia de un complejo anticuerpo-antígeno. La activación a través de la vía alternativa se inicia por sustancias tales como lipopolisacáridos, en las membranas de los microorganismos (LPS), polisacáridos (zymosan, inulina), agregados de inmunoglobulinas, endotoxinas de bacterias gram-negativas, veneno de serpientes, entre otras, que son reconocidas por moléculas circulantes C3 activadas fisiológicamente por hidrólisis ($C3 + H_2O$).

El C3 hidrolizado tiene actividad similar al C3b (C3b-like) y se combina con una glicoproteína rica en glicina llamada “factor B”, para formar una proenzima de fase fluida, la C3bB. Cuando una proteasa llamada “factor D” cliva la proteína B de la proenzima C3bB, libera un pequeño fragmento “Ba” y genera una C3-convertasa (C3bBb) de fase fluida.

La presencia de sustancias activadoras, tales como microorganismos invasores, estimula todo el proceso. Una mayor producción de C3 hidrolizado (C3b-like), con el consecuente aumento en la producción de la proenzima C3bB, aumenta la cantidad de sustrato para el factor D, llevando a un aumento de la concentración de C3-convertasa fluida (C3bBb). Esta enzima produce más C3b por clivaje de las moléculas de C3. Cada C3b generado potencialmente puede formar más C3-convertasa y por lo tanto más C3b.

Como el C3b reconoce lipopolisacáridos (LPS) de la membrana, moléculas de C3b y de C3-convertasa (C3bBb) se

fijan sobre los microorganismos invasores. Las moléculas de C3b fijadas permiten el reconocimiento de los microorganismos por las células fagocíticas con receptores para C3b. Además, las C3-convertasas (C3bBb) sobre las membranas de los microorganismos invasores inician un proceso de clivaje de C3 alrededor de ellos, aumentan la cobertura opsónica de C3b y permiten la formación de la C5 convertasa por la combinación de C3-convertasa con otra molécula de C3b (C3bBbC3b).

Una vez formada la C5 convertasa, se producen complejos de ataque (C5b6789) a las membranas de los microorganismos, con la consecuente lisis celular, como en la vía clásica (Figura 22).

Control de la actividad del complemento

La actividad del complemento debe ser controlada para evitar la producción excesiva de mediadores inflamatorios y daños celulares. Proteínas plasmáticas y de membrana participan de este control e interactúan en alguna etapa del proceso de activación del complemento.

La actividad reguladora de las proteínas plasmáticas, tales como las serino-proteasas “factor H” y “factor I”, produce un clivaje de una de las cadenas del C3b fijado sobre la membrana celular, y cambia su estructura. Este C3b cambiado es reconocido por “enzimas tríplicas” que sacan del C3b un fragmento mayor llamado C3c. El fragmento más pequeño, C3d, permanece pegado a la membrana celular (unión covalente), pero no es reconocido por

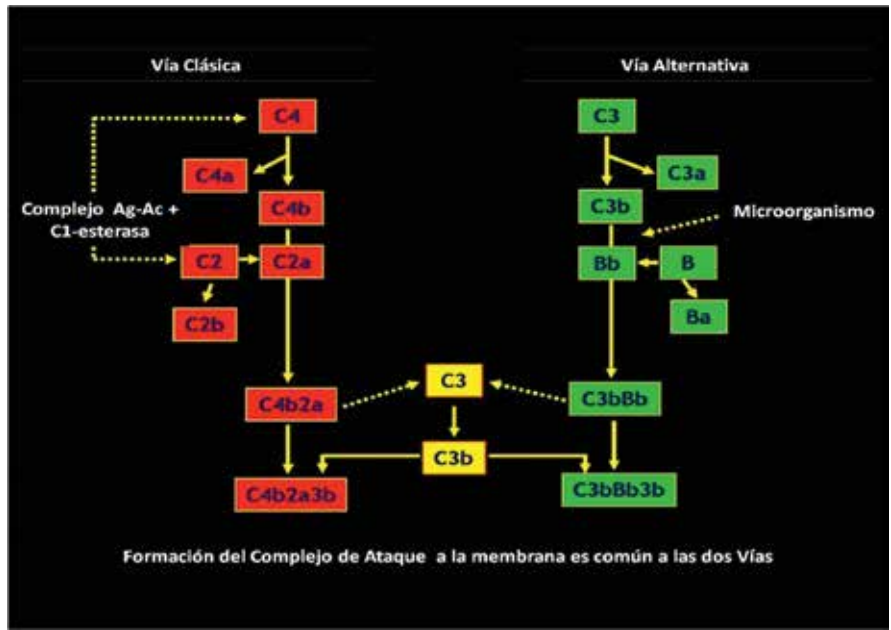


Figura 22. Formación de la C3-convertasa en la vía alternativa

los macrófagos con receptores de C3b (Figura 23).

Algunas proteínas de membrana, tales como CR1, DAF y MIRL, también son reguladoras de la actividad del complemento.¹³

La CR1 (Complement Receptor 1), también llamada CD35, es una glico-

proteína de membrana que pasa una vez (paso único) a través de la matriz de fosfolípidos, y presenta, en su región extracelular, alrededor de treinta secuencias peptídicas repetitivas de aproximadamente 60 aminoácidos en cada una, capaz de reconocer las fracciones C3b y C4b del complemento

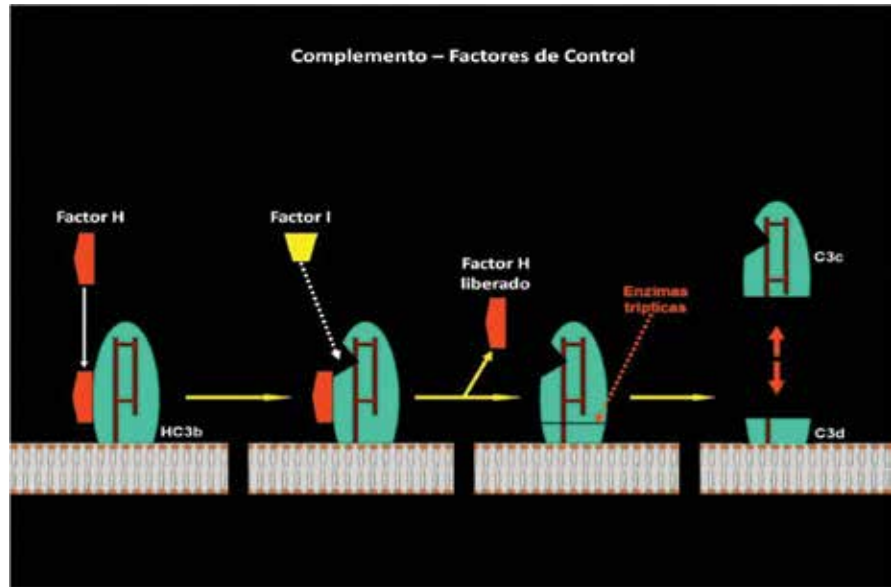


Figura 23. Actividad reguladora de serino-proteasas plasmáticas

(Figura 24). Su función principal es reconocer los complejos inmunes circulantes opsonizados por las fracciones activas C3b y C4b del complemento, y transportarlos hacia el hígado y el bazo para que sean eliminados de la circulación sanguínea, ya que los complejos inmunes circulantes pueden ser extremadamente peligrosos. Ellos son capaces de depositarse sobre el endotelio de los vasos sanguíneos, fijar el complemento sobre estas células y producir lesiones y cuadros de coagulación intravascular diseminada (CIVD) con eventos trombóticos graves. La presencia de CR1 en neutrófilos y linfocitos B es abundante, con alrededor de 40.000 copias por membrana. Los glóbulos rojos presentan un número de copias que puede ser inferior a 1.000/membrana. Puntos de polimorfismo en su estructura peptídica, por simples cambios

de aminoácidos, producen los antígenos del sistema de grupo sanguíneo “Knops” (ISBT: 022 - KN).

La proteína DAF (*Decay Accelerating Factor*) o CD55 es una glicoproteína periférica y externa a la membrana celular, con peso molecular de aproximadamente 70 kDa. Está presente en los glóbulos rojos y otras células como leucocitos, plaquetas, endotelio e incluso solubles en el plasma y en la orina. Es formada por cuatro secuencias peptídicas repetitivas de aproximadamente 60 aminoácidos en cada uno y una secuencia de 67 a 70 aminoácidos, rica en serina y treonina. Está ligada a la membrana celular por un ancla de “glicosilfosfatidilinositol” (GPI). Su función es proteger las células autólogas contra el ataque del complemento, cuando es activado por la vía clásica o la alternativa, promoviendo la degradación acelerada

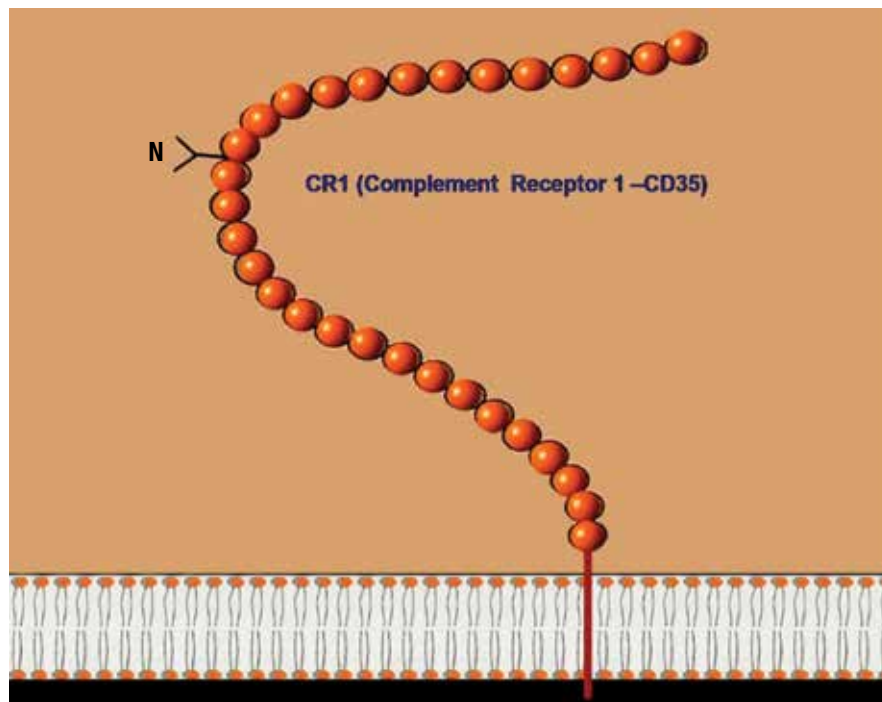


Figura 24. Proteína CR1 (CD35) de reconocimiento de las fracciones C3b y C4b del complemento

de la enzima C3-convertasa (Figuras 25a y 25b).

Puntos de polimorfismo en su estructura peptídica, por simples cambios de aminoácidos, producen los antígenos del sistema de grupo sanguíneo “Cromer” (ISBT: 021 - CROM).

La MRL (*Membrane Inhibitor of Reactive Lysis*) o CD59 es una glicoproteína membranar externa, con un peso molecular de 18 kDa a 20 kDa y una secuencia peptídica de 128 aminoácidos, ligada a un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Está presente en las cé-

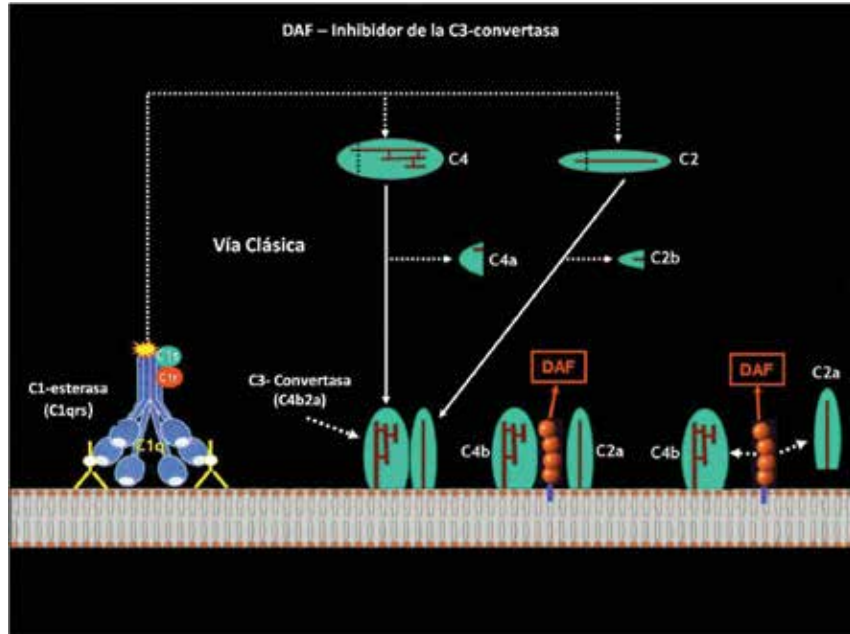


Figura 25a. Inhibición de la C3-convertasa por DAF en la vía clásica

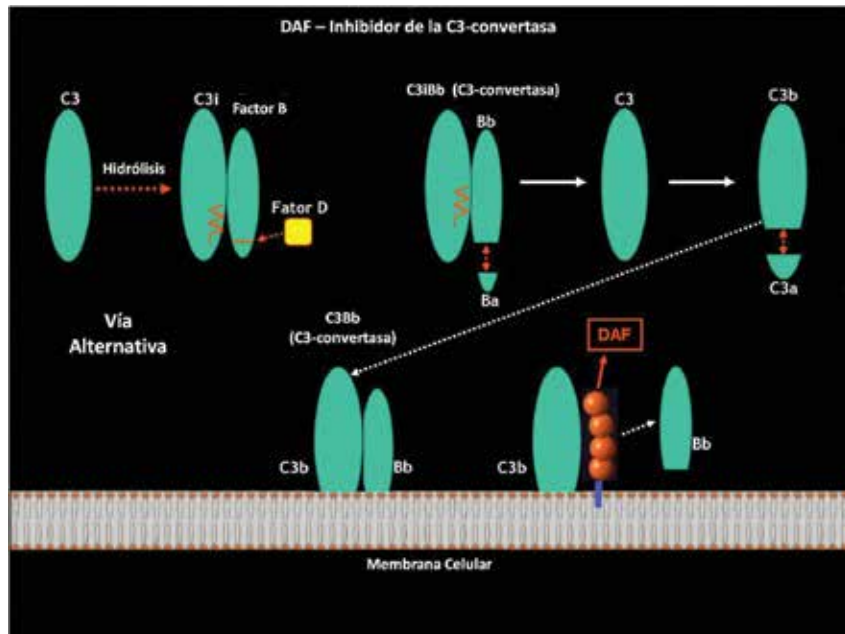


Figura 25b. Inhibición de la C3-convertasa por DAF en la vía alternativa

lulas hematopoyéticas y también en las células epiteliales del riñón, páncreas, pulmones y glándulas salivales. La MIRL (CD59) protege las células autólogas contra la actividad lítica del complemento, al unirse a C8 en los sitios de unión de moléculas C9, evitando la inserción de estas moléculas o mediante la unión a moléculas de C9 ya fijadas

sobre C8, impidiendo su polimerización (Figura 26).

La ausencia del ancla GPI en la membrana del glóbulo rojo, con la consecuente ausencia de proteínas DAF y MIRL, provoca un cuadro de “hemoglobinuria paroxística nocturna” de tipo III (HPN III) con una alta sensibilidad a la lisis por el complemento.

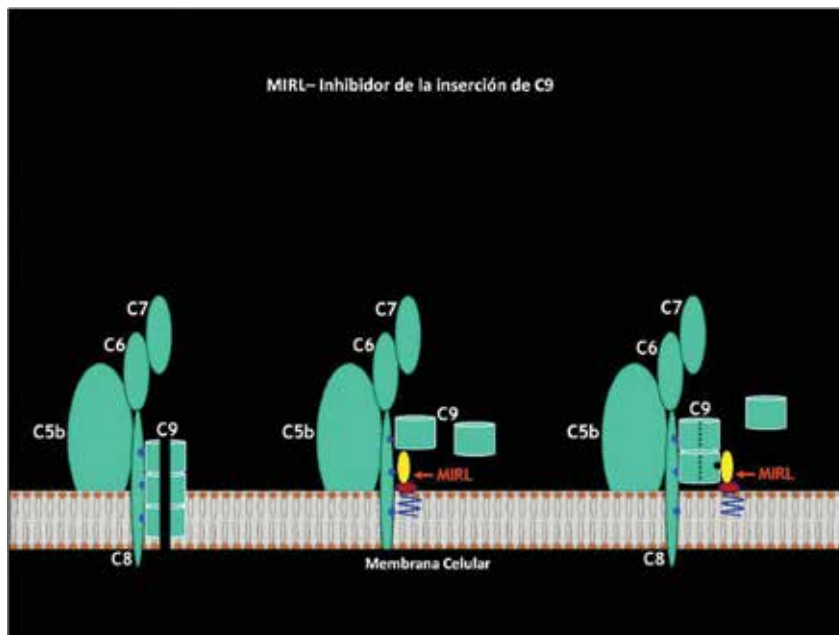


Figura 26. Inhibición de la inserción y de la polimerización de C9 por la MIRL

Referencias

1. Roitt, I., Brostoff, J., Male D. *Imunología*. 4ª Ed. São Paulo: Manole, 1997.
2. Shlomchik, M.J. *Mecanismos de Immune Self-Tolerance and How They Fail in Autoimmune Disease*. Bethesda, Maryland: AABB, 1996.
3. Zeta-Meter, Inc. *Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes*. USA: Staunton, VA 24402.
4. Rouger, P.H., Salmon, Ch. *La Pratique de l'agglutination des érythrocytes et le test de Coombs*. Paris: Masson, 1981.
5. Pollack, W., Hager, H. J., Reckel, R., Toren, T. A., Singher, H. O. A study of the forces involved in the second stage of hemagglutination. En: *Transfusion (Phila)* 1965; 5:158-183.
6. Pollack, W., Reckel, R. P. The Zeta Potential and Hemagglutination with Rh Antibodies: A Physicochemical Explanation. *Ortho Research Foundation, Raritan, N.J. Int Arch Allergy* 1970; 38:482-496 (DOI:10.1159/000230301).
7. Hoyer, L. W., Trabold, N. C. The Significance of Erythrocyte Antigen Site Density. I-Hemagglutination. *The Journal of Clinical Investigation*. 1970; 49:87-95.

8. Voak, D., Cawley, J. C., Emmines, J. P., Barker, C. R. The Role of Enzymes and Albumin in Hemagglutination Reaction. *Vox Sanguinis*, 1974, 27:156-170.
9. Rouger, P. H., Hertel, F., Andreu, G., Cartron, J. P., Salmon, C. H. Étude Critique du Test de Coombs à Basse Force Ionique: Sa Place Dans La Sécurité Immunologique des Transfusions. *Rev. Française Transf. et Immunohémat.* 1980, 23:7-16.
10. Arndt, P.A, Garraty G. Retrospective analysis of the value of monocyte monolayer assay results for predicting clinical significance of blood group alloantibodies. *Transfusion* 2004, 44:1273-81.
11. Leger, R. M. In vitro cellular assays and other approaches used to predict the clinical significance of red cell alloantibodies: a review. *Immunohematology*, 2002, 18: 65-70.
12. Chaplin, J. R. Review: the burgeoning history of the complement system 1888-2005. *Immunohematology*, 2005, 21:85-93.
13. Meri, S., Jarva, H. Complement Regulatory Proteins. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001 Nature Publishing Group. Disponible en: www.els.net

La prueba de la antiglobulina (test de Coombs)

VIRGINIA CALLAO MOLINA*
LUISA MÁS CASTAÑO**
ISABEL TERRÓN SÁEZ***

La antiglobulina humana

La antiglobulina humana (AHG) o suero de Coombs (Figura 1) fue desarrollado en el año 1945 por Coombs, Mourant y Race, con el fin de detectar los anticuerpos eritrocitarios incapaces de producir aglutinación eritrocitaria por sí solos (anticuerpos incompletos).¹

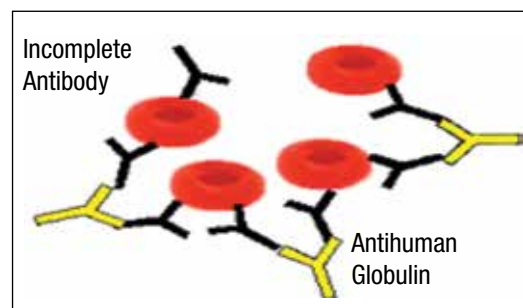


Figura 1. Suero de Coombs

* Médico especialista en Hematología y Hemoterapia. Doctora en Medicina y Cirugía. Jefe de sección Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. callao_vir@gva.es

** Técnico especialista de laboratorio. Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. luisamascastanyo@gmail.com

*** Técnico especialista de laboratorio. Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. isabeleta.terron@hotmail.com

Los anticuerpos eritrocitarios son gammaglobulinas, predominantemente de clase IgG o IgM. Los anticuerpos de clase IgM son capaces de sensibilizar los hematíes suspendidos en salina, cuando reconocen un antígeno específico en su membrana, y producir posteriormente aglutinación directa de los hematíes adyacentes (anticuerpos completos). (Figura 2a). Por el contrario, los anticuerpos de clase IgG son capa-

ces de unirse a los hematíes, pero no de producir aglutinación por sí solos (anticuerpos incompletos).² (Figura 2b).

Coombs y su equipo postulaban que la inyección de suero humano a un animal de laboratorio inducía el desarrollo de anticuerpos frente a las globulinas humanas. Estos anticuerpos podían ser utilizados más adelante para el reconocimiento específico de estas globulinas (Figura 3).

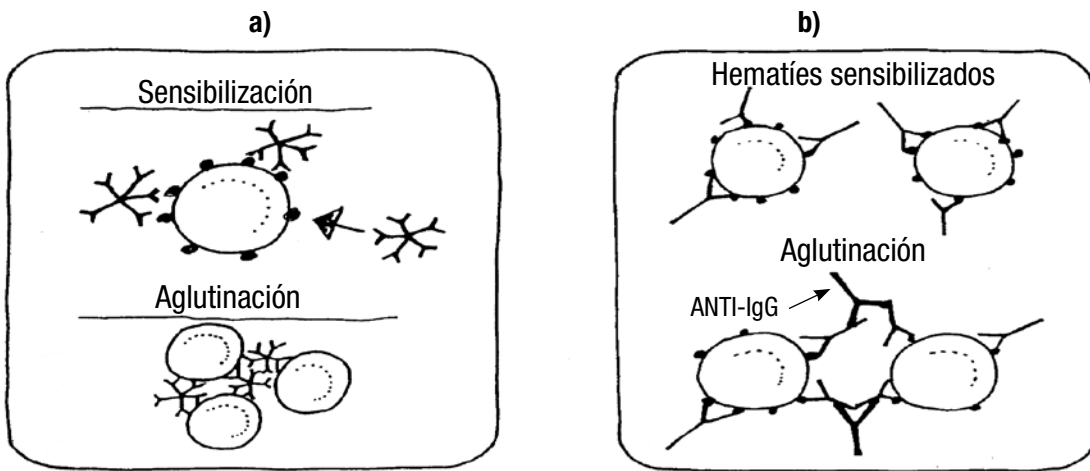


Figura 2. a) Anticuerpos IgM (completos). b) Anticuerpos IgG (incompletos)

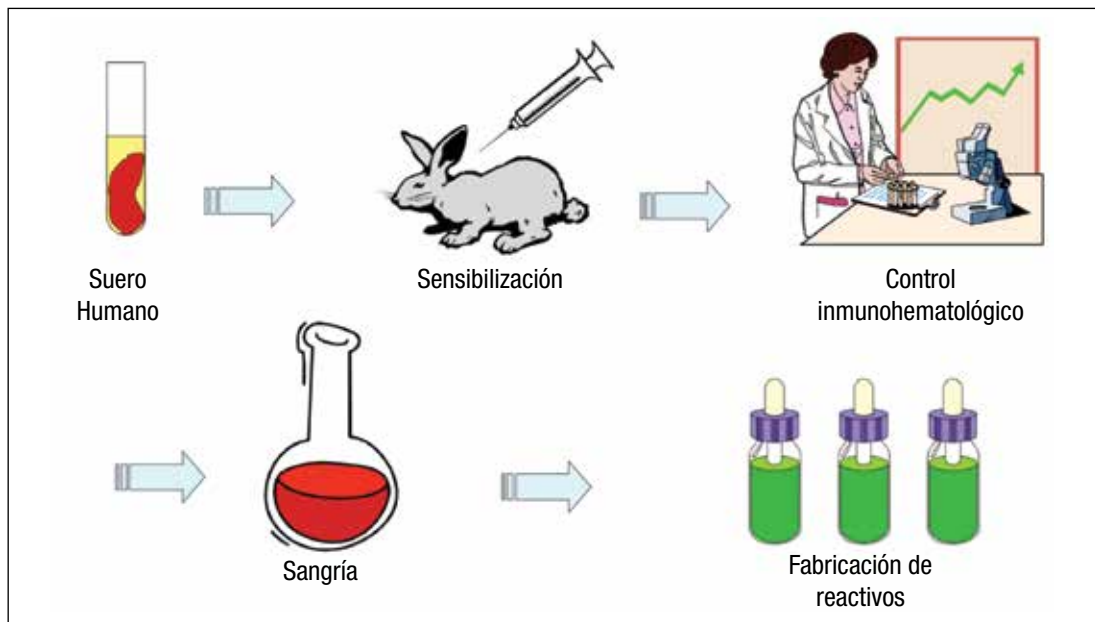


Figura 3. Producción de antglobulina humana

Posteriormente, se consiguió obtener suero antiglobulina de origen monoclonal, carente de anticuerpos heterófilos, basado en la tecnología de los hibridomas.

La AHG se une, a través de sus fragmentos Fab, a la porción Fc (cadenas pesadas) de los anticuerpos que han sensibilizado los hematíes (Figura 4). Los dos fragmentos Fab ayudan a formar un puente entre anticuerpos adyacentes, lo que permite visualizar la aglutinación.

La misma reacción se produce cuando los hematíes están recubiertos por otras proteínas (Ej. proteínas del sistema del complemento), siempre

que el suero antiglobulina posea dicha reactividad (Figura 5).

La intensidad de la aglutinación observada suele ser proporcional a la cantidad de globulinas unidas a los hematíes.

En los reactivos policlonales es frecuente que haya anticuerpos que reconocen las cadenas ligeras de los anticuerpos humanos, lo que puede ser una ventaja en caso de los reactivos poliespecíficos, ya que se favorece la aglutinación eritrocitaria. Sin embargo, en el reactivo monoespecífico anti-IgG puede ser un problema, pues como las cadenas ligeras son compartidas por el resto de inmunoglobulinas, puede dar lugar a falsos positivos.

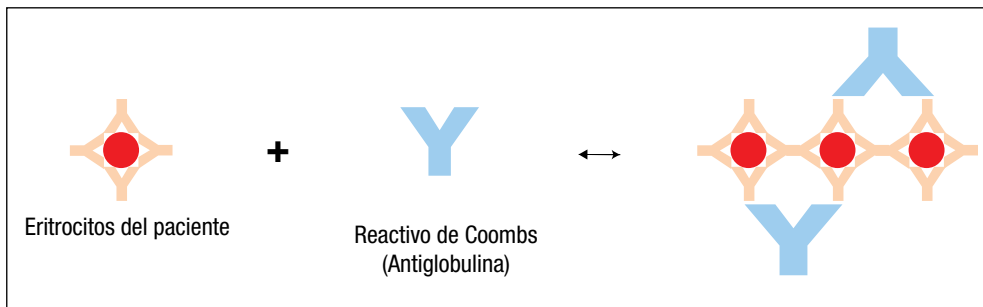


Figura 4. Reacción de la antiglobulina (IgG)

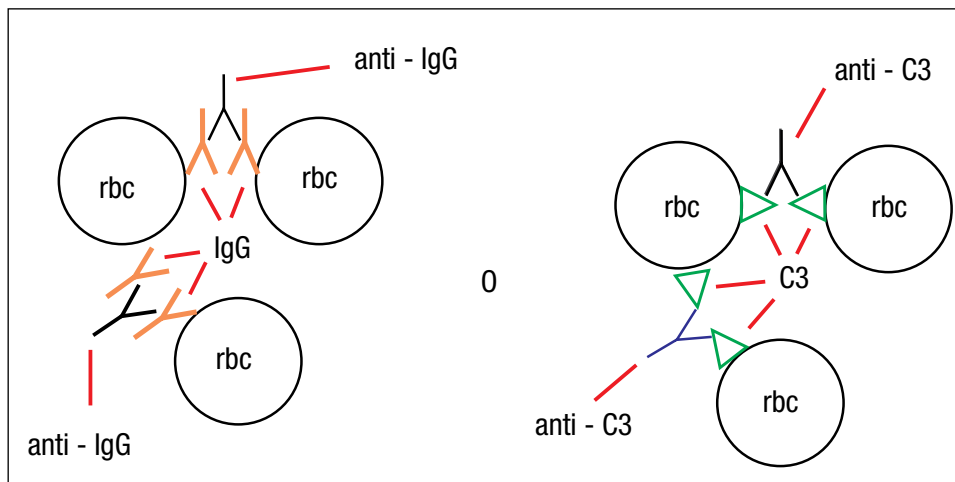


Figura 5. Antiglobulina anti-IgG y anti-C3

Papel del complemento en las reacciones de antiglobulina

Los componentes del complemento pueden unirse a la membrana de los hematíes, *in vivo* o *in vitro*, por diferentes mecanismos:³

1. Activación del complemento asociada a la unión de anticuerpos eri-

trocitarios con su antígeno específico (Figura 6).

2. En el plasma pueden existir inmunocomplejos, no específicos de los antígenos eritrocitarios, que activan el complemento, por lo que algunas de sus fracciones se unen de forma inespecífica a los hematíes (“espectador inocente”).

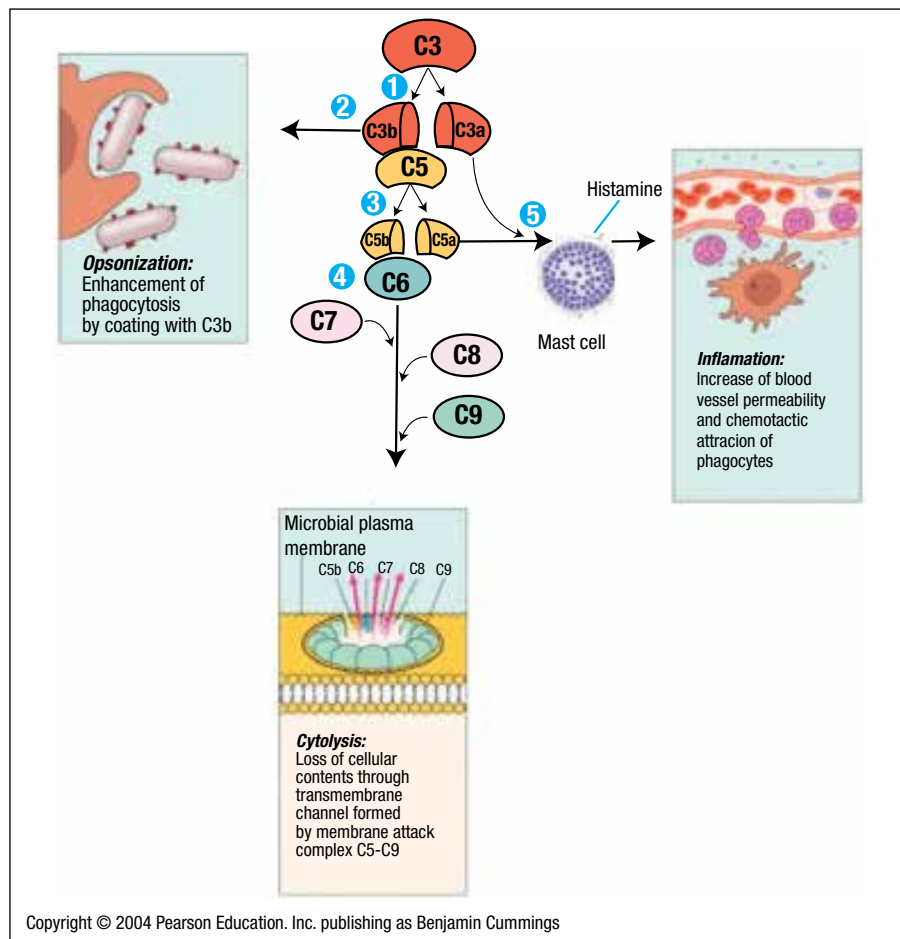


Figura 6. Activación del sistema de complemento

Los hematíes recubiertos de complemento no siempre sufren un proceso de hemólisis. Si la cascada no se completa, la presencia de componentes (sobre todo C3 y a veces C4) puede ser detectada por los reactivos anticomplemento (Figura 7).

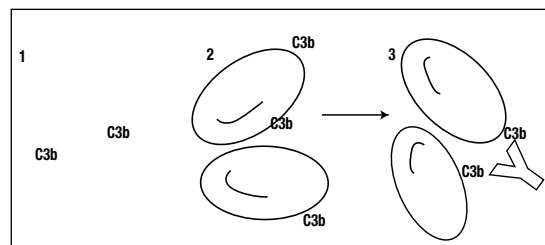


Figura 7. Antiglobulina anticomplemento

Reactivos antiglobulina humana

Es posible obtener AHG con diferentes especificidades, que puedan unirse tanto a inmunoglobulinas como a fracciones del complemento. Con base en ello actualmente existen diferentes reactivos de antiglobulina (Figura 8):

- Poliespecífica: detecta inmunoglobulinas y /o fracciones del complemento
- Monoespecífica: detecta solo una proteína (IgG, C3, IgM, IgA...)

La FDA (*Food and Drug Administration*) ha establecido las definiciones para una variedad de reactivos de antiglobulina humana (Tabla 1).

Los antisueros específicos frente a otras inmunoglobulinas (IgA, IgM) o subclases (IgG1, IgG3, etc) existen, pero

no suelen estar estandarizados para técnicas de rutina en tubo, y deben ser utilizados con rigurosos controles.⁴

Antiglobulina poliespecífica

Los reactivos poliespecíficos se utilizan para la realización de la prueba directa de antiglobulina (PDAG), con el fin de identificar anticuerpos irregulares y pruebas de compatibilidad.

Estos reactivos contienen anticuerpos frente a IgG y la fracción C3d del complemento, de origen humano. Pueden incluir otros anticuerpos, como anti-C3b, C4b y C4d.

Los reactivos comerciales disponibles actualmente tienen muy poca actividad frente a las cadenas pesadas de IgA e IgM. Sin embargo, algunos reactivos reaccionan con las moléculas de

Tabla 1. Reactivos antiglobulina humana, según la FDA

Designación del reactivo	Definición
Anti-IgG, -C3d; Poliespecífico	Contiene anti-IgG y anti-C3d (puede contener otros anticuerpos anticomplemento o antiinmunoglobulina).
Anti-IgG	Contiene anti-IgG sin actividad anticomplemento (no necesariamente específico frente a cadenas gamma).
Anti-IgG; cadenas pesadas	Contiene únicamente anticuerpos reactivos frente a cadenas gamma humanas.
Anti-C3b	Contiene únicamente anticuerpos anti-C3b, sin actividad antiinmunoglobulina.
Anti-C3d	Contiene únicamente anticuerpos anti-C3d, sin actividad antiinmunoglobulina.
Anti-C4b	Contiene únicamente anticuerpos anti-C4b, sin actividad antiinmunoglobulina.
Anti-C4d	Contiene únicamente anticuerpos anti-C4d, sin actividad antiinmunoglobulina.

IgA e IgM, porque la mezcla poliespecífica puede reconocer cadenas ligeras kappa y lambda, presentes en todas las clases de inmunoglobulinas.

Dado que los anticuerpos de mayor significado clínico son de clase IgG, la función más importante de la AHG poliespecífica, en la mayoría de técnicas, es detectar este tipo de anticuerpos incompletos.

El componente anticomplemento tiene una utilidad más limitada en las pruebas de compatibilidad y en el estudio de anticuerpos irregulares, ya que los anticuerpos detectables únicamente por su habilidad de unirse al complemento, son raros. En contra de esta opinión está el trabajo publicado en *Transfusión* por Howard y col,⁵ en el que defienden la utilización de antiglobulina anticomplemento en el estudio de anticuerpos frente a los antígenos del sistema Kidd, ya que en ocasiones (23% de casos) estos anticuerpos, clínicamente muy significativos, solo se detectan en fase de complemento.

Sin embargo, la actividad anti-C3d es importante en el estudio de la prueba directa de antiglobulina, especialmente en la investigación de la anemia hemolítica autoinmune (AHAI). En algunos pacientes con AIHA, C3d puede ser la única globulina detectable en la membrana de los hematíes.

Reactivos antiglobulina monoespecíficos

Los antisueros monoespecíficos de origen animal son policlonales. Se pueden obtener reactivos monoespecíficos monoclonales a través de la tecnología de hibridomas.

Los más utilizados son anti-IgG y anti-C3d. Se emplean cuando la prueba directa de antiglobulina es positiva con el reactivo poliespecífico, con el fin de caracterizar las proteínas implicadas.

En los casos de pacientes con sospecha de anemia hemolítica autoinmune, en los que la PDAG es negativa (2%-10%), está indicada la utilización de antisueros anti-IgM y anti-IgA.⁴

Anti-IgG

Los reactivos etiquetados como “anti-IgG” no tienen actividad anticomplemento. Su componente principal es un anticuerpo que reconoce las cadenas pesadas gamma humanas, pero también pueden exhibir cierta reactividad frente a las cadenas ligeras, que son comunes a todas las clases de inmunoglobulina. Eso supone que un reactivo anti-IgG, siempre que no esté marcado como “específico de cadenas pesadas”, debe considerarse teóricamente capaz de reaccionar con las cadenas ligeras de IgA o IgM. Por tanto, una prueba directa positiva por IgG no demuestra en definitiva que la proteína implicada sea IgG, si bien es cierto que es extremadamente raro que *in vivo* exista unión de anticuerpos IgA o IgM, en ausencia de IgG.

Muchos técnicos prefieren utilizar el reactivo monoespecífico anti-IgG, en lugar del poliespecífico, en las pruebas de compatibilidad y en los estudios de anticuerpos irregulares, para evitar la interferencia del complemento debido a la presencia de crioaglutininas que no son clínicamente significativas.

Anti-C3b, C3d

Los reactivos anti-C3b, C3d no tienen actividad frente a las inmunoglobuli-

nas humanas, y posiblemente reconocen cualquier fracción de C3 que esté recubriendo la membrana de los hematíes.

El test de Coombs es, por tanto, la base de dos pruebas fundamentales en Inmunohematología:

- Prueba directa de antiglobulina o test directo de Coombs
- Prueba indirecta de antiglobulina o test indirecto de Coombs

Prueba directa de antiglobulina o Test directo de Coombs

Objetivo

Estudiar la unión antígeno-anticuerpo producida *in vivo*, permite detectar la presencia de inmunoglobulinas y/o fracciones del complemento adheridas *in vivo* a los hematíes.

Indicaciones

Es una prueba diagnóstica, básica para el estudio de los procesos hemolíticos inmunes.^{5,6}

Su utilización está indicada en los siguientes casos:

- Tras el hallazgo de un **autocontrol reactivo** en el estudio de anticuerpos irregulares: puede deberse a la presencia de anticuerpos en la membrana eritrocitaria (autoanticuerpos o aloanticuerpos en el contexto de una reacción serológica postransfusión).
- En el estudio de **anemia hemolítica autoinmune**: como ayuda en el diagnóstico junto a los parámetros analíticos de hemólisis y los datos clínicos del paciente. En estos casos es importante conocer la clase de proteína implicada, dado que tiene valor en el diagnóstico (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de la anemia hemolítica autoinmune
(Classification of immune hemolytic anemias)

Autoimmune hemolytic anemias (AIHAs)
Warm antibody AIHA
Idiopathic
Secondary (e.g., chronic lymphocytic leukemia, lymphomas, systemic lupus erythematosus)
Cold agglutinin syndrome
Idiopathic
Secondary
Nonmalignant disorders (e.g., mycoplasma pneumoniae infection, infectious mononucleosis, other virus infections)
Malignant disorders (e.g., lymphoproliferative disorders)
Paroxysmal cold hemoglobinuria
Idiopathic
Secondary
Viral syndromes
Syphilis
Combined cold and warm AIHA ("mixed AIHA")
Atypical AIHA
AIHA with a negative direct antiglobulin test
Warm antibody AIHA caused by IgM or IgA autoantibodies
Drug-induced immune hemolytic anemia
Drug-related antibody identifiable
Drug-induced AIHA
Alloantibody-induced immune hemolytic anemia
Hemolytic transfusion reactions
Hemolytic disease of the fetus and newborn

- En el estudio de **reacción hemolítica postransfusional**: si la PDAG es negativa en la muestra pretransfusional y positiva en la muestra postransfusional, se debe descartar un proceso hemolítico aloinmune frente a los hematíes recién transfundidos.
- En el estudio de la **enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido**: como ayuda en el diagnóstico junto al estudio de la madre y los datos clínicos y analíticos del niño. En este caso la proteína implicada es de clase IgG.
- En el estudio de una **prueba cruzada incompatible** en un paciente con un estudio de anticuerpos irregulares negativo: hallazgo de una PDAG positiva en el donante.
- En el estudio de **donantes** con SCR positivo o con Rh(D) negativo, pero positivo en técnica de antiglobulina: hallazgo de una PDAG positiva en el donante.

Fundamento

Se obtiene sangre del paciente a estudio y, tras realizar un lavado para retirar posibles anticuerpos presentes en el plasma, se enfrentan los hematíes con el suero de antiglobulina. Si los hematíes presentan inmunoglobulinas y/o fracciones del complemento en su membrana, se producirá una aglutinación visible y la prueba se considerará positiva. En caso contrario, la prueba será negativa (Figura 8).

La concentración de IgG y/o complemento, en la membrana de los hematíes requerida para que la PDAG sea positiva, es variable, y depende de las características de los hematíes, la afinidad de los anticuerpos, la antiglobulina utilizada y la sensibilidad del método con el que se trabaja. De acuerdo con Garraty y col.,¹ el umbral para la detección de IgG varía de 120 moléculas/hematíe a 500 moléculas/hematíe y para C3d, de 400 moléculas/hematíe a 1000 moléculas/hematíe (valores aproximados).

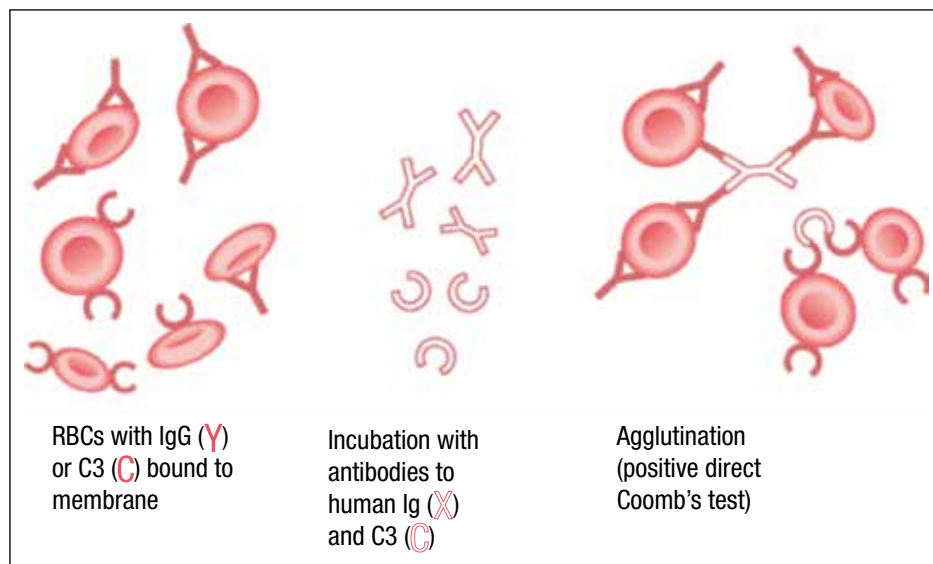


Figura 8. Test directo de antiglobulina poliespecífica

Métodos

Existen distintos **métodos** para realizar la prueba directa de Coombs:

Método de tubo

Obtener una muestra de hematíes, realizar varios lavados, añadir la AHG, centrifugar y realizar la lectura (Figura 9).

Inicialmente, se utiliza el reactivo poliespecífico. Si el test es positivo, se repite utilizando reactivos monoespecíficos para valorar el tipo de proteína implicada.

Deben realizarse los siguientes controles:

1. Si el resultado es **negativo** con los reactivos **poliespecífico** y/o **IgG**, se debe descartar que no se haya añadido el reactivo o que éste no funcione correctamente: para ello se debe realizar el **Control de Coombs**, utilizando hematíes sensibilizados con IgG. El resultado del control debe ser positivo. Si es negativo, invalida la prueba (Figura 10).

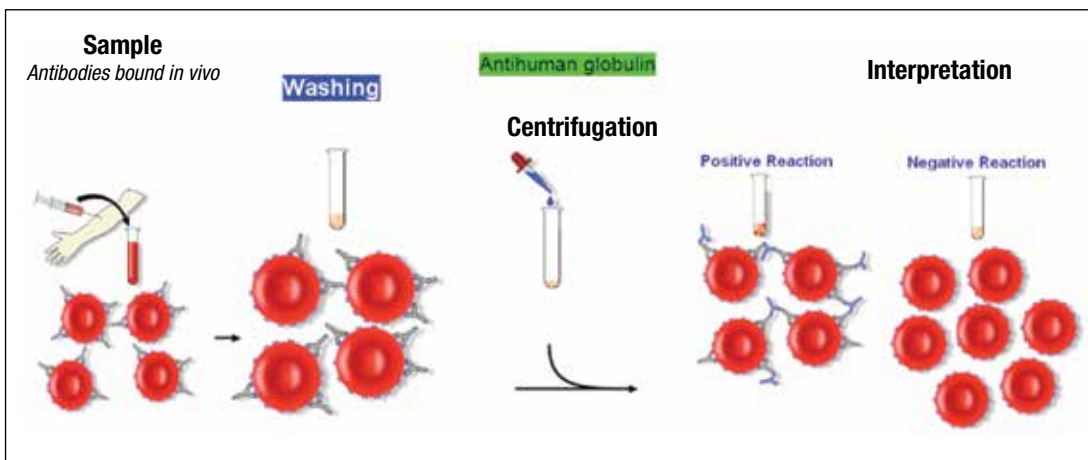


Figura 9. Prueba directa de antiglobulina, en método de tubo

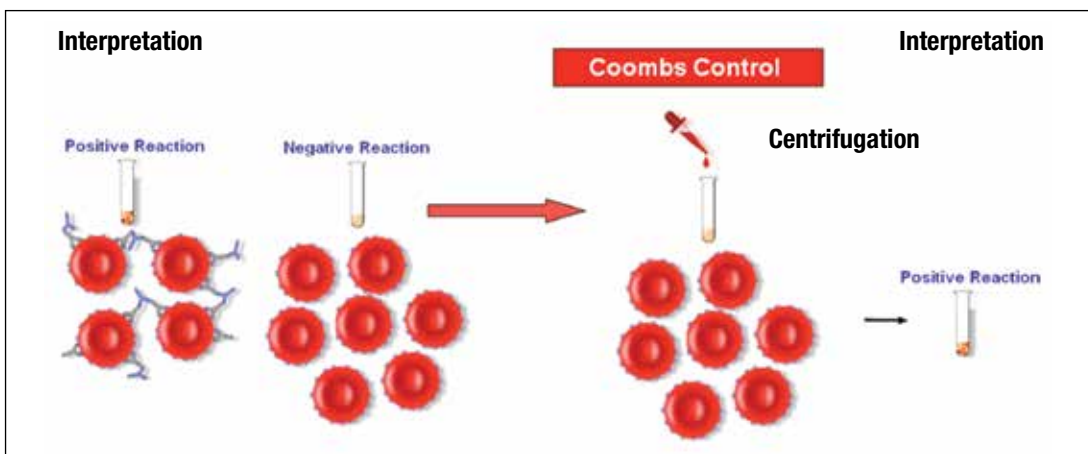


Figura 10. Prueba directa de antiglobulina. Control de Coombs

2. Si el resultado es **positivo con todos los reactivos**, es necesario descartar la presencia de aglutinación eritrocitaria espontánea, de causa no inmune: para ello se debe realizar un control con salina, albúmina o PBS, que debe ser negativo. Si el control es positivo, el test no es valorable.

Es importante tener en cuenta:

- Es necesario lavar correctamente los hematíes con solución salina.
- No debe realizarse una centrifugación excesiva, para evitar falsos positivos.
- Lectura inmediata, para evitar que los resultados sean erróneos (sobre todo falsos negativos)
- Si el resultado es **negativo** con los reactivos **que detectan C3d**, realizar una incubación de 5 min y una nue-

va lectura para favorecer la reactividad del complemento

Método de gel-microcolumna^{7,8}

Si se trabaja en tarjetas de gel de antiglobulina, únicamente se han de dispensar los hematíes y realizar la lectura tras una centrifugación, siguiendo las instrucciones del fabricante. No es necesario el lavado previo de los hematíes.

Inicialmente se utilizan las tarjetas con el reactivo poliespecífico. Si el test es positivo, se repite utilizando tarjetas con reactivos monoespecíficos, para valorar el tipo de proteína implicada (Figura 11).

Este método ha demostrado tener mayor sensibilidad y menor especificidad que la técnica de tubo;^{9,10} sin embargo, el significado clínico de esta prueba no está bien establecido cuando es únicamente positiva en técnica de gel.¹¹

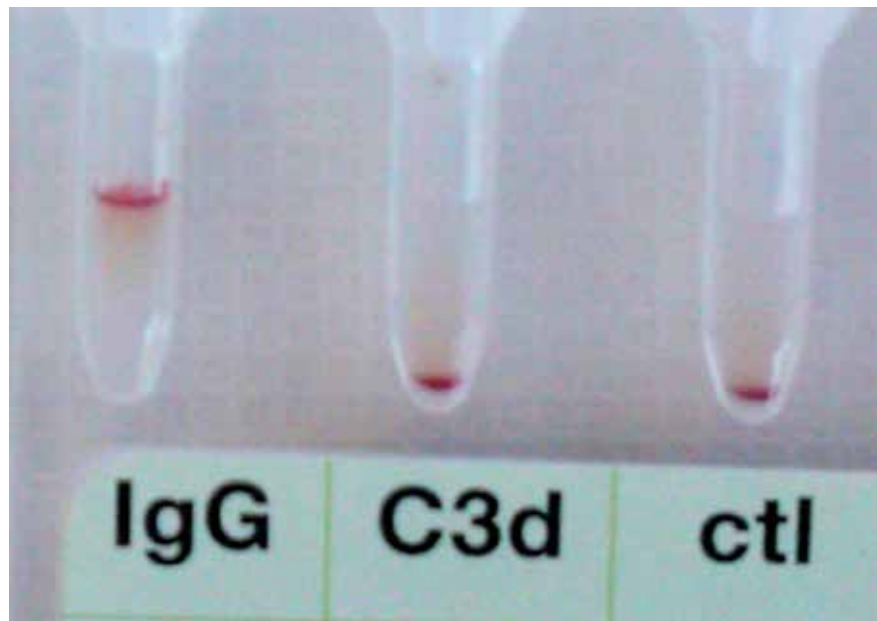


Figura 11. Prueba directa de antiglobulina en tarjeta con reactivos monoespecíficos

Test directo de Coombs positivo únicamente por complemento

El complemento como única globulina detectable en la membrana de los hematíes puede aparecer en diferentes situaciones:

1. Los **anticuerpos de clase IgM** que reaccionan *in vitro* ocasionalmente se unen a los hematíes sin producir aglutinación y pueden activar el complemento. Las moléculas de IgM son difíciles de demostrar por reactivos antiglobulina, debido a su elevado índice de disociación en el proceso de lavado y a que el reactivo poliespecífico contiene escasa actividad anti-IgM, pero las fracciones del complemento (sobre todo C3) cercanas al sitio de unión de IgM sí son demostrables.
2. Aproximadamente del 10% al 20% de pacientes con **AHAI por anticuerpos calientes** tienen una PDAG positiva únicamente por C3 (aunque en algunos casos también tienen IgG, pero en niveles inferiores al umbral de detección por las técnicas convencionales).
3. En el **síndrome de aglutininas frías**, el autoanticuerpo reactivo en frío puede reaccionar con antígenos eritrocitarios a temperaturas inferiores a 32 °C. Los hematíes que atraviesan los capilares cutáneos, en los que la temperatura es baja, se recubren de autoanticuerpos que activan el complemento. Cuando las células vuelven a la circulación central (37 °C), el autoanticuerpo se disocia de las células, dejando fracciones del complemento unidas a

la membrana celular (predominantemente C3d).

4. **Inmunocomplejos** formados en el plasma pueden unirse débil e inespecíficamente a los hematíes y activar el complemento. El complemento activado (suele ser la fracción C3) permanece en la membrana celular después de que los inmunocomplejos se disocian.

Otras causas que pueden producir una prueba directa de antiglobulina positiva

El hallazgo de una PDAG positiva no siempre se asocia a la existencia de un proceso hemolítico y no siempre tiene significación clínica.

- Se ha descrito en un 1% a 15% de pacientes y de 0,01% a 0,1% de donantes de sangre, en la mayoría de casos debido a la **adsorción inespecífica de proteínas**.¹² Comúnmente es transitoria y asintomática y se asocia a la existencia de niveles elevados de gammaglobulinas en plasma.¹³ En 65%-80% de los casos, los eluidos no son reactivos, lo que sugiere que no hay anticuerpos adheridos en los hematíes.¹⁴ Lo más frecuente es que no haya patología asociada, aunque se ha descrito su relación con enfermedades autoinmunes incluso con un mayor riesgo de desarrollar neoplasias hematológicas.¹⁵
- Algunos **fármacos** modifican la membrana de los hematíes induciendo la adsorción de muchas proteínas, incluyendo IgGs (Ej: cefalosporina). El mismo mecanismo

se relaciona con infecciones víricas o bacterianas.

- **Inmunocomplejos** o complemento adherido a la membrana de los hematíes (en ocasiones relacionados con la presencia de fármacos).
- **Transferencia pasiva** de aloanticuerpos, procedentes de componentes sanguíneos transfundidos.
- **Poliaglutinabilidad** de los hematíes: exposición del antígeno T en la membrana, en relación con procesos infecciosos.
- **Contaminantes** de los tubos (suciedad, sílice y iones metálicos).

Anemia hemolítica autoinmune asociada a PDAG negativa

Las causas más frecuentes son:

- Nivel de inmunoglobulinas y/o complemento adherido a los hematíes, por debajo del umbral del método utilizado.
- Inmunoglobulinas de clase IgA o IgM, no detectables habitualmente por los reactivos de rutina.
- Autoanticuerpos IgG de baja afinidad, que se eliminan durante la fase de lavado.

Prueba indirecta de antiglobulina (PIAG)

Objetivo

Estudiar la unión antígeno-anticuerpo tras incubación *in vitro*.

Indicaciones

Es la técnica básica para el trabajo en el laboratorio de Inmunohematología,

ya que permite detectar la presencia de anticuerpos de clase IgG, evitando reacciones falsamente negativas y la pérdida de información sobre posibles anticuerpos eritrocitarios clínicamente significativos e incompatibilidades pretransfusionales.

Permite detectar > 95% de los anticuerpos importantes con escasos falsos positivos.

Se utiliza para:

- El estudio de anticuerpos irregulares tanto en pruebas de escrutinio como de identificación y titulación.
- La determinación del fenotipo eritrocitario, en algunos casos en los que los reactivos son de clase IgG (anti-S, anti-Jk^a etc.).
- Las pruebas cruzadas pretransfusionales.
- El estudio de anticuerpos irregulares tras procesos de elución y adsorción.
- El estudio de fenotipos Rh(D) débiles.

Fundamento

Se ponen en contacto anticuerpos y antígenos y se realiza una incubación a 37 °C. El tipo de muestra y de reactivo variará según sea la prueba a realizar:

- En una prueba cruzada: hematíes del donante y suero/plasma del paciente.
- En un estudio de anticuerpos irregulares: hematíes comerciales y suero/plasma del paciente.
- En un estudio de fenotipo eritrocitario, hematíes del paciente y anti-sueros comerciales.

Posteriormente, se añade la antiglobulina, que permite detectar si ha habido unión antígeno-anticuerpo (Figura 12).

Métodos

Método de tubo

Se dispensan anticuerpos y antígenos en el tubo y se realiza una incubación a 37 °C durante 30 min. Posteriormente,

se añade la antiglobulina, se centrifuga y se leen los resultados de forma inmediata.

Si el resultado es **negativo**, se descarta la falta o el mal funcionamiento del reactivo: para ello se realiza el “Control de Coombs”, utilizando hematíes sensibilizados con IgG. El resultado del control debe ser positivo. Si es negativo, invalida la prueba (Figura 13):

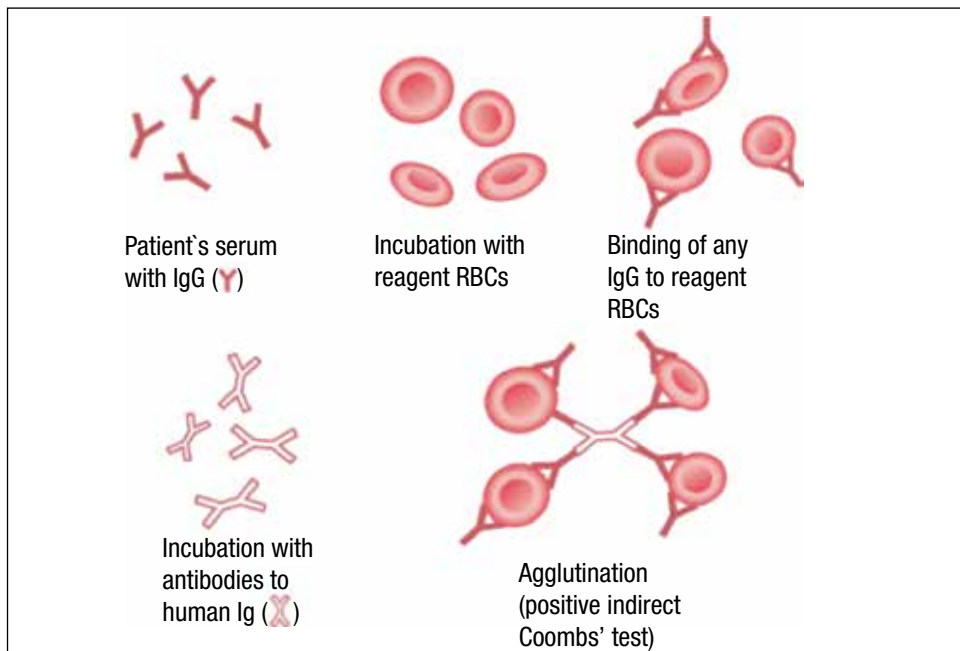


Figura 12. Prueba indirecta de Coombs

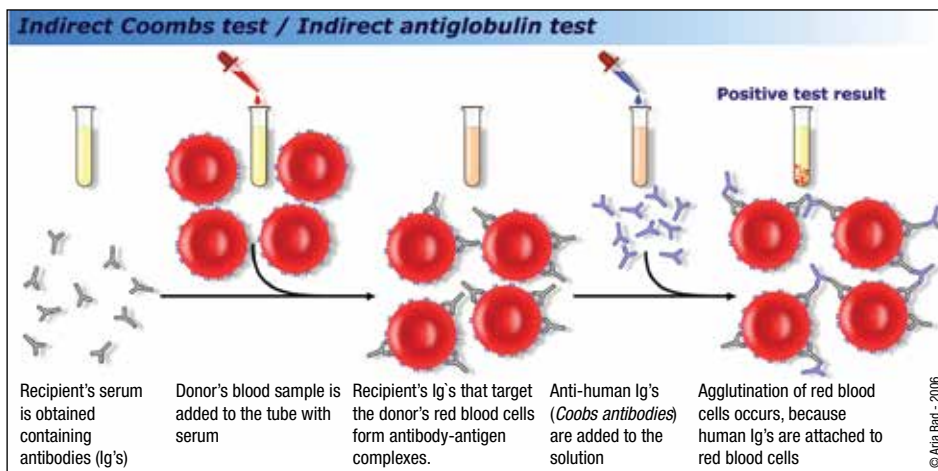


Figura 13. Prueba indirecta de antiglobulina como base de una prueba cruzada (método de tubo)

Método de gel- microcolumna

Utilizando una tarjeta de gel de antiglobulina poliespecífica, se añade una gota de hematíes y otra de plasma/reactivo comercial. Se incuba a 37 °C, se centrifuga y se lee el resultado (Figura 14).

Causas de error en el resultado de la prueba de la antiglobulina

Causas de resultados falsos negativos

Neutralización del reactivo antiglobulina

- **Fallo del lavado** de los hematíes. En la PIAG, si se utilizan volúmenes elevados de plasma, aumentar el número de lavados.
- **Contaminación del reactivo** antiglobulina por proteínas exógenas (al utilizar los dedos para cubrir el tubo, y al utilizar cuentagotas contaminados o procedentes de otro reactivo).
- Elevada concentración de **paraproteínas IgG** en el suero problema, que puede permanecer a pesar de realizar múltiples lavados.

Interrupción del test

El test se debe **leer inmediatamente** tras la centrifugación. Si no se cumple esta premisa, se pueden producir falsos negativos:

- Los anticuerpos IgG adheridos a los hematíes pueden disociarse y/o neutralizar el reactivo antiglobulina.
- La aglutinación eritrocitaria se puede debilitar.

Conservación incorrecta de los reactivos

- El **reactivo antiglobulina** puede perder reactividad si se congela. Durante la conservación es posible que se contamine de bacterias.
- El exceso de calor o los procesos de congelación-descongelación son causa de pérdida de reactividad del **suero problema**.
- Los **hematíes reactivos** pueden perder fuerza antigénica durante el almacenamiento.

Procedimientos incorrectos

- Una agitación excesiva al deshacer el botón en la lectura de la prueba.¹⁶

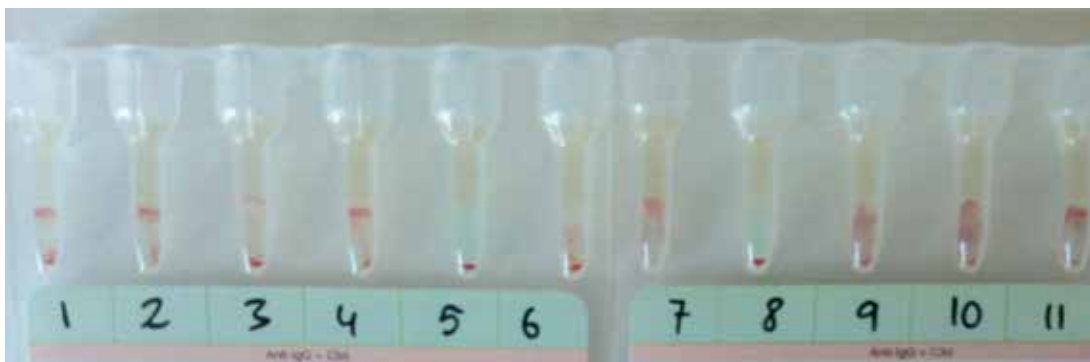


Figura 14. Panel de identificación de anticuerpos, en tarjeta de gel-antiglobulina

- Una **sobrecentrifugación** puede compactar tanto los hematíes que la agitación intensa necesaria para deshacer el botón puede producir rotura de los aglutinados.
- Una **centrifugación demasiado suave** no es óptima para conseguir la aglutinación.
- Fallos en la adición del **suero problema, potenciadores o antiglobulina** pueden producir falsos negativos.
- **Proporción suero-hematíe inadecuada:** una concentración demasiado elevada de hematíes puede enmascarar una débil aglutinación. Una concentración demasiado baja no permite valorar el grado de aglutinación.

Complemento

- Algunos anticuerpos, como ciertos **anti-Jk^a, Jk^b**, son detectados únicamente cuando se utiliza antiglobulina poliespecífica y existe complemento activo en la muestra (suero).¹⁷

Salina

- Un pH bajo (< 7) de la solución salina puede reducir la sensibilidad. El **pH óptimo** para la mayoría de anticuerpos es **7-7,2**.

Causas de resultados falsos positivos

Agglutinación celular previa al lavado

Cuando existen **aglutininas potentes en el suero**, los aglutinados no se dispersan durante el lavado. Es importante observar las células antes de añadir la antiglobulina, o utilizar un control

sustituyendo la antiglobulina por salina. La positividad del control invalida el resultado de la prueba.

Existencia de partículas o contaminantes

Si existe **suciedad**, polvo o sílice en el tubo, o mucha **fibrina** en el suero, es probable que se produzca una agregación de los hematíes que simulan aglutinación.

Procedimiento incorrecto

Una **sobrecentrifugación** puede compactar tanto los hematíes, que dificulta su dispersión y simulan una reacción positiva.

La centrifugación de los test en los que se utiliza **PEG o polímeros** cargados positivamente antes del lavado, puede producir agregados que no se dispersan.

Células con un test directo de antiglobulina positivo

Los hematíes con un test directo de antiglobulina positiva producirán un resultado positivo en todos los test basados en la prueba indirecta de antiglobulina. Existen procedimientos que permiten retirar las moléculas de IgG de la membrana de los hematíes, evitando esta falsa reacción.

Complemento

Los componentes del complemento (sobre todo la fracción C4) pueden unirse a los hematíes de la sangre coagulada o anticoagulada con CPDA-1, principalmente tras la conservación a baja temperatura (4 °C). Para realizar la prueba directa de antiglobulina es mejor utilizar hematíes de muestras anticoaguladas con EDTA, ACD o CPD.

El complemento puede unirse a los hematíes en las muestras obtenidas de vías de infusión utilizadas para administrar soluciones que contienen dextrosa.

Referencias

- Petz, L. and Garraty, G. *Immune Hemolytic Anemias*. Second edition. Churchill Livingstone 2004.
- Kelton, J. G., Heddle, N. M., Blajchman, M. A. *Transfusión sanguínea. Bases teóricas y aplicación clínica*. Ediciones Doyma. 1986.
- Garraty, G. The significance of complement in immunohematology. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1984; 20(1):25-56.
- AABB Technical Manual. 15th edition.
- Zantek, N. D., Koepsell, S. A., Tharp, D. R. Jr., Cohn, C. S. The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis. *Am J Hematol*. 2102 Jul; 87(7):707-9.
- Khan, S. Clinical utility of the Coombs test. *CMAJ*. 2006 Oct 10; 175(8):919.
- Jaiprakash, M., Gupta, P. K., Kumar, H. Role of gel based technique for Coomb's test. *Indian J Pathol Microbiol*. 2006 Jul; 49(3): 370-2.
- Lai, M., Leone, G., Landolfi, R. Autoimmune haemolytic anemia with gel-based immunohematology tests. *Am J Clin Pathol* 2013 Apr; 139(4):457-63.
- Novaretti, M. C., Jens, E., Pagliarini, T., Bonifacio, S. L., Dorlhiac-Llacer, P. E., Chamone, D. A. Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study. *J.Clin Lab Anal*. 2004.18(5):255-8.
- Das, S. S., Chaudary, R., Khetan, D. A. comparison of conventional tube test and gel technique in evaluation of direct antiglobulin test. *Hematology*. 2007 Apr; 12(2):175-8.
- Paz, N., Itzhaky, D., Ellis, M. H. The sensitivity, specificity, and clinical relevance of gel versus tube DATs in the clinical immunology laboratory. *Immunohematology*. 2004; 20(2):118-21.
- Weiner, W. Coombs positive normal people. *Proceedings of the tenth congress of the international Society of blood transfusion*. Stockholm, 1964; 34-39.
- Gorst, D. W., Rawlinson, V. I., Merry, A. H. et al. Positive antiglobuline test in normals individuals. *Vox Sang* 1980; 38:99-105.
- Allan, J., Garraty, G. Positive direct antiglobulin in normal blood donors. *Proceedings of the ISBT, Montreal, 1980*: 150 (Abstr).
- Rottenberg, Y., Yahalom, V., Shinar, E., Barchana, M., Adler, B., and Paltiel, O. Blood donors with positive direct antiglobulin tests are at increased risk for cancer. *Transfusion* 2009; 49:838-8.
- Voak, D., Downie, D. M., Moore, B. P., Ford, D. S., Engelfriet, C. P., Case, J. Replicate tests for the detection and correction of errors in anti-human globulin (AHG) tests: optimum conditions and quality control. *Haematologia (Budap)*. 1988; 21(1):3-16.
- Howard, J. E., Winn, L. C., Gottlieb, C. E., Grumet, F. C., Garraty, G., Petz, L. D. Clinical significance of the anti-complement component of antiglobulin antisera. *Transfusion*. 1982 Jul-Aug; 22(4):269-72.

Principios de la genética aplicada a la Inmunohematología

CARLOS COTORRUELO*
NÚRIA NOGUÉS**

Introducción

La **Genética** es la rama de la biología que se ocupa de la herencia y de la variación.¹⁻⁴ Esta disciplina abarca el estudio de las células, los individuos, sus descendientes y las poblaciones donde viven los organismos. Los genetistas investigan todas las formas de variación hereditaria, así como las bases moleculares subyacentes de tales características. Los grupos sanguíneos, características hereditarias que se transmiten de generación en generación, han desempeñado un papel fundamental en demostrar que los principios de la genética establecidos para otras especies también se aplican al ser humano. El estudio de los antígenos eritrocitarios

* *Profesor asociado. Área Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Investigador adjunto. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina. ccotorru@fbioyf.unr.edu.ar*

** *Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. nmnogues@bst.cat*

ha representado una herramienta ideal para los genetistas debido a la relativa sencillez para su identificación, constituyendo actualmente verdaderos marcadores para estudios genéticos y antropológicos. Hoy en día, el desarrollo de la genética molecular permite estudiar la herencia de los grupos sanguíneos a nivel del ácido nucleico y de los genes que los codifican, ampliando aún más el campo de aplicación de la inmunohematología molecular.

Conceptos básicos

Genes y cromosomas

Las células de los organismos eucariotas se caracterizan por la presencia de un núcleo en el que se encuentra el material genético. El **ácido desoxirribonucleico** (ADN) es la molécula que almacena la información genética. En las moléculas de ADN se hallan las unidades hereditarias llamadas **genes**, que son parte de un elemento más grande, el **cromosoma**. En términos sencillos, el gen es la unidad funcional de la herencia. En términos químicos es una cadena lineal de nucleótidos –los componentes que constituyen el ADN–. Una definición más conceptual es considerar al gen como una unidad de almacenamiento de información capaz de sufrir replicación, mutación y expresión. En esa información se incluyen las secuencias codificantes para los antígenos de los grupos sanguíneos, tanto eritrocitarios como leucoplaquetarios.

El **cromosoma** está compuesto por una molécula de ADN lineal asociada a proteínas. Además de la abundancia de genes, los cromosomas poseen muchas regiones no génicas. No está claro el pa-

pel que juegan algunas de estas regiones. El conocimiento sobre los cromosomas y sobre los genes está en continua expansión. En eucariotas, los cromosomas pueden ser visualizados con el microscopio óptico cuando las células se encuentran en mitosis o meiosis. En estos procesos de división, el material que forman los cromosomas está fuertemente espiralizado y condensado, dando lugar a la imagen característica de los cromosomas (Figura 1). Después de la división, este material, llamado **cromatina**, se despiraliza en la interfase y se puede estudiar más fácilmente al microscopio electrónico. El concepto cromatina se utiliza generalmente para definir a la organización física y estructural del ADN y a las proteínas presentes en los cromosomas. En muchos cromosomas, la cromatina está formada por ADN (40%) ligado a proteína (60%), la cual es responsable de condensar el ADN de manera regular dentro del cromosoma.

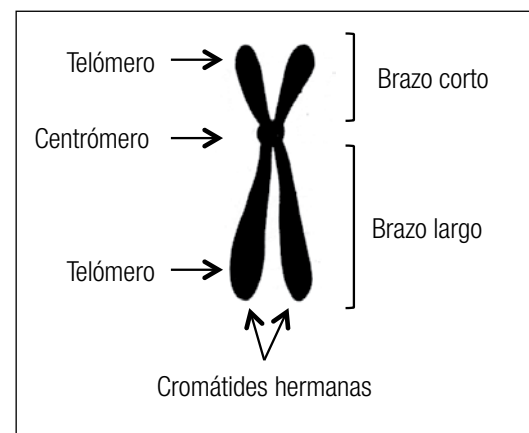


Figura 1. Diagrama de un cromosoma durante la división celular. La cromatina se ha condensado y replicado de tal modo que cada cromosoma está formado por dos cromátides hermanas conectadas por el centrómero. El telómero es la parte final o terminal de un cromosoma. Los brazos de los cromosomas son de diferente longitud. El brazo más corto se denomina p y el brazo más largo se denomina q.

Aunque hay muchas excepciones, los miembros de muchas especies tienen un número específico de cromosomas, denominado número diploide ($2n$), presentes en cada célula somática. Mediante un cuidadoso análisis, se ve que estos cromosomas están en parejas, y cada miembro del par, cuando son visibles en la división celular, comparte casi la misma apariencia. Los miembros de cada par, denominados **cromosomas homólogos**, son idénticos en cuanto a su longitud y a la localización del centrómero, el punto en el que se unen las fibras del huso en la división. También tienen la misma secuencia de lugares génicos, o **loci**, y se aparean durante la meiosis. El número de *tipos* diferentes de cromosomas de cualquier especie diploide es igual a la mitad del número diploide, que se denomina el número haploide (n). Una célula somática humana contiene un total de 46 cromosomas

que conforman 23 pares. Cada par cromosómico está formado por un cromosoma heredado del padre y otro de la madre. Tanto en hombres como en mujeres, 22 de los pares son similares o cromosomas homólogos y poseen genes equivalentes independientemente del género. El par restante está formado por cromosomas no homólogos o cromosomas sexuales y es diferente en hombres y mujeres. Estos últimos determinan el sexo cromosómico, y el par correspondiente al hombre está formado por los cromosomas X y Y mientras que las mujeres poseen una doble dotación de cromosomas X. Los cromosomas no sexuales se denominan **autosomas**. La disposición particular o el contenido cromosómico se denomina **cariotipo** (Figura 2), el mismo se escribe como 46XY y 46XX para un hombre o mujer normal, respectivamente. Los genes que codifican los grupos sanguí-

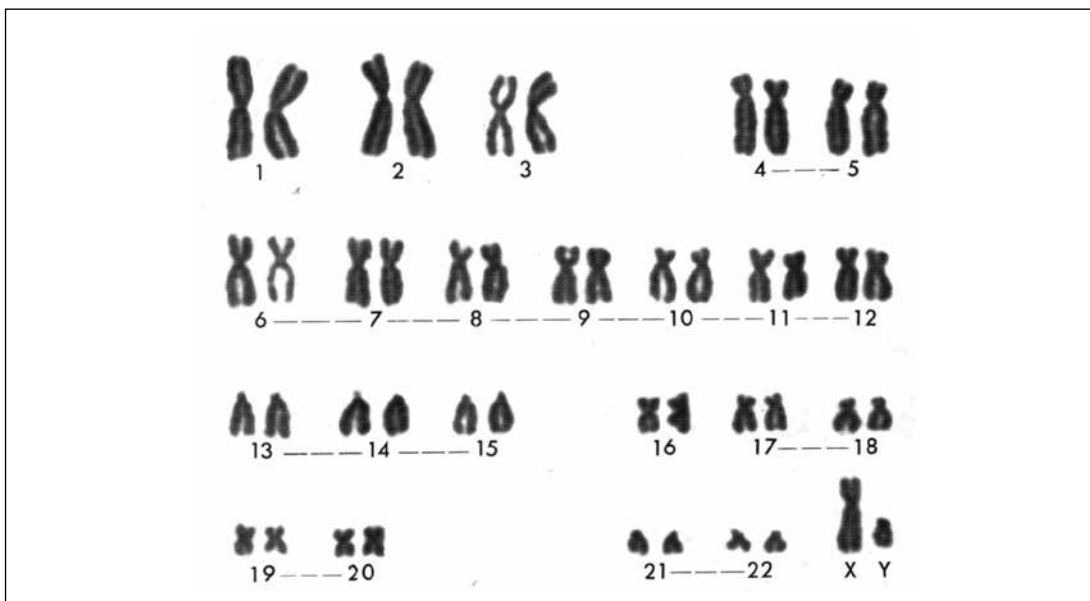


Figura 2. Cariotipo. Los cromosomas se diferencian entre sí por su tamaño y la posición del centrómero. Esto proporciona la base para numerar los autosomas 1 hasta 22, de modo tal que el cromosoma 1 es el más grande y el cromosoma 22 el más pequeño. En la figura se muestra un cariotipo masculino 46XY.

neos han sido localizados en diferentes autosomas y en el cromosoma X.⁵

La información hereditaria transportada por los cromosomas se transfiere de una célula madre a una célula hija durante la división celular somática y por los padres a su descendencia a través de los gametos durante la reproducción.

Genotipo, alelos y fenotipo

El **genotipo** de una persona es el conjunto de genes heredados de sus padres; así mismo, el término genotipo se utiliza para designar el conjunto de alelos en un único locus. Un gen en un locus determinado dentro de un cromosoma puede existir en más de una forma. Cada una de las diferentes formas alternativas que toma un gen recibe el nombre de **alelo**. Los alelos surgen por diferentes eventos genéticos y moleculares que provocan cambios en la secuencia de nucleótidos del gen. Estos cambios reciben el nombre de **mutaciones** y pueden producirse por sustitución, duplicación, inserción o delección de uno o varios nucleótidos. Frecuentemente, las mutaciones o los diferentes alelos dan lugar al cambio de alguna característica del organismo, denominada fenotipo. Una vez que forma parte del repertorio genético de un organismo, tal variante puede extenderse por toda la población mediante mecanismos reproductivos. Se define un sistema de grupo sanguíneo como **polimórfico** cuando existen dos o más alelos para su locus con una frecuencia apreciable mayor al 1%. Con base en los conocimientos actuales, algunos sistemas de grupos sanguíneos son al-

tamente polimórficos, por ejemplo Rh, ABO, MN, y poseen muchos más alelos en un locus dado que otros sistemas como Kidd, Duffy y Colton.⁶

Cada persona posee dos alelos para un carácter, uno derivado de la madre y el otro del padre. En forma sencilla, puede considerarse que el locus *KIDD* posee dos alelos denominados *JKA* y *JKB*. Dependiendo de la contribución de los progenitores, una persona puede heredar cualquier combinación de estos dos alelos y expresar los antígenos correspondientes en sus glóbulos rojos. Así, los individuos que heredaron el alelo *JKA* en doble dosis expresarán el antígeno Jk^a y serán individuos homocigotos por poseer dos alelos idénticos para un locus dado en cada uno de los cromosomas homólogos. En cambio, si de cada uno de los progenitores recibe dos alelos diferentes, para el caso del ejemplo *JKA* y *JKB*, las personas expresarán los antígenos Jk^a y Jk^b y serán individuos heterocigotos. Se denomina **antitéticos** a los antígenos codificados por alelos de un mismo locus, por ejemplo Jk^a y Jk^b son antígenos antitéticos. La cantidad de antígeno expresada sobre los eritrocitos (densidad antigénica) puede estar influenciada por la condición homocigota o heterocigota del alelo que lo codifica.⁷ A menudo, la densidad del antígeno es mayor cuando un individuo es homocigoto para el alelo en cuestión. Por ejemplo, los glóbulos rojos con fenotipo $Jk(a+ b-)$ poseen una dosis doble del antígeno Jk^a y son susceptibles de reaccionar más fuertemente con anti- Jk^a que aquellos que son $Jk(a+ b+)$ y que poseen una dosis única del antígeno Jk^a . Del mismo modo, los eritrocitos $M+N-$ tienden a reaccionar

con mayor fuerza con anti-M que los glóbulos rojos M+N+. En ocasiones, los anticuerpos irregulares que reaccionan débilmente no pueden ser detectados con células que expresan una dosis única de un antígeno particular. Esta diferencia observable en la intensidad de reacción, basada en la homocigosidad o heterocigosidad para un alelo se denomina **efecto de dosis**. Es importante destacar que no se observa el efecto de dosis con todos los antígenos de los grupos sanguíneos o con todos los anticuerpos de una especificidad dada. Los anticuerpos dirigidos contra antígenos de los sistemas Rh, MNS, Kidd, Duffy y Lutheran frecuentemente demuestran el efecto de dosis y es importante incluir en los paneles eritrocitarios células con doble dosis de estos antígenos.

Mientras que el genotipo de una persona es su constitución genética, el **fenotipo** es la expresión observable de los genes heredados y refleja la actividad biológica de los genes. La presencia o ausencia de antígenos sobre los eritrocitos, conforme a lo que determinan las pruebas biológicas, representan el fenotipo. A menudo puede predecirse el genotipo a partir del fenotipo; por ejemplo cuando los glóbulos rojos de una persona reaccionan con anti-K y anti-k se puede inferir la presencia de los alelos *K* (*KEL1*) y *k* (*KEL2*). Usualmente el fenotipo suministra una información parcial respecto del genotipo; por ejemplo los individuos de grupo sanguíneo A portan el alelo *A*, pero su genotipo podría ser *A/A* o *A/O*. Anteriormente, los estudios familiares eran la única posibilidad de determinar el genotipo. Ahora, las herramientas brindadas por la biología molecular, ade-

más de permitir predecir el fenotipo por estudios a nivel del ADN, hacen posible establecer el genotipo sin necesidad de recurrir a estudios familiares.

Código genético, transcripción y traducción

La secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que constituye un gen está presente en forma de un **código genético**. Este código especifica la composición de aminoácidos de las proteínas, que son el producto final de la expresión génica. En el ADN hay cuatro nucleótidos distintos, diferenciándose entre sí por uno de sus componentes, la base nitrogenada. Un **codón** es un triplete de nucleótidos y es la unidad básica de información en el proceso de síntesis de proteínas. Cada codón (o triplete) codifica un aminoácido, y esta correspondencia es la base del **código genético** que permite traducir la secuencia de los ácidos nucleicos a la secuencia de aminoácidos que compone la proteína.

La información codificada en el ADN se transfiere primero en el proceso de transcripción a la molécula de ARN mensajero (ARNm). Posteriormente, el ARNm se asocia con un orgánulo celular, el ribosoma, en donde se traduce en una molécula proteica. Hay excepciones en donde las proteínas no son el producto final de un gen. Por ejemplo, los genes que codifican el ARN ribosómico (ARNr), que forman parte del ribosoma, y los del ARN de transferencia (ARNt), que actúan en el proceso de traducción, se transcriben pero no se traducen. Por consiguiente, a veces el ARN es el producto final de

la información genética almacenada. Muchas proteínas son catalizadores biológicos altamente específicos, denominados enzimas. El papel de estas proteínas es controlar el metabolismo celular, determinando que carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos u otras proteínas se encuentran en la célula. Muchas otras proteínas llevan a cabo misiones no enzimáticas. Por ejemplo, la hemoglobina transporta oxígeno, el colágeno proporciona soporte estructural y flexibilidad a muchos tejidos, las inmunoglobulinas son la base de las respuestas inmunitarias y la insulina es una hormona. Las enzimas, como catalizadores biológicos, disminuyen la energía de activación necesaria para muchas reacciones bioquímicas y aceleran la consecución del equilibrio. De otro modo, estas reacciones se darían tan lentamente que no tendrían efecto sobre los seres vivos en las condiciones de nuestro planeta. Los antígenos de los grupos sanguíneos pueden ser productos directos de los genes que originan proteínas sobre las cuales se reconocen los epitopes antigénicos (por ejemplo antígenos de los sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd) o productos indirectos de los genes que codifican enzimas transferasas que catalizan la adición secuencial y específica de hidratos de carbono sobre una estructura precursora constituyendo el epitope antigénico (por ejemplo antígenos de los sistemas ABO, Lewis, P, I).^{6,7}

División celular

Como vimos en los párrafos precedentes, el material genético en los seres humanos está representado por el ADN.

Una molécula de ADN tiene muchas unidades llamadas genes, cuyos productos dirigen todas las actividades metabólicas de las células. El ADN, con su batería de genes, está organizado en cromosomas, estructuras que sirven de vehículo para la transmisión de la información genética. El modo en el que los cromosomas se transmiten de una generación celular a la siguiente, y de los individuos a sus descendientes, es extraordinariamente preciso.

En los eucariotas hay dos procesos muy importantes: la mitosis y la meiosis. Aunque el mecanismo de ambos procesos es similar en muchos aspectos, los resultados son totalmente diferentes. La mitosis conduce a la producción de dos células, cada una con un número de cromosomas idéntico al de la célula madre. Por el contrario, la meiosis reduce la cantidad de material genético y el número de cromosomas exactamente a la mitad. Esta reducción es esencial a fin de que se dé la reproducción sexual sin doblar la cantidad de material genético en cada generación. Concretando, la mitosis es aquel periodo del ciclo celular durante el cual los componentes hereditarios se reparten de manera precisa e igual en las células hijas. La meiosis es parte de un tipo especial de división celular que da lugar a la producción de células sexuales: los gametos. Este proceso es un paso esencial en la transmisión de la información genética de un individuo a sus descendientes.

Las parejas de cromosomas homólogos tienen una semejanza genética importante. Tienen genes idénticos, situados en los mismos lugares a lo largo del cromosoma, que se denominan **locus** (en plural, **loci**). Por ello, tienen idénticos

tico potencial genético. En organismos con reproducción sexual, uno de los miembros de cada pareja proviene de la madre (a través del óvulo), y el otro, del padre (a través del espermatozoide). Por ello, y como consecuencia de la herencia biparental, cada organismo diploide tiene dos copias de cada uno de los genes.

Mitosis

El proceso de la mitosis es básico para todos los organismos eucariotas. Los organismos pluricelulares diploides comienzan su ciclo biológico como óvulos fecundados unicelulares o cigotos. La actividad mitótica del cigoto y de las células hijas posteriores es la base para el crecimiento y desarrollo del organismo. En organismos adultos, la actividad mitótica asociada con la división celular es esencial en la cicatrización de las heridas y en otros tipos de sustitución de células en ciertos tejidos. Por ejemplo, las células epidérmicas en la especie humana se están desprendiendo y reemplazando continuamente. Se estima que cada individuo desprende diariamente unos 100 mil millones de células. En los vertebrados, la división celular da lugar también a una producción continua de células eritroides, que eliminarán finalmente sus núcleos y repondrán el número de glóbulos rojos. En situaciones anormales, las células somáticas pueden presentar procesos de división celular incontrolada, lo cual origina un cáncer.

Normalmente, después de la división celular, el tamaño inicial de las células hijas es aproximadamente la mitad del tamaño de la célula madre. Sin embargo, el núcleo de cada una

de las nuevas células no es apreciablemente menor que el núcleo de la célula de donde provienen. La medida cuantitativa del ADN confirma que hay cantidades equivalentes de material genético en las células hijas y en la célula madre.

El proceso de división del citoplasma se denomina citocinesis. La división del citoplasma requiere un mecanismo que dé lugar a un reparto del mismo en dos partes, seguido del confinamiento de las dos nuevas células dentro de membranas plasmáticas diferentes. Los orgánulos citoplasmáticos, o bien se autoduplican a partir de las estructuras membranosas existentes, o se sintetizan *de novo* en cada célula.

La división nuclear o cariocinesis mediante la cual el material genético se reparte entre las células hijas, es más compleja que la citocinesis y requiere un mecanismo más preciso. En primer lugar, los cromosomas deben duplicarse de manera precisa y luego repartirse exactamente entre las células hijas. El resultado final es la producción de dos células hijas, cada una de ellas con una composición cromosómica idéntica a la de la célula madre (Figura 3).

Meiosis

La meiosis, a diferencia de la mitosis, reduce la cantidad de material genético. Mientras que en organismos diploides la mitosis da lugar a células hijas con una dotación diploide completa, en la meiosis se producen gametos con sólo una dotación haploide de cromosomas. En la reproducción sexual los gametos se combinan y se unen para reconstituir la dotación diploide de las células paternas. El proceso tiene que

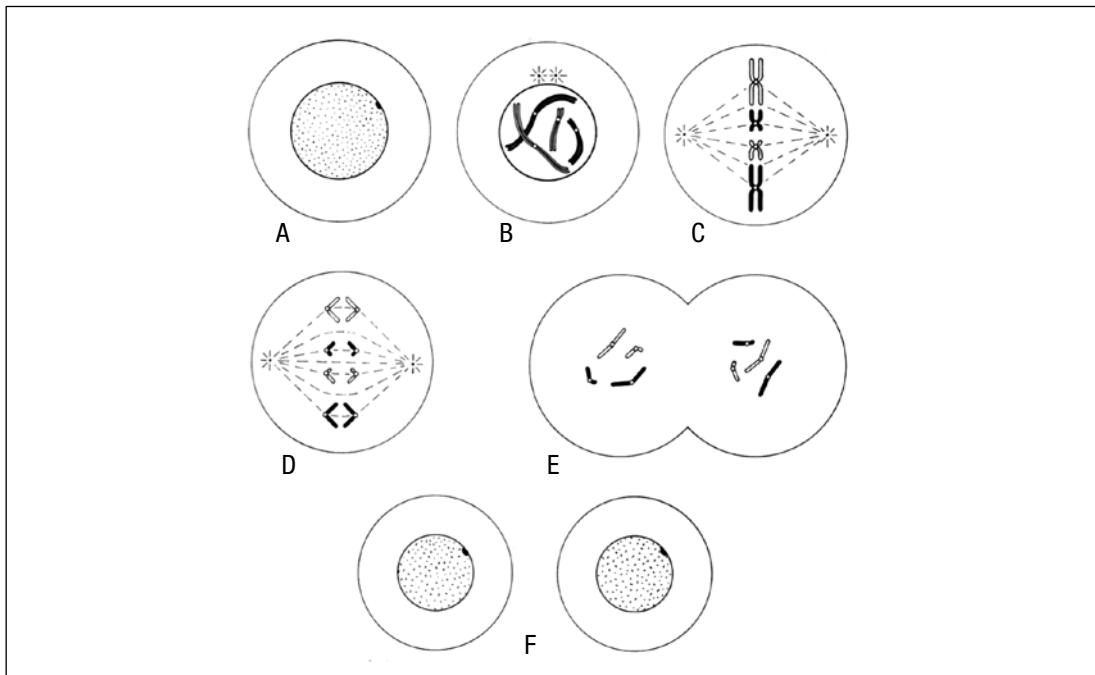


Figura 3. Mitosis. A) Los cromosomas no se distinguen, ya que la cromatina no se encuentra “condensada”. B) La cromatina se condensa y se distinguen 4 cromosomas. C) Los cromosomas se duplican y las cromátidas hermanas permanecen unidas por el centrómero. La membrana nuclear desaparece y los cromosomas se disponen en la placa ecuatorial. D) Las cromátidas hermanas se separan y migran hacia los polos opuestos. E) Comienza la división del citoplasma y cada célula hija tendrá los 4 cromosomas. F) Reaparece la membrana nuclear y el ADN se observa como cromatina.

ser muy específico, ya que no es suficiente dar lugar a gametos con un conjunto formado al azar por la mitad del número total de cromosomas, sino que cada gameto debe recibir uno de los miembros de cada una de las parejas de cromosomas homólogos, para asegurar la continuidad genética de generación en generación.

La reproducción sexual asegura también la variación genética entre los individuos de una especie. El proceso de meiosis da lugar a gametos con muchas combinaciones únicas de cromosomas a partir de las dotaciones haploides provenientes del padre y de la madre. En el hombre se pueden producir más de ocho millones de combinaciones diferentes entre los 23 cromosomas paternos y maternos en cualquier

gameto dado. Además, el fenómeno meiótico denominado **entrecruzamiento** (sobrecruzamiento o *crossing over*) da lugar a intercambios genéticos entre cada uno de los miembros homólogos de una pareja de cromosomas. Esto produce cromosomas que son un mosaico de los homólogos paterno y materno del que provienen. Esto tiene el efecto de intensificar la potencial variación genética de los gametos y de los descendientes derivados de ellos. El resultado es que en los gametos se pueden encontrar infinitas variedades de cada homólogo, desde cromosomas paternos o maternos intactos, hasta cualquier combinación de los mismos, dependiendo de si han ocurrido uno o más intercambios en el entrecruzamiento. Por consiguiente, la reproducción se-

xual baraja el material genético, dando lugar a descendientes que a menudo difieren mucho de sus padres. Este proceso constituye la forma más importante para combinar información genética dentro de una especie.

A diferencia de la mitosis, en la que cada uno de los miembros de una pareja de cromosomas homólogos, que provienen del padre y de la madre, se comporta de manera autónoma en la división, en la meiosis el par de cromosomas homólogos se une, es decir, sufre sinapsis. Cada estructura en sinapsis, denominada bivalente, da lugar a una unidad, la tétrada, que consta de cuatro cromátidas. La presencia de cuatro cromátidas demuestra que ambos cromosomas se han duplicado. Para alcanzar la haploidía son necesarias dos

divisiones. En la primera, denominada división reduccional (debido a que el número de centrómeros, cada uno de los cuales representa un cromosoma, se reduce a la mitad después de esta división), los componentes de cada tétrada que representan los dos homólogos separados, producen dos diadas. Cada diada está compuesta por dos cromátidas hermanas unidas por un centrómero común. En la segunda división, denominada ecuacional (ya que el número de centrómero permanece constante después de esta división), cada diada se escinde en dos mónadas de un solo cromosoma cada una. Así, las dos divisiones pueden dar lugar, potencialmente, a cuatro células haploides (Figura 4). La meiosis, como la mitosis, es un proceso continuo.

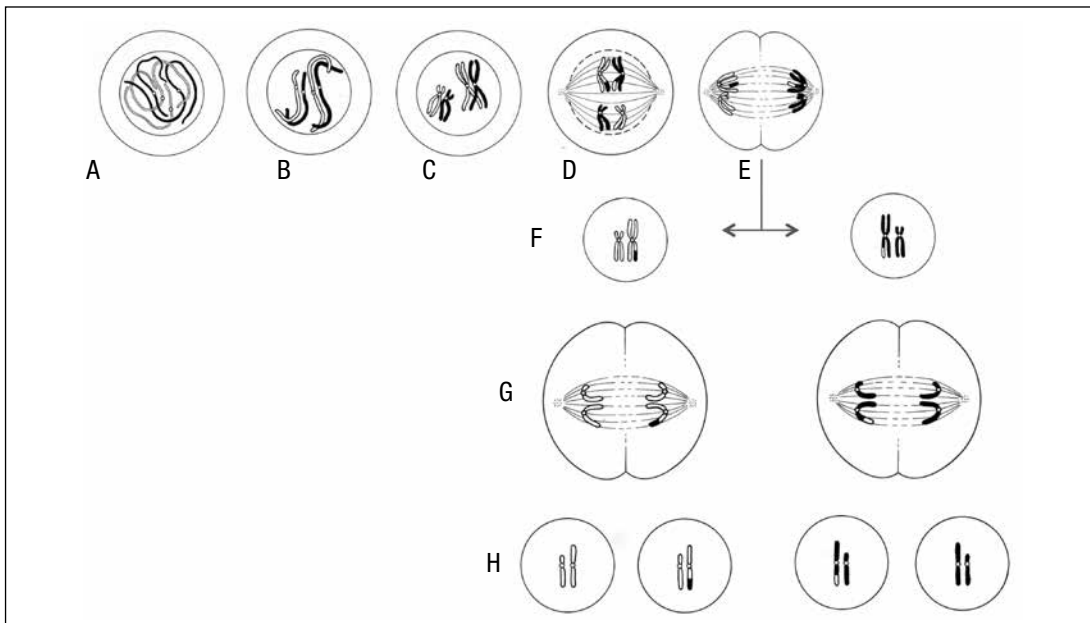


Figura 4. Meiosis. A) Los cromosomas no se distinguen, ya que la cromatina no se encuentra “condensada”. B) La cromatina se condensa y se distinguen 4 cromosomas. C) Los cromosomas se duplican y se aparean los cromosomas homólogos. D) La membrana nuclear desaparece y los cromosomas se disponen en la placa ecuatorial. Se produce el entrecruzamiento. E) Ocurre la primera división meiótica donde los pares de cromosomas homólogos se separan. F) Se forman dos células hijas. G) Ocurre la segunda división meiótica. No se produce duplicación cromosómica, sino que aquellos cromosomas ya duplicados se separan. H) Se generan cuatro células hijas con un número haploide de cromosomas.

Finalmente, es importante saber qué sucede cuando la meiosis no produce el resultado esperado. Es raro que se produzcan fallos, bien en la primera, bien en la segunda división, o en la separación o disyunción de las cromátidas de una tétrada o de una diada. Cuando dos cromosomas del par homólogo no se separan ocurre una **no disyunción**. Como consecuencia se pueden formar algunos gametos anormales, bien con dos miembros del par de cromosomas homólogos o con ninguno. Después de la fecundación de estos por un gameto normal, el cigoto resultante tiene bien tres miembros (trisomía) o un solo miembro (monosomía) de dicho cromosoma. En animales este fenómeno tiene normalmente efectos graves o deletéreos.

Principios de la genética

Gregor Mendel fue el primero en establecer, mediante trabajos realizados con diferentes variedades de arvejas, los principios que rigen la herencia genética, es decir, la transmisión de un carácter de una generación a otra. La **Ley de Segregación Independiente** afirma que durante la formación de los gametos, los pares alélicos de cromosomas se separan durante la meiosis y se distribuyen en gametos diferentes. Solo un miembro de la pareja homóloga se transmite a la generación siguiente, y cada gameto posee una probabilidad equivalente de recibir cada miembro de la pareja homóloga parental. Los cromosomas homólogos se unen aleatoriamente en la fertilización y así se segregan independientemente de generación en generación.

La **Ley de Recombinación Independiente** establece que los alelos que determinan numerosos caracteres se heredan independientemente de ellos. En otras palabras, la herencia de un alelo, por ejemplo *JKA* del sistema Kidd que codifica el antígeno Jk^a , no ejerce influencia sobre la herencia de otro alelo, por ejemplo *FYB* que codifica el antígeno Fy^b del sistema Duffy.

Se denomina **ligamiento** a la asociación física entre dos genes que se ubican en el mismo cromosoma. Aunque todos los genes ubicados en el mismo cromosoma se encuentran ligados, esto no significa que los alelos presentes en el cromosoma de un individuo heredados del padre permanezcan en el mismo cromosoma paterno en la descendencia de este individuo. El efecto del entrecruzamiento durante la meiosis, como vimos, genera cromosomas recombinantes en los gametos con alelos provenientes de la línea paterna y de la línea materna. Cuanto más lejos se encuentren entre sí los genes, mayor es la probabilidad de que el ligamiento pueda romperse a través del entrecruzamiento, es decir “aparecen” como genes ubicados en diferentes cromosomas. Dos loci de genes portados por el mismo cromosoma que no se encuentran cercanos entre sí se denominan **sinténicos** o con **ligamiento parcial**. Por ejemplo, el locus *RH* ubicado en el brazo corto del cromosoma 1 y el locus *FY* presente en el brazo largo del cromosoma 1, son sinténicos, ya que la distancia entre ambos es lo suficientemente grande para que puedan experimentar entrecruzamiento y segregación independiente. Cuando dos loci, o los antígenos que estos codifican, son heredados como una unidad,

por ejemplo *RHD* y *RHCE*, con una frecuencia mayor a la esperada de manera aleatoria, forman un **haplotipo**. La distancia entre ambos loci es pequeña, es decir, muestran un **ligamiento total** y por lo general no se recombinan independientemente. Los genes que codifican los antígenos MN (*GYPA*) y Ss (*GYPB*) están contiguos (adyacentes) en el cromosoma 4 y se encuentran ligados formando un haplotipo. Por lo tanto, si se sabe por estudios familiares que una persona porta *M* con *S* en un cromosoma y *N* con *s* en el otro cromosoma 4, se transmitirán juntos formando los haplotipos *MS* y *Ns* a su descendencia. Para estos loci tan estrechamente ligados, la recombinación se observa ocasionalmente.

Debido a que los genes que forman haplotipos no se recombinan independientemente, los antígenos codificados por cada uno de dichos haplotipos muestran una frecuencia diferente a la esperada si estos genes no se encuentran estrechamente ligados. Si *M* y *S* se segregaran de manera independiente, la prevalencia esperada correspondiente a los antígenos *M* y *S* en la población sería de 17% (a partir de cálculos de frecuencia), mientras que la prevalencia observada del haplotipo *MS* es 24%.⁶ Esto constituye un **desequilibrio de ligamiento**, es decir, una tendencia de combinaciones específicas de alelos en dos o más loci ligados a ser heredados juntos con una frecuencia mayor a la esperada de manera aleatoria. En cambio se dice que los genes se encuentran en **equilibrio de ligamiento** cuando los alelos en dos loci se asocian conforme a sus frecuencias individuales en la población.

Interacción entre genes: efecto de posición y genes supresores. Alelos silentes

Los estudios de herencia familiar, y más recientemente la genética molecular, han permitido analizar la interacción entre genes que codifican características independientes. En el campo de la inmunohematología existen varios ejemplos de estas interacciones. La expresión de los antígenos de los glóbulos rojos puede ser modificada, por ejemplo, por alelos que codifican para proteínas diferentes. Los alelos transportados en el mismo cromosoma se encuentran en posición *cis*, mientras que aquellos que se ubican en cada uno de los cromosomas homólogos del par se hallan en posición *trans*. El **efecto de posición** se refiere a las modificaciones en la expresión de un determinado antígeno que puede provocar la presencia de un alelo que codifica para otro antígeno solo cuando se encuentra en determinada posición (*cis* o *trans*) con respecto al primero. Este efecto se observa en la expresión del antígeno D.⁶⁻⁸ Cuando un haplotipo *dCe* se encuentra en *trans* en relación con un haplotipo que codifica para el antígeno D (por ejemplo el genotipo *DcE/dCe* ó *Dce/dCe*), la expresión de D se reduce de manera notable dando como resultado un fenotipo con expresión débil del antígeno D. Cuando se hereda el mismo haplotipo que codifica D, ya sea con *dce* o *dcE* (por ejemplo los genotipos *DCe/dce*, *DCe/dcE*, *Dce/dce*, etc), la expresión del antígeno D es normal.

Los **genes inhibidores** o **supresores** son aquellos que afectan la expresión de otro gen o genes. Por ejemplo, un

tipo raro de fenotipo Jk(a- b-) es el resultado de la supresión del antígeno Kidd por *In(Jk)* un gen dominante que es independiente de *JK*. En el sistema Lutheran, algunos fenotipos Lu(a- b-) se originan por la presencia del gen supresor dominante llamado *In(Lu)*. Por otro lado, algunas mutaciones descritas en el gen *RHAG* pueden provocar la supresión de los antígenos del sistema Rh, lo cual origina el fenotipo Rh nulo; así como también mutaciones en el alelo *XK* del sistema Kx producen variantes alélicas que pueden afectar la expresión de los antígenos del sistema Kell.^{6,9-13}

Otro concepto importante en inmunohematología es el de **alelo silente** o **alelo nulo**. Se denomina así a las variantes alélicas de un gen, las cuales portan mutaciones que impiden la expresión del antígeno que codifican. Estas mutaciones pueden generar un codón de terminación prematura de la transcripción, lo que da origen a una proteína truncada que no se integra en la membrana eritrocitaria y probablemente se degrade en el citoplasma. Un ejemplo de lo anteriormente expuesto es el alelo *RHD ψ* del sistema Rh.¹⁴ Otro ejemplo de alelo silente es el híbrido *RHD-CE-D^s*. En este caso, la variante alélica da origen a una proteína quimérica que no expresa los epitopes del antígeno D.¹⁵

Herencia mendeliana

La herencia de los antígenos de los glóbulos rojos sigue un cierto patrón que depende de la localización de los alelos que los codifican en autosomas o en el cromosoma X y del carácter dominante o recesivo de los mismos. Existen

cuatro patrones básicos de herencia: autosómica dominante (el cual incluye al autosómico codominante), el autosómico recesivo, el dominante ligado al sexo y el recesivo ligado al sexo. Se dice que un carácter es dominante si se expresa cuando un único miembro de un par de autosomas lleva el gen (estado heterocigota) para el carácter (por ejemplo, A en *A/O*); se dice que es codominante cuando cada miembro de un par autosómico lleva un alelo diferente (estado heterocigota), cada uno de los cuales produce un carácter observable (por ejemplo, A y B en *A/B*). Un carácter recesivo es aquel que no se expresa por heterocigotas (por ejemplo, O en *A/O* o *B/O*), la manifestación de este carácter solo es posible cuando el alelo recesivo está presente en estado homocigota, es decir, en ambos miembros de la pareja autosómica (por ejemplo O en *O/O*).

Herencia autosómica dominante

Un antígeno heredado en forma autosómica dominante siempre se expresa en presencia del alelo relevante, independientemente del estado homocigoto o heterocigoto del individuo. La frecuencia de un antígeno codificado por un alelo dominante será igual tanto en hombres como en mujeres. El sistema de grupo sanguíneo ABO representa un buen ejemplo de herencia autosómica dominante para los alelos *A* y *B* con respecto del alelo *O*.

Herencia autosómica codominante

Los alelos que muestran herencia autosómica codominante expresan siempre sus productos en condición heteroci-

gota. Por lo tanto, cuando los eritrocitos expresan los antígenos Jk^a y Jk^b se puede inferir la presencia de alelos codominantes, un alelo que codifica Jk^a y otro alelo que codifica Jk^b , es decir, un genotipo JKA/JKB . Los alelos A y B del sistema ABO muestran herencia autosómica codominante entre ellos.

Herencia autosómica recesiva

Un carácter con herencia autosómica recesiva se expresa solo en una persona que es homocigota para el alelo recesivo, y por lo tanto lo ha heredado de ambos progenitores. Los caracteres recesivos se transmiten con frecuencias equivalentes en hombres y mujeres. Por ejemplo, el alelo O del sistema ABO es recesivo, y solo las personas homocigotas para O (genotipo O/O) serán del grupo sanguíneo O .

Herencia ligada al sexo

Un carácter ligado al sexo se encuentra codificado por un gen ubicado en alguno de los cromosomas sexuales (X o Y) y es transmitido por estos. En general, la herencia ligada al sexo tiende a ser sinónimo de herencia ligada al cromosoma X , ya que el cromosoma Y posee escasos genes funcionales que están principalmente vinculados en la determinación de las características sexuales masculinas secundarias. Las mujeres poseen dos cromosomas X , la herencia de los genes transportados por X como la de los genes presentes en autosomas puede ser dominante o recesiva. Los hombres, en cambio, poseen un solo cromosoma X que siempre deriva de la línea materna y un cromosoma Y proveniente del padre, es decir, son

hemicigotos para los genes del cromosoma X y Y . Muchos genes transmitidos por X no poseen un homólogo en el cromosoma Y , en consecuencia, un carácter dominante transmitido por X será expresado tanto en mujeres como en hombres; en cambio, un carácter recesivo transmitido por X será expresado solo en mujeres homocigotas y en todos los hombres que porten el gen. La herencia ligada al cromosoma X , tanto dominante como recesiva, nunca se transmite de hombre a hombre, es decir, de padres a hijos varones.

Herencia dominante ligada al sexo

Un carácter codificado por un alelo presente en el cromosoma X que posee una herencia dominante ligada al sexo se expresa en hombres y en mujeres tanto homocigotas como heterocigotas. El antígeno Xg^a es codificado por un alelo dominante en el cromosoma X (locus XG) denominado Xg^a . Se espera que un padre $Xg(a+)$ transmita el alelo Xg^a a todas sus hijas, pero a ninguno de sus hijos. Por otro lado, una mujer heterocigota para Xg^a (Xg^a/Xg) transmitirá al 50% de su descendencia (varones y mujeres) el carácter $Xg(a+)$. Por el contrario, si la mujer es homocigota para Xg^a (Xg^a/Xg^a), el antígeno Xg^a se expresará en todos sus hijos.

Herencia recesiva ligada al sexo

Un carácter codificado por un alelo recesivo presente en el cromosoma X se expresa en mujeres homocigotas y en todos los hombres, en cambio, este carácter no se manifiesta fenotípicamente en mujeres heterocigotas, siendo éstas portadoras sólo del alelo recesivo. El

ejemplo más representativo de herencia recesiva ligada a X es la hemofilia A. En el campo de la inmunohematología encontramos un ejemplo en el sistema Kx. Variantes alélicas del gen *XK* producen glóbulos rojos con el fenotipo Mc Leod. Estos eritrocitos poseen una expresión disminuida de los antígenos del sistema Kell por estar ambas proteínas, Kx y Kell, asociadas fenotípicamente.^{6,12,13} El síndrome Mc Leod se hereda como una condición recesiva ligada a X que se detecta casi exclusivamente en hombres. Es poco probable encontrar mujeres homocigotas que expresen esta condición, ya que las mismas deberían descender de una madre portadora y un padre afectado. Debido a la baja frecuencia de las variantes alélicas responsables del fenotipo Mc Leod, el cruzamiento antes mencionado es poco frecuente. Por otro lado, debido a que *XK* está sujeto a la inactivación del cromosoma X (lyonización), las mujeres portadoras pueden tener una población de glóbulos rojos mezclada, constituida por eritrocitos Kx+ y Kx- con una expresión debilitada de los antígenos del sistema Kell. La inactivación del cromosoma X es un proceso por el cual muchos de los genes presentes en uno de los dos cromosomas X de cada célula somática femenina son inactivados en una etapa muy temprana del desarrollo embrionario. Es una cuestión de azar si el cromosoma X de origen materno o paterno se inactiva en cualquier célula, pero una vez ocurrida la inactivación, todas las descendientes de dichas células tendrán el mismo cromosoma X inactivado. Es importante destacar que algunos genes transportados por X escapan a la inactivación, como por ejemplo *XG*.

Genética poblacional

La genética poblacional es el estudio de la distribución de los alelos y de los factores que mantienen o modifican sus frecuencias.

Frecuencia fenotípica

La frecuencia fenotípica se refiere al número de individuos que expresan una cualidad del fenotipo en estudio, en relación con el total de individuos de la población problema. Por ejemplo, si se tipifican 1.000 donantes con anti-c y se obtienen 850 reacciones positivas y 150 negativas, la prevalencia del fenotipo c+ es 85% y la frecuencia del fenotipo c- es 15%. Por lo tanto, en la población de donantes, aproximadamente el 15 % de las unidades de sangre ABO compatibles (es decir una de cada siete) deberán ser compatibles con el suero de un paciente que ha desarrollado un anti-c.

Frecuencia génica o alélica

El término frecuencia génica o alélica se refiere al número de veces que un alelo se encuentra presente en relación con el número total de alelos, de la población en estudio, para un locus particular. Dicha frecuencia puede calcularse a partir de la prevalencia de cada fenotipo observado en una población. Por ejemplo, si la tipificación de una población de 206 individuos determina los siguientes fenotipos: Fy(a+ b-)=69, Fy(a+ b+)=80 y Fy(a- b+)=57 se puede inferir que se detectaron 218 alelos *FYA* (69x2+80) y 194 alelos *FYB* (57x2+80), en un total de 412 alelos estudiados, por lo tanto, la frecuencia alélica para

FYA es $218/412=0,53$ y para FYB es $194/412=0,47$.

Ley de Hardy-Weinberg

La Ley de Hardy-Weinberg, también llamada ley del equilibrio genético, es un conjunto de fórmulas matemáticas que describen cómo la proporción de distintos alelos puede permanecer constante a lo largo del tiempo en una población numerosa de individuos. Esta ley indica la frecuencia con la que determinados alelos y genotipos deberían aparecer en una población. Mediante el estudio de estas frecuencias, alélicas y genotípicas, los científicos pueden identificar poblaciones que están cambiando genéticamente o evolucionando. En el lenguaje de la genética de poblaciones, la ley de Hardy-Weinberg afirma que, bajo ciertas condiciones, tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los alelos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular. Es decir, la herencia mendeliana, por sí misma, no genera cambios evolutivos.

La Ley de Hardy-Weinberg tiene dos implicaciones fundamentales, por un lado, establece que la suma de las frecuencias alélicas y genotípicas para un locus determinado es igual a 1, y por otro, que las frecuencias alélicas y genotípicas permanecen sin cambios de generación en generación. La Ley de Hardy-Weinberg permite calcular la proporción de homocigotas y heterocigotas para un dado locus en una población que se encuentre en equilibrio. En los bancos de sangre, este conocimiento puede aplicarse para determinar la probabilidad de encontrar sangre com-

patible para un paciente que ha desarrollado anticuerpos contra antígenos eritrocitarios.

Fenotipos combinados

Cuando se necesita transfundir a un paciente que ha desarrollado anticuerpos contra uno o varios antígenos eritrocitarios puede utilizarse un cálculo simple para estimar el número de unidades que se necesitan evaluar con el fin de encontrar al menos una compatible, es decir, que sea negativa para los antígenos en cuestión. Para calcular la frecuencia de muestras con el fenotipo negativo buscado, se debe multiplicar la prevalencia de cada uno de los antígenos negativos individuales, ya que los mismos son heredados independientemente, al menos que muestren desequilibrio de ligamiento. Si un paciente con anticuerpos contra los antígenos c , Fy^b y K necesita dos unidades de sangre, el número de unidades que deberán evaluarse puede calcularse utilizando las frecuencias fenotípicas de muestras antígenos negativas. Así, la frecuencia de muestras c^- es 0,15, la de $Fy(b^-)$ es 0,34 y la de K^- es 0,91, entonces la frecuencia de muestras negativas para los tres antígenos es $0,15 \times 0,34 \times 0,91 = 0,05$ o sea 5%. Por lo tanto, se espera que una de cada veinte unidades de glóbulos rojos concuerden con el perfil fenotípico deseado y deberán estudiarse veinte donantes ABO compatibles para encontrar una unidad compatible y cuarenta para encontrar las dos unidades requeridas por el paciente. Debido a que la prevalencia de algunos antígenos eritrocitarios varía en las diferentes poblaciones, es im-

portante que cada banco de sangre elabore estadísticas propias con los datos regionales.

Estructura del ADN

Como ya se ha comentado, el ADN es la molécula que contiene la información genética de un individuo y se localiza en el núcleo de las células. El ADN está formado por nucleótidos, cada uno de ellos compuesto por una base nitrogenada (adenina, citosina, guanina o

timina), un azúcar (2-desoxi-D-ribosa) y un grupo fosfato (Figura 5). Su estructura es la de una doble hélice, en la que las bases, que son las portadoras de la información genética, se sitúan en el interior, mientras que los grupos de azúcar y fosfato, que tienen un papel estructural, se disponen en el exterior. Las dos hebras que forman la doble hélice se mantienen unidas gracias a los puentes de hidrógeno que se forman entre sus bases. Las bases se aparean específicamente en función de su **com-**

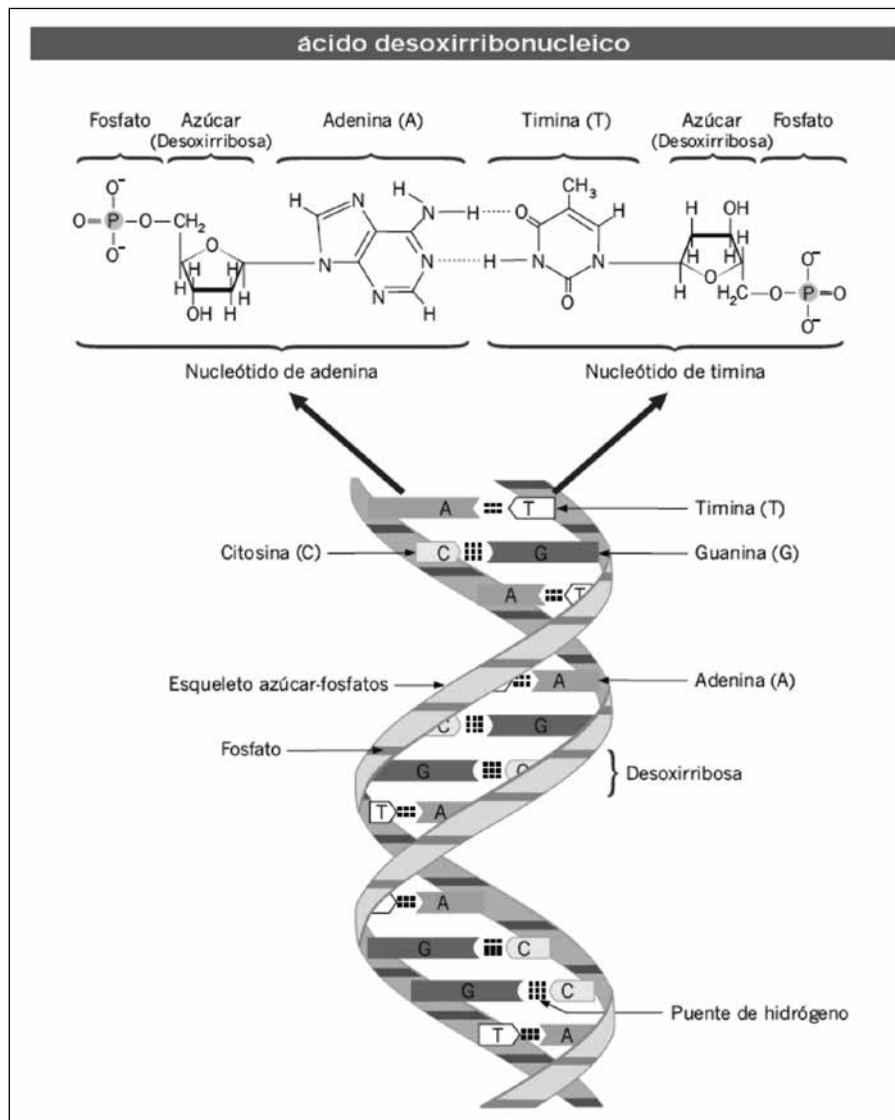


Figura 5. Estructura química y organización tridimensional del ácido desoxirribonucleico

plementariedad: siempre Adenina (A) con Timina (T), y Guanina (G) con Citosina (C). El orden en el que se disponen las bases (**secuencia**) determina la información genética que se hereda de generación en generación.

Transcripción

Cuando un gen se expresa, se desencadena una serie de procesos que empiezan con la transcripción. Durante este proceso, la información contenida en la secuencia de ADN se copia en el ARN (ácido ribonucleico). La estructura del ARN es similar a la del ADN, con algunas diferencias: 1) los ribonucleótidos están formados por ribosa, en lugar de 2-desoxi-D-ribosa; 2) el uracilo sustituye la timina; y 3) el ARN es de cadena

simple, en vez de la doble cadena característica del ADN.

Durante la transcripción, la maquinaria celular separa la doble hélice de ADN y sintetiza una cadena de ARN de secuencia complementaria a la cadena de ADN que utiliza como molde. Las moléculas de ARN sintetizadas son procesadas después de la transcripción y transportadas a través de los poros de la membrana nuclear hasta el citoplasma (Figura 6).

Procesamiento y traducción del ARNm

Entre los diferentes tipos de ARN que existen en las células, los ARNm son las moléculas que contienen la información específica que sirve de molde

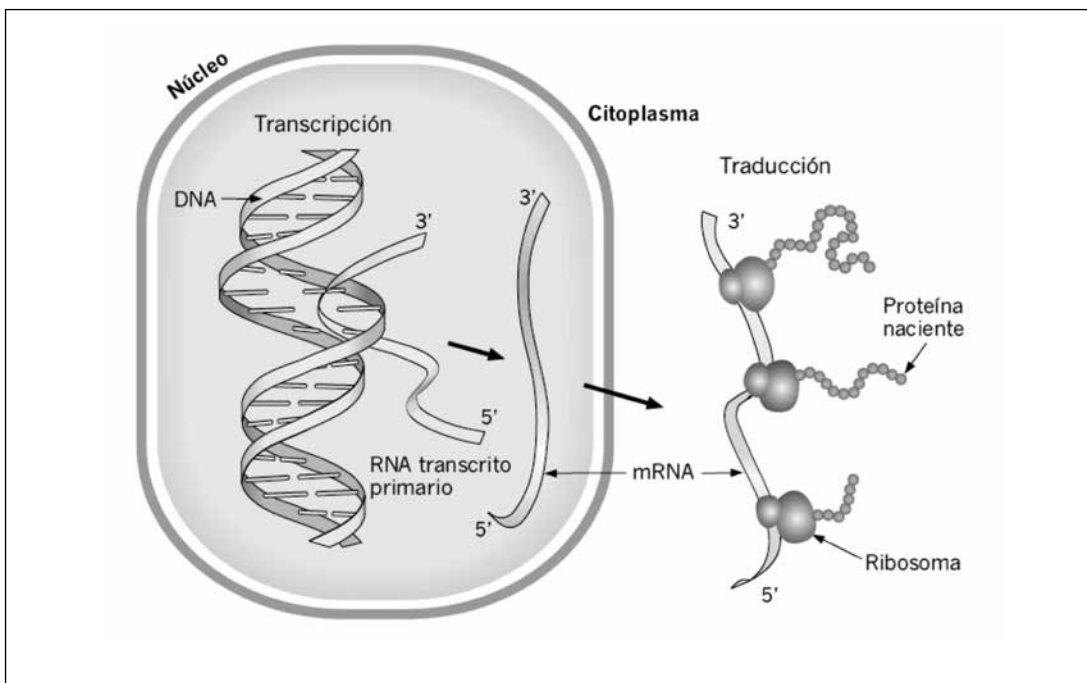


Figura 6. Procesos de transcripción y traducción. Localización celular. Estos procesos se llevan a cabo de forma secuencial. En el núcleo tiene lugar la transcripción y la maduración del transcrito primario, mientras que la traducción requiere que el ARNm salga del núcleo para ser traducido.

Fuente: Diccionario Novartis de genómica y medicina molecular (Rubes Editorial S.L., 2006).

para sintetizar las proteínas. Estas moléculas sufren una serie de modificaciones postranscripcionales en el núcleo, que comportan la eliminación de las secuencias no codificantes (intrones) y la adición de una cola poliA en el extremo 3', para dar estabilidad y facilitar su transporte hacia el citoplasma.

En el citoplasma tiene lugar la síntesis de la proteína por traducción del ARNm, proceso en el cual participan los orgánulos denominados ribosomas y que consiste en la adición secuencial de aminoácidos de acuerdo con el orden de bases en cada codón o triplete de la secuencia del ARNm (las tres bases de cada codón codifican un aminoácido).

Mutaciones

Una mutación es una alteración o cambio en la información genética que puede afectar al fenotipo.¹⁶ Puede ser una mutación puntual ocasionada por el cambio de un sólo nucleótido o bien puede afectar un fragmento más grande, como en el caso de las deleciones y las inserciones. Las mutaciones se producen espontáneamente y se pueden transmitir a la descendencia.

Tipos de mutaciones

Mutación con cambio de sentido: Mutación puntual que cambia un codón codificante por otro que codifica para un aminoácido distinto.

Mutación con desplazamiento del marco de lectura: Cambio en la secuencia de ADN por adición o deleción de una o más bases, que provoca un cambio en la pauta de lectura de los tripletes y altera, en consecuencia, los aminoácidos codificados.

Mutación sin sentido: Mutación que origina la sustitución de un codón codificante por un codón de parada, provocando la finalización del proceso de traducción.

Deleción: Tipo de mutación que consiste en la pérdida de un segmento de material genético. Puede afectar uno o varios nucleótidos, un gen entero o un fragmento de cromosoma.

Inserción: Mutación causada por la presencia de uno o más nucleótidos extras en una secuencia de ADN. Según donde se produzca la inserción, puede alterar la pauta de lectura de una secuencia codificante.

Entrecruzamiento o recombinación de secuencias: Intercambio de material genético que tiene lugar durante la meiosis, en la cual los cromosomas homólogos intercambian fragmentos. Este proceso posibilita la aparición de nuevas combinaciones de alelos.

Entrecruzamiento desigual o recombinación no homóloga: Ocurre cuando la recombinación se da entre secuencias no pertenecientes a un mismo alelo. Las secuencias entre las que se da el entrecruzamiento comparten, sin embargo, una alta homología que posibilita el mal apareamiento.

Conversión génica: Supone la modificación de un alelo (aceptor de información) determinada por otro alelo que no resulta alterado (donador de secuencia o de información), y puede abarcar fragmentos desde pocos a varios centenares de pares de bases (Figura 7). Sería como un doble entrecruzamiento donde también intervendrían secuencias altamente homólogas entre los alelos implicados.

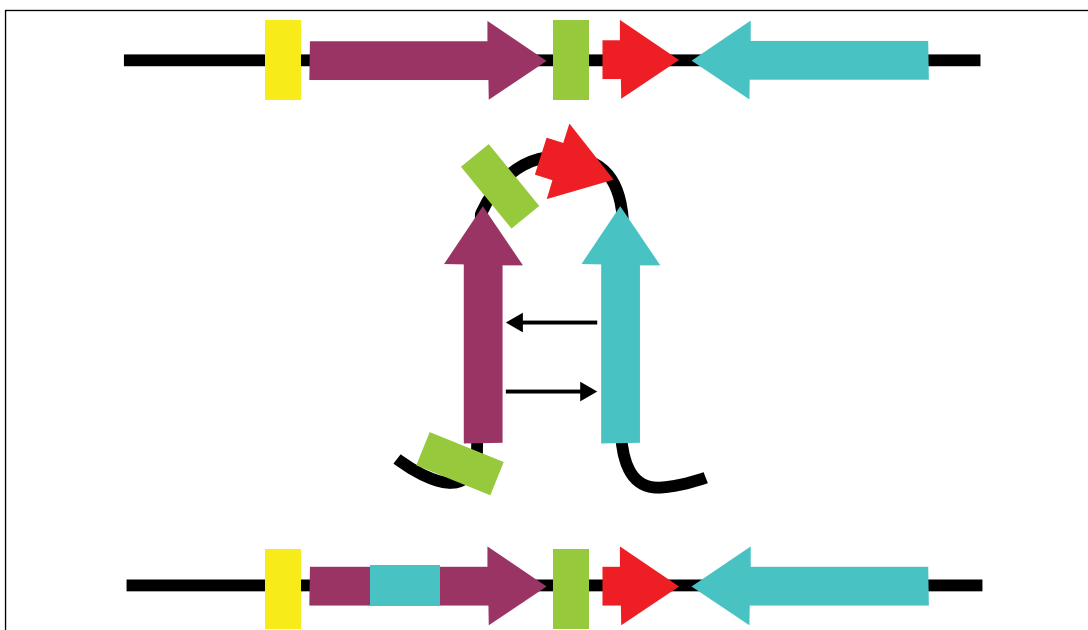


Figura 7. Diagrama representativo del mecanismo por el que se produce una conversión génica

Bases moleculares de los grupos sanguíneos

Hoy en día se conocen las bases moleculares de la mayoría de los antígenos de grupo sanguíneo.^{5,6,17} Se han descrito diferentes mecanismos moleculares que originan o anulan la expresión de estos antígenos. A pesar de esta cierta heterogeneidad en las bases moleculares, la mayoría de los antígenos de grupo sanguíneo se han producido como sustituciones de un único nucleótido, también llamados SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), que comportan a su vez el cambio de un aminoácido en la proteína correspondiente. Por ejemplo, si nos fijamos en el gen que codifica para la proteína Kell (Figura 8), veremos que la secuencia alélica que determina la expresión del antígeno K (Kell) difiere del alelo que determina su antígeno antitético k (Cellano) en un único nucleótido. Este cambio T>C en la posición 578 de la secuencia del gen,

comporta a su vez un cambio de aminoácido (de Metionina a Treonina) en la posición 193 de la proteína.

Gen *KEL* - exón 6

```
GC A T G CAA TAT GCG AAC K
GC A C G CAA TAT GCG AAC k
M193T
```

Figura 8. Polimorfismo genético asociado a la expresión del antígeno Kell

Del mismo modo que en el ejemplo, muchas otras parejas de antígenos de grupo sanguíneo eritrocitario (C/c, E/e, M/N, S/s, Fy^a/Fy^b, Jk^a/Jk^b, Lu^a/Lu^b, entre otros) y prácticamente todos los antígenos plaquetarios están determinados por polimorfismos o cambios de un único nucleótido.

Por otro lado, mutaciones puntuales son también la base de algunos fenotipos nulos, como en el Sistema Duffy, en el que existe un cambio en un úni-

co nucleótido (-67T>C) en la región reguladora del gen. Esta alteración puntual de la secuencia, característica del alelo *FY*02N.01* (también conocido como *Fy^{null}*), afecta de forma drástica la expresión del gen que codifica para la proteína Duffy en los eritrocitos, de

forma que el fenotipo eritrocitario resultante es nulo para esta proteína.

En otros casos, el mecanismo es una deleción completa del gen en cuestión. El ejemplo más conocido es el de la ausencia del gen *RHD* en los individuos RhD negativo (Figura 9).

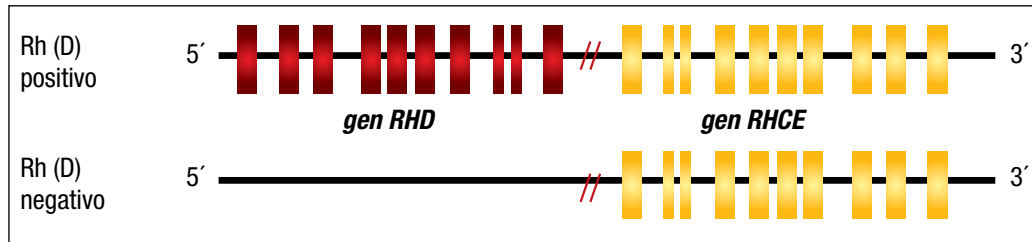


Figura 9. Deleción completa del gen *RHD* en el locus genético *RH*.

Otro ejemplo de deleción, aunque afectando un sólo nucleótido, lo encontramos en el Sistema ABO, en el que la forma común del alelo O presenta una deleción de una Guanina (G) en la posición 261 del gen. Esta alteración provoca un cambio en la pauta de lectura de los codones a partir de esa posición, y la proteína resultante es, en consecuencia, una proteína truncada y no funcional.

Finalmente, y aunque más restringido a determinados sistemas de grupo sanguíneo, existe también otro mecanismo molecular que determina la expresión de ciertos antígenos. Se trata de la recombinación entre genes homólogos, en la que tal como se ha podido observar en la Figura 7, se intercambian secuencias de un gen con secuencias de otro gen adyacente con el que comparte un alto grado de similitud en su secuencia nucleotídica. Este tipo de alteraciones, que generan lo que podríamos llamar alelos híbridos, se dan especialmente en los Sistemas Rh y MNS.

Técnicas moleculares en el diagnóstico inmunohematológico

El conocimiento de las bases moleculares de los antígenos de grupo sanguíneo ha hecho posible la utilización de técnicas de análisis molecular para detectar los polimorfismos genéticos que determinan la expresión de los diferentes antígenos. Nos referimos a las técnicas de tipificación molecular de grupos sanguíneos, utilizadas en diferentes contextos para la tipificación de antígenos eritrocitarios.

Aislamiento de los ácidos nucleicos

El primer paso en la mayoría de los análisis de polimorfismos genéticos es el aislamiento de los ácidos nucleicos. Como la composición genética es idéntica en todas las células de un individuo se puede determinar el genotipo de un grupo sanguíneo analizando el ADN de cualquier célula, aunque ese antígeno en particular sólo se exprese en los

eritrocitos. A efectos prácticos, tanto en el caso de donantes de sangre como en el caso de pacientes, la muestra que se utiliza habitualmente para obtener el ADN es sangre periférica. Los leucocitos de la sangre son en realidad las células de las que se extrae normalmente el ADN para después realizar un estudio de genotipificación. Sólo en el ámbito del diagnóstico prenatal, como se verá en el Capítulo 25, se utiliza otro tipo de muestras a modo de material de partida para la obtención de ADN, como puede ser líquido amniótico, vellosidades coriales o el mismo plasma de las gestantes.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las aproximaciones para llevar a cabo una tipificación molecular de grupos sanguíneos, se basan en la técnica de PCR (polymerase chain reaction) o reacción en cadena de la polimerasa. La técnica de PCR consiste en una reacción de síntesis enzimática que permite

amplificar *in vitro* secuencias de ADN de forma específica. Para ello se requieren dos oligonucleótidos (cadenas de ADN de corta longitud), denominados cebadores o primers, complementarios a las secuencias que flanquean el fragmento de ADN de interés (Figura 10).

La amplificación se consigue mediante ciclos repetidos que consisten, cada uno de ellos, en las siguientes tres fases:

- **Desnaturalización:** En presencia de altas temperaturas (94 °C-96 °C) la doble cadena de ADN se separa en dos cadenas sencillas.
- **Hibridación:** Al bajar la temperatura hasta aproximadamente 50 °C-65 °C, los cebadores se unen (hibridan) con sus secuencias complementarias en ambas cadenas.
- **Elongación:** A 72 °C una enzima ADN polimerasa sintetiza a partir de los cebadores una copia complementaria a la cadena parental que utiliza como molde.

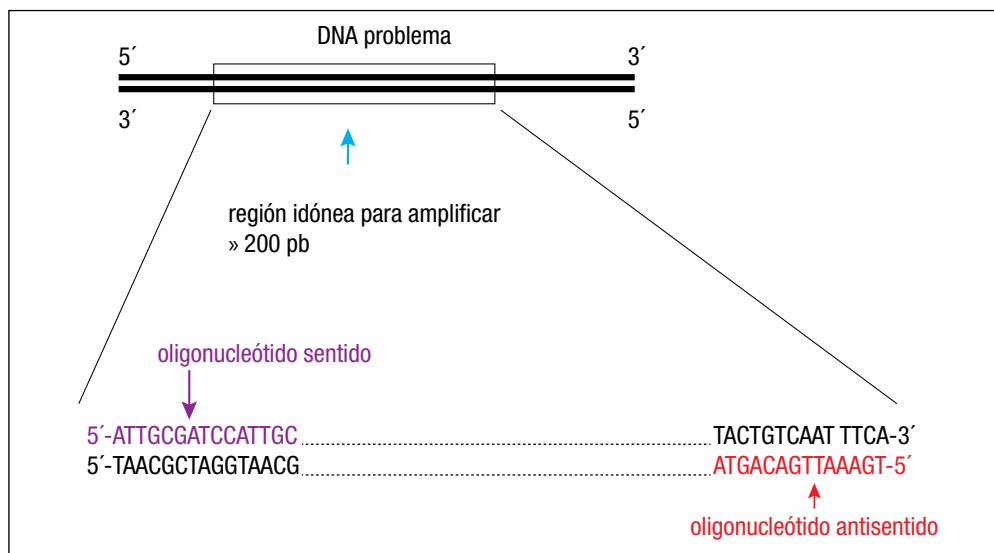


Figura 10. Diseño y localización de los cebadores para iniciar una reacción de amplificación

Estas tres fases, realizadas de forma automática en un termociclador, se repiten hasta un total de 20 a 40 ciclos, resultando en la acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN cuyos extremos terminales vienen definidos por el extremo 5' de los cebadores (Figura 11). Esta amplificación selectiva, de una magnitud 10^6 , facilita enormemente el posterior análisis de una determinada secuencia de ADN.

Las variantes de esta técnica más utilizadas en tipificación molecular de grupos sanguíneos son las siguientes:

PCR-ASRA (*allele specific restriction analysis*)

Esta técnica se basa en el hecho de que mutaciones puntuales en el ADN (como los polimorfismos genéticos asociados a los grupos sanguíneos) generan o eliminan secuencias de reconocimiento específicas para determinadas enzimas de restricción. La técnica consta de dos etapas: a) Una primera etapa en la que se lleva a cabo la amplificación por PCR

del fragmento genómico que contiene la posición polimórfica a analizar, y b) una segunda etapa en la que se analiza el producto amplificado por digestión con una endonucleasa de restricción específica. De este modo, combinando la PCR con el análisis de restricción, es posible detectar las variantes alélicas de un sistema en función de los diferentes patrones de digestión con la enzima.

La aplicación de esta técnica al genotipaje de grupos sanguíneos es muy limitada hoy en día, ya que otras aproximaciones resultan más ágiles y menos tediosas.

PCR con cebadores alelo-específicos (PCR-SSP)

Esta técnica, muy utilizada también en la tipificación de los antígenos HLA, permite distinguir de forma directa entre variantes alélicas de un mismo sistema. Esta aproximación requiere el uso de cebadores diseñados de tal forma que su extremo terminal se correspon-

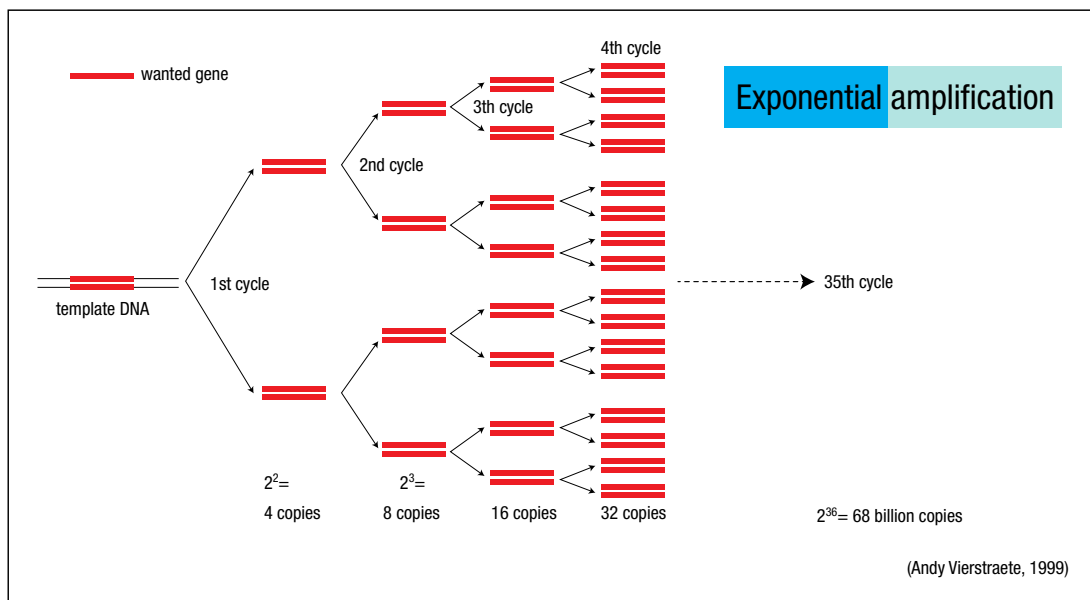


Figura 11. Amplificación selectiva de una determinada secuencia de ADN

da específicamente con una secuencia alélica concreta. En condiciones apropiadas, una diferencia (*mismatch*) en este extremo del cebador inhibe la amplificación. La técnica requiere de una batería de cebadores que cubra las diferentes variantes alélicas de cada sistema. De esta forma, la obtención o no de producto de amplificación con una determinada combinación de cebadores establecerá la especificidad de grupo sanguíneo de una muestra dada. Las bases de la técnica de PCR-SSP se muestran de forma esquemática en la Figura 12.

La aplicación de esta técnica ha facilitado notablemente la tipificación molecular, en especial desde el desarrollo de protocolos que permiten tipificar varios sistemas bajo las mismas condiciones de amplificación.^{18,19} Por esta razón, la PCR-SSP se implantó en muchos laboratorios y sigue siendo téc-

nica de referencia para el genotipaje de grupos sanguíneos.

PCR fluorescente a tiempo real

Esta otra aproximación se basa en la utilización de unas sondas alelo-específicas marcadas con una molécula fluorescente (reporter) en un extremo. La técnica, representada de forma esquemática en la Figura 13, consiste en amplificar mediante PCR un fragmento que incluya el polimorfismo a analizar, añadiendo a la reacción las sondas marcadas. Para la discriminación entre las dos variantes alélicas de un mismo sistema se utilizan dos sondas (cada una de ellas complementaria al alelo correspondiente) marcadas con fluorocromos distintos. Durante la amplificación, la propia actividad de la Taq ADN polimerasa degrada las sondas que encuentra en su recorrido, liberando así el fluorocromo correspondiente. Cuando esto ocurre,

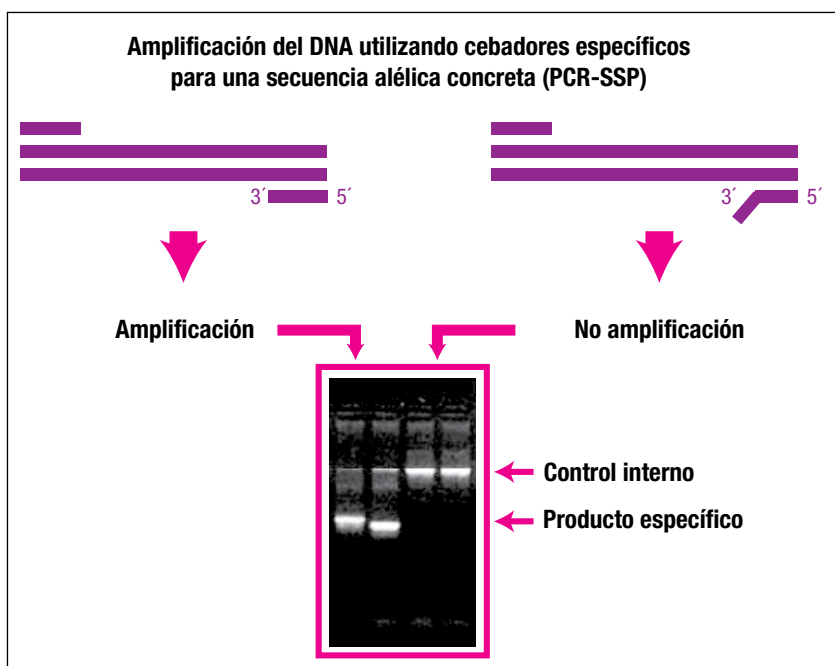


Figura 12. Fundamento de la técnica de PCR-SSP

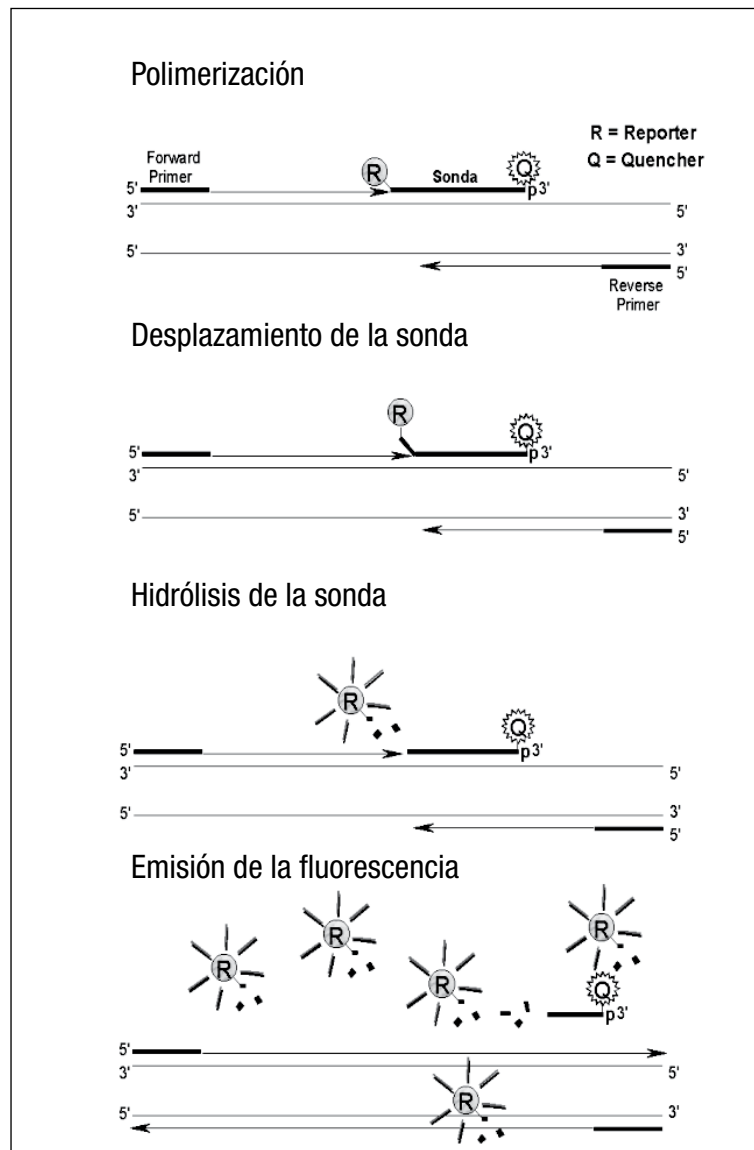


Figura 13. Fundamento de la técnica de PCR a tiempo real utilizando sondas fluorogénicas TaqMan®

se registra un aumento en la emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de producto amplificado.

Esta aproximación permite utilizar un único tubo de reacción para determinar los dos alelos de un mismo sistema. Además, los resultados se leen de forma automática inmediatamente después de la reacción de PCR, obviando así la necesidad de procesamiento posreacción

de amplificación. Estas ventajas la convierten en una técnica muy adecuada para trabajar con un número creciente de muestras.²⁰ Así mismo, la elevada sensibilidad que aporta el hecho de combinar la reacción de amplificación con la incorporación de fluorescencia, hace que esta técnica sea también de gran utilidad en el contexto del diagnóstico prenatal.

Tecnología de los microarrays o chips de ADN (Figura 14)

Avances tecnológicos recientes han propiciado el desarrollo de plataformas que permiten analizar un número elevado de polimorfismos genéticos simultáneamente. Algunas de estas plataformas, como los denominados chips de ADN o “microarrays”, se están aplicando hoy en día a la genotipificación extensiva de grupos sanguíneos.^{21,22}

De forma general, esta nueva metodología se basa en la amplificación simultánea de los diferentes locus de interés y en la hibridación subsiguiente con

sondas oligonucleotídicas específicas, inmovilizadas en un soporte sólido. Dependiendo del sistema, este soporte sólido puede ser un porta de vidrio tratado, una matriz de sílice o un conjunto de microesferas en suspensión. La combinación de un marcaje fluorescente permite visualizar y cuantificar las secuencias que han hibridado de forma específica con sondas concretas y en posiciones concretas del chip. El análisis de la imagen que se obtiene al exponer el chip a la luz de un láser nos permite, al final del proceso, obtener un genotipo extensivo de grupos sanguíneos de un individuo.

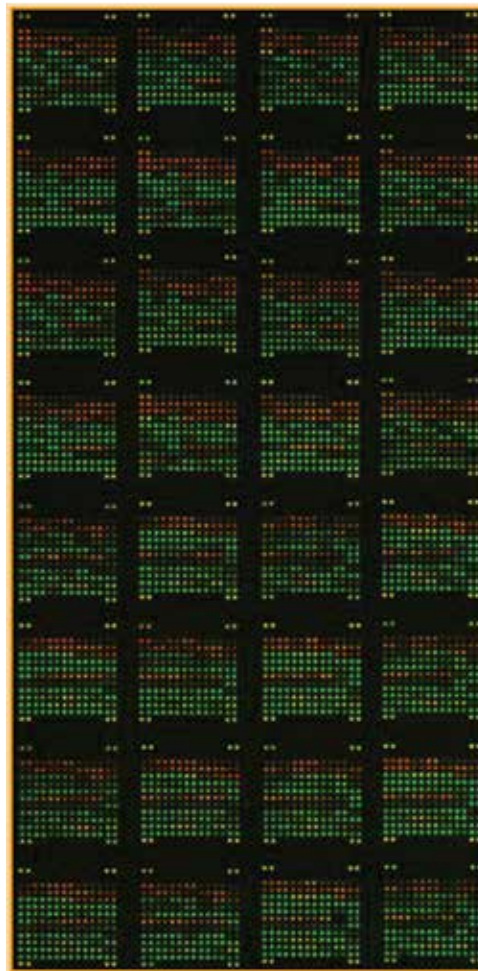


Figura 14. Imagen de un chip (BloodChip®) obtenida por el escaner al final del proceso. La interpretación de la imagen mediante un *software* específicamente desarrollado, permite transformar los datos adquiridos en genotipo eritrocitario y en fenotipo inferido.

Secuenciación de ADN

A diferencia de lo que ocurre en la tipificación de los antígenos leucocitarios de histocompatibilidad (HLA), la secuenciación de ADN no es una técnica que se aplique rutinariamente a la tipificación molecular de grupos sanguíneos. Sin embargo, y dado que permite determinar la secuencia de nucleótidos en una región o locus de interés, llega a ser de utilidad en aquellos casos en los que se sospecha de alguna alteración o polimorfismo muy poco frecuente o no detectable mediante otras técnicas moleculares más comunes.

Así mismo, la caracterización de nuevas variantes alélicas requiere del análisis completo de la correspondiente secuencia nucleotídica mediante secuenciación del ADN.

Aplicaciones de las técnicas moleculares en Inmunohematología

El tipaje serológico de los grupos sanguíneos eritrocitarios se lleva a cabo habitualmente mediante la técnica de hemaglutinación, que sigue siendo hoy en día la técnica de referencia para la determinación de los antígenos de grupo sanguíneo. Sin embargo, existen circunstancias en las que la tipificación serológica presenta limitaciones:

- No es fiable para determinar los antígenos de grupo sanguíneo en pacientes recientemente transfundidos.
- Tipificación difícil en pacientes con una prueba de la antiglobulina directa positiva.
- Presenta errores en la tipificación de antígenos débiles.

Además de estas limitaciones, existen otros inconvenientes técnicos asociados a la tipificación serológica que han sido solventados mediante la tipificación molecular, como puede ser la escasez o ausencia de reactivos serológicos para tipificar determinados grupos sanguíneos, especialmente antígenos de baja frecuencia.

La tipificación molecular de grupos sanguíneos se ha ido implementando en los Bancos de Sangre y Centros de Transfusión de forma progresiva a lo largo de los últimos diez años, con un número creciente de aplicaciones.^{23,24} En este apartado se resumen las más relevantes, aunque una explicación más detallada se incluye en el Capítulo 25, *Contribución de las técnicas moleculares a la EHFRN*, o en el Capítulo 5, *Sistema Rh*.

Identificación de variantes RhD en muestras con expresión anómala del antígeno D

La determinación del genotipo *RHD* en muestras de donantes, pacientes o gestantes con un patrón anómalo de expresión del antígeno D, es una de las aplicaciones prácticas de las técnicas moleculares más frecuentes en Inmunohematología. La tipificación molecular *RHD* complementa el estudio serológico de estas muestras y permite identificar las diferentes variantes RhD, discriminando inequívocamente entre un D parcial y un D débil.

Se han desarrollado diferentes métodos para la determinación del genotipo *RHD*, todos ellos teniendo en cuenta la elevada homología existente entre el gen *RHD* y el gen adyacente *RHCE*.

Tanto estos métodos como su utilidad están ampliamente explicados en el apartado de Tipificación molecular del Capítulo 5, *Sistema Rh*.

Resolución de discrepancias globular-séricas en la tipificación ABO

Otra aplicación práctica de estas técnicas es la determinación del genotipo *ABO* en muestras de donantes (o pacientes) con una discrepancia globular-sérica en la tipificación serológica *ABO*. Una de las estrategias utilizadas es la PCR-SSP, con cebadores específicos para la detección de las principales variantes alélicas de este sistema (Figura 15).

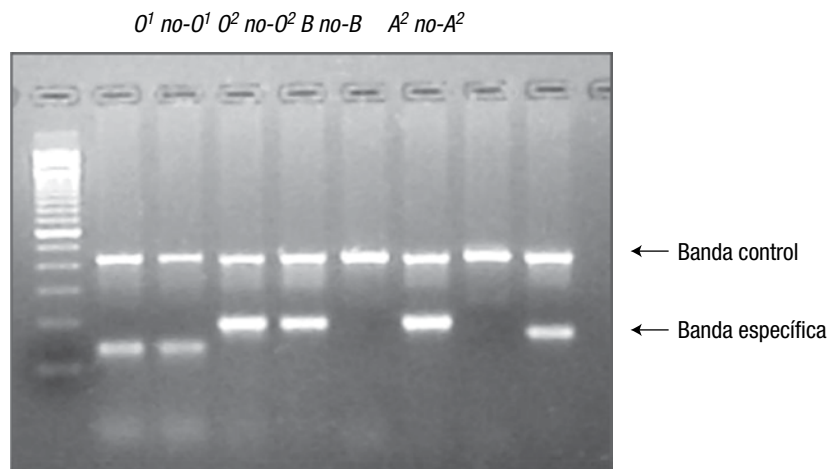
En el Sistema *ABO*, las diferencias entre los alelos *A*, *B* y *O* no son un único cambio de nucleótido, sino una combinación de varios polimorfismos. Por este motivo, la batería de reacciones que se utiliza en la tipificación molecular *ABO* detecta estratégicamente los polimorfismos clave para identificar un alelo *O*, un alelo *B* o un alelo *A2*, discriminándolo de la secuencia

consenso, que sería la correspondiente a un alelo *A1*.

Genotipificación de grupos sanguíneos en pacientes

Las técnicas de genotipificación de grupos sanguíneos también se aplican en el ámbito del diagnóstico inmunohematológico de pacientes. En este contexto, las técnicas moleculares se aplican principalmente con los siguientes objetivos:

- Tipificar a pacientes con anemia hemolítica autoinmune, especialmente para aquellos sistemas en los que no se dispone de reactivos monoclonales murinos o anticuerpos que aglutinen directamente.
- Distinguir aloanticuerpos de autoanticuerpos, principalmente aquellos con una especificidad relativa que enmascara un antígeno autólogo.
- Identificar las bases moleculares de resultados serológicos inusuales.
- Tipificar a pacientes transfundidos, ayudando a encaminar el estudio



Genotipo ABO: O1/O2

Figura 15. Determinación del genotipo ABO mediante PCR-SSP

serológico en función de las alo-especificidades que pueden hallarse en mezclas complejas de anticuerpos.

- Identificar fenotipos de alta o baja incidencia para los que no existen reactivos serológicos disponibles o son escasos y se pueden reservar para confirmar serológicamente el fenotipo.

Diagnóstico prenatal de incompatibilidades fetomaternas

Otro de los ámbitos de aplicación de las técnicas de tipificación molecular de grupos sanguíneos más relevante es sin duda el diagnóstico prenatal. La determinación prenatal del grupo sanguíneo fetal resulta especialmente útil para identificar aquellos fetos negativos para el antígeno contra el que la madre está sensibilizada, y evitar así una monitorización más agresiva.

Hoy en día, la determinación del genotipo fetal a partir de muestras de líquido amniótico o de vellosidades coriales es posible para la gran mayoría de especificidades de grupo sanguíneo asociadas a un riesgo de enfermedad hemolítica del feto o recién nacido.

El descubrimiento de la presencia de ADN fetal en el plasma de las gestantes²⁵ abrió la posibilidad de utilizar el plasma materno como fuente alternativa de ADN fetal. Este ADN de origen fetal presente en el plasma materno procede de la placenta y representa un pequeño porcentaje del ADN total circulante en el plasma. El componente mayoritario es, de hecho, de origen materno. No obstante, la concentración de ADN fetal aumenta progresivamente

durante la gestación y puede llegar a un 10% del total de ADN en plasma materno.²⁶

La determinación no invasiva del genotipo *RHD* fetal en gestantes D negativo sensibilizadas es precisamente una de las primeras aplicaciones que se pusieron a punto en diagnóstico prenatal a partir del plasma materno. Desde entonces, se han desarrollado y validado diversos protocolos para la genotipificación *RHD* fetal no invasiva, los cuales están actualmente en uso en muchos países.^{27,28} La metodología utilizada se basa en la técnica de PCR a tiempo real (ya comentada en este mismo capítulo) utilizando sondas específicas para el gen *RHD*. En la Figura 16 se puede ver un ejemplo de cómo se visualiza el gen *RHD* fetal amplificado a partir del ADN fetal libre en plasma materno.

Las diferentes estrategias utilizadas en la genotipificación *RHD* fetal están explicadas con detalle en el apartado Análisis del genotipo *RHD* fetal del Capítulo 5, *Sistema Rh*. Así mismo, en el Capítulo 25, *Contribución de las técnicas moleculares a la EHFRN*, se explica la utilidad y repercusiones de la implementación de esta prueba en el protocolo de seguimiento de las gestantes D negativo, tanto en sensibilizadas como en no sensibilizadas.

Determinación de la cigosidad RHD

La determinación del fenotipo Rh completo en individuos RhD positivo nos da una idea de la posibilidad de que sea homocigoto (D/D) o hemicigoto (D/d) para el gen *RHD*. Sin embargo, sólo las técnicas de tipificación molecular permiten determinar la cigosidad *RHD*.

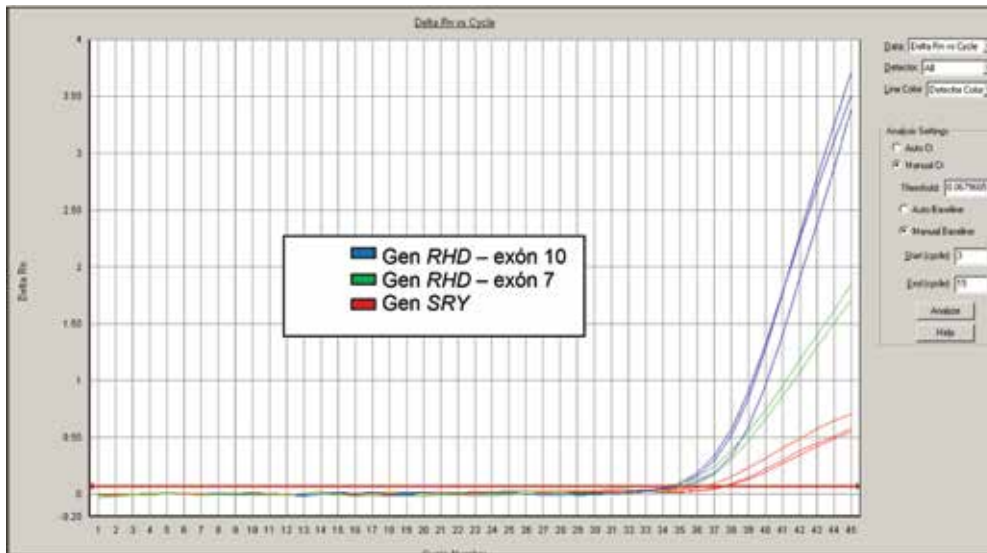


Figura 16. Detección del gen *RHD* fetal y del marcador *SRY* mediante PCR a tiempo real a partir del ADN de plasma correspondiente a una gestante RhD negativo

Esta información es muy útil para el consejo genético en el caso de parejas de gestantes sensibilizadas, tal como se explica en el Capítulo 25, *Contribución de las técnicas moleculares a la EHFRN*. Las estrategias metodológicas más utilizadas en la determinación de la cigosidad *RHD* también se explican con detalle en ese capítulo.

Referencias

1. Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A., Massarini, A. *Biología*. 7^o ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, 2008.
2. Lewin, B. *Genes IX*. 11^o ed. Madrid, España: Marbán, 2008.
3. Strachan, T., Read, A. *Genética Humana*. 3^o ed. México: McGraw-Hill, 2006.
4. Jorde, L., Carey, J., Bamshad, M., White, R. *Genética médica*. 3^o ed. Madrid, España: Elsevier, 2005.
5. Reid, M., Lomas-Francis, C., Olsson, M. *The Blood Group Antigen Factsbook*. 3rd ed. USA: Elsevier Academic Press, 2012.
6. Daniels, G. *Human Blood Groups*. 3rd ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell, 2013.
7. Mollison, P. L., Engelfriet, C. P., Contreras, M. *Blood transfusion in clinical medicine*. 10th ed. Oxford: Blackwell Science, 1997.
8. Araszkievicz, P., Szymanski, I. O. Quantitative studies on the Rh-antigen D. Effect of the C gene. *Transfusion* 1987; 27: 257-261.
9. Singleton, B. K., Burton, N. M., Green, C., Brady, R. L., Anstee, D. J. Mutations in *EKLF/KLF1* form the molecular basis of the rare blood group In(Lu) phenotype. *Blood* 2008; 112: 2081-2088.
10. Singleton, B. K., Roxby, D. J., Stirling, J. W., Spring, F. A., Wilson, C., Poole, J., Anstee, D. J. A novel *GATA1* mutation (Stop414Arg) in a family with the rare X-linked blood group Lu(a-b-) phenotype and mild macrothrombocytopenia. *Br J Haematol* 2013; 161: 139-142.
11. Huang, C. H., Cheng, G., Liu, Z., Chen, Y., Reid, M. E., Halverson, G., Okubo, Y. Molecular basis for Rh(null) syndrome: identification of three new missense mutations in the Rh50 glycoprotein gene. *Am J Hematol* 1999; 62: 25-32.
12. Redman, C. M., Reid, M. E. The McLeod syndrome: an example of the value of integrating clinical and molecular studies. *Transfusion* 2002; 42: 284-286.

13. Arnaud, L., Salachas, F., Lucien, N., Maisonnobe, T., Le Pennec, P. Y., Babinet, J., Cartron, J. P. Identification and characterization of a novel XK splice site mutation in a patient with McLeod syndrome. *Transfusion* 2009; 49: 479-484.
14. Singleton, B. K., Green, C. A., Avent, N. D., Martin, P. G., Smart, E., Daka, A., Narter-Olaga, E. G., Hawthorne, L. M., Daniels, G. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000; 95: 12-18.
15. Blunt, T., Daniels, G., Carritt, B. Serotype switching in a partially deleted RHD gene. *Vox Sang* 1994; 67: 397-401.
16. Diccionario Novartis de Genómica y Medicina Molecular. Barcelona: Rubes Editorial S.L; 2006.
17. Denomme, G. Molecular basis of blood group expression. *Transfusion and Apheresis Science* 2011; 44: 53-63.
18. Prager, M. Molecular genetic blood group typing by the use of PCR-SSP technique. *Transfusion* 2007; 47:54-59.
19. Rozman, P., Dovc, T., Gassner, C. Differentiation of autologous *ABO*, *RHD*, *RHCE*, *KEL*, *JK* and *FY* blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion* 2000; 40: 936-942.
20. Araujo, F. Real-time PCR assays for high-throughput blood group genotyping. *Methods Mol. Biol.* 2009; 496: 25-37.
21. Hashmi, G., Shariff, T., Seul, M. et al. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* 2005; 45: 680-688.
22. Avent, N. D., Martínez, A., Flegel, W. A. et al. The BloodGen project: towards mass-scale comprehensive genotyping of blood donors in the European Union and beyond. *Transfusion* 2007; 47: 40S-46S.
23. Reid, M. E. & Lomas-Francis, C. Molecular approaches to blood group identification. *Curr Opin Hematol* 2002, 9: 152-159.
24. Reid, M. E. and Denomme, G. A. DNA-based methods in the Immunohematology Reference Laboratory. *Transfus Apher Sci* 2011; 44: 65-72.
25. Lo, Y. M. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F. *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997; 350: 485-487.
26. Lo, Y. M., Tein, M. S. C., Lau, T. K. et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62: 768-75.
27. Van der Schoot, C. E. et al. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006; 13: 53-56.
28. Daniels, G., Finning, K., Martin, P. & Massey, E. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn* 2009; 29: 101-107.

Nomenclatura y clasificación de los grupos sanguíneos eritrocitarios. Grupos ABO, H, Lewis y antígenos relacionados

EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ*
NÚRIA NOGUÉS**
ROSA MONTERO***
CARMEN CANALS SURÍ****

- * *Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. emuniz@bst.cat*
- ** *Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. nnogues@bst.cat*
- *** *Diplomado en Enfermería. Coordinadora del Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. rmontero@bst*
- **** *Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. ccanals@bst.cat*

Definición

Los grupos sanguíneos son caracteres heredados, localizados en estructuras polimórficas de la membrana del eritrocito, y son reconocidos por anticuerpos específicos. Hablamos de *polimorfismo* cuando en una determinada población existen, como mínimo, dos variantes alélicas de un mismo gen. Los *alelos*, por tanto, no son más que versiones alternativas de un gen que difieren entre sí en su secuencia nucleotídica. Los cambios en la secuencia nucleotídica

original se producen como consecuencia de *mutaciones*. Estas diferencias estructurales de los alelos van a comportar también diferencias estructurales en los productos que codifican. Un gen constituido por múltiples alelos es un gen polimorfo o alelomorfo.

Nomenclatura

Actualmente se han definido treinta y tres sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios, y hasta un total de 297 antígenos¹⁻⁶ (Tablas 1 y 2). Próximamente serán treinta y cuatro los sistemas oficialmente aceptados, una vez

Tabla 1. Sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios

Nº	Nombre del sistema	Símbolo	Nombre del gen	Localización cromosómica
001	ABO	ABO	<i>ABO</i>	9q34.2
002	MNS	MNS	<i>GYP A, GYP B, GYP E</i>	4q31.21
003	P1PK	P1PK	<i>A4GALT</i>	22q11.2-qter
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	1p36.11
005	Lutheran	LU	<i>LU</i>	19q13.32
006	Kell	KEL	<i>KEL</i>	7q34
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	19p13.3
008	Duffy	FY	<i>DARC</i>	1q23.2
009	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	18q12.3
010	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	17q21.31
011	Yt	YT	<i>ACHE</i>	7q22.1
012	Xg	XG	<i>XG, MIC2</i>	Kp22.33
013	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	1p34.2
014	Dombrock	DO	<i>ART4</i>	12p12.3
015	Colton	CO	<i>AQP1</i>	7p14.3
016	Landsteiner-Weiner	LW	<i>ICAM4</i>	19p13.2
017	Chido/Rodgers	CH/RG	<i>C4A, C4B</i>	6p21.3
018	H	H	<i>FUT1</i>	19q13.33
019	XK	XK	<i>XK</i>	Xp21.1
020	Gerbich	GE	<i>GYP C</i>	2q14.3
021	Cromer	CROM	<i>CD55</i>	1q32.2
022	Knops	KN	<i>CR1</i>	1q32.2
023	Indian	IN	<i>CD44</i>	11p13
024	Ok	OK	<i>BSG</i>	19p13.3
025	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	11p15.5
026	John Milton Hagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	15q24.1
027	I	I	<i>GCNT2</i>	6p24.2
028	Globoside	GLOB	<i>B3GALT3</i>	3q26.1
029	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	9p13.3
030	Rh-associated glyco-protein	RHAG	<i>RHAG</i>	6
031	Forsman	FORS	<i>GBGT1</i>	9q34.13
032	Junior	JR	<i>ABCG2</i>	4q22
033	Langereis	LAN	<i>ABCB6</i>	2q36

Tabla 2. Relación de los antígenos eritrocitarios incluidos en los treinta y tres sistemas de grupos sanguíneos

Sistema	Número de antígeno																																		
	001	002	003	004	005	006	007	008	009	010	011	012	013	014	015	016	017	018	019	020	021	022	023	024	025	026	027	028	029	030					
001 ABO	A	B	A,B	A1	...	He	Mi ^a	M ^a	Vw	Mur	M ^a	Vr	M ^a	M ^a	St ^a	Ri ^a	Ci ^a	Ny ^a	Hut	Hil	M ^a	Fai	s ^d	Mit	Dantu	Hop	Nob	En ^a	En ^a KT	N ⁱ	*				
002 MNS	M	N	S	s	U	He	Mi ^a	M ^a	Vw	Mur	M ^a	Vr	M ^a	M ^a	St ^a	Ri ^a	Ci ^a	Ny ^a	Hut	Hil	M ^a	Fai	s ^d	Mit	Dantu	Hop	Nob	En ^a	En ^a KT	N ⁱ	*				
003 PIPK	P1	...	P ^a	NOR	...	He	Mi ^a	M ^a	Vw	Mur	M ^a	Vr	M ^a	M ^a	St ^a	Ri ^a	Ci ^a	Ny ^a	Hut	Hil	M ^a	Fai	s ^d	Mit	Dantu	Hop	Nob	En ^a	En ^a KT	N ⁱ	*				
004 RH	D	C	E	c	e	f	Ce	C ^w	C ^a	V	E ^w	G	Hg ₀	Hr	hr ^s	VS	C ^c	CE	D ^w	c-like	ce	hr ^a	Rh29	Go ^a	*				
005 LU	L ^a	L ^b	L ³	L ⁴	L ⁵	L ⁶	L ⁷	L ⁸	L ⁹	...	L ¹¹	L ¹²	L ¹³	L ¹⁴	...	L ¹⁶	L ¹⁷	K18	K19	Km	Kp ^a	K22	K23	K24	VLAN	TOU	RAZ	VONG	KALT	KTIM	*				
006 KEL	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Ku	J ^s	J ^b	Uj ^a	K11	K12	K13	K14	...	K16	K17	K18	K19	Km	Kp ^a	K22	K23	K24	VLAN	TOU	RAZ	VONG	KALT	KTIM	*				
007 LE	Le ^a	Le ^b	Le ^{ab}	Le ^{3a}	Le ^{3b}	Ble ^b	Fy6		
008 FY	Fy ^a	Fy ^b	Fy3	...	Fy5	Fy6	
009 JK	Jk ^a	Jk ^b	Jk3	...	Fy5	Fy6	
010 DI	Di ^a	Di ^b	W ^a	W ^b	Wd ^a	Rb ^a	WARR	ELO	WU	Bp ^a	Mo ^a	Hg ^a	Vg ^a	Sw ^a	BOW	NFLD	Jn ^a	KREP	Ti ^a	Fr ^a	SiW1	DISK		
011 YT	Yt ^a	Yt ^b	Wd ^a	Rb ^a	WARR	ELO	WU	Bp ^a	Mo ^a	Hg ^a	Vg ^a	Sw ^a	BOW	NFLD	Jn ^a	KREP	Ti ^a	Fr ^a	SiW1	DISK		
012 XG	Xg ^a	CD99	Wd ^a	Rb ^a	WARR	ELO	WU	Bp ^a	Mo ^a	Hg ^a	Vg ^a	Sw ^a	BOW	NFLD	Jn ^a	KREP	Ti ^a	Fr ^a	SiW1	DISK		
013 SC	Sc1	Sc2	Sc3	Rd	STAR	SCER	SCAN	
014 DO	Do ^a	Do ^b	Gy ^a	Hy	Jo ^a	DOYA	DOMR	DOLG	
015 CO	Co ^a	Co ^b	Co3	Co4	...	LW ^a	LW ^b	
016 LW	LW ^a	LW ^b	
017 CH/RG	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	WH	Rg1	Rg2		
018 H	H	
019 XK	Kx	
020 GE	...	Ge2	Ge3	Ge4	Wb	Ls ^a	An ^a	Dh ^a	GEIS	GEPL	GEAT	GETI	
021 CROM	Cr ^a	Tc ^b	Tc ^c	Tc ^d	Dp ^a	Es ^a	IFC	WES ^a	WES ^b	UMC	GUTI	SERF	ZENA	CROV	CRAM	CROZ	CRUE	CRAG		
022 KN	Kn ^a	Kn ^b	McC ^a	S11	Yk ^a	McC ^b	S12	S13	KCAMI	
023 IN	In ^a	In ^b	INFI	INJA	
024 OK	Ok ^a	OKGV	OKVM
025 RAPH	MER2	
026 JMH	JMH	JMHK	JMHHL	JMHG	JMHM	JMHQ	
027 I	I	
028 GLOB	P	
029 GIL	GIL	
030 RHAG	Dugdos	Oj ^a	DSLK	RHAG4	
031 FORS	FORS1	
032 JR	Jr ^a	
033 LAN	Lan

Sistema	Número de antígeno																																	
	031	032	033	034	035	036	037	038	039	040	041	042	043	044	045	046	047	048	049	050	051	052	053	054	055	056	057	058	059	060	061			
*002 MNS	Or	DANE	TSEN	MINY	MUT	SAT	ERIK	Os ^a	ENEP	ENEH	HAG	ENAV	MARS	ENDA	ENEV	MNTD
*004 RH	hr ^a	Rh32	Rh33	Rh35	Rh35	Be ^a	Evans	...	Rh39	Tar	Rh41	Rh42	Frawfort	Nou	Riv	Sec	Sec	JAL	STEM	FPTT	MAR	BARC	JAHK	DAK	LOCR	CENR	CEST	CELO	DEAG	PARG	CEVF	
*006 KEL	KYO	KUCI	KANT	KASH	KEP	KETI	KHUL	KYOR

que las bases moleculares del sistema VEL ya han sido dilucidadas. Cada sistema está integrado por un conjunto de antígenos que son producto de los alelos pertenecientes a un mismo locus genético (representado por un solo gen o por un *cluster* de dos o más genes estrechamente ligados), independientemente de los locus genéticos que codifican para los otros sistemas de grupo sanguíneo y, por tanto, transmitidos de forma independiente. La posibilidad de un entrecruzamiento entre estos genes es imposible o muy remota, dada su proximidad. Además, se han definido siete “colecciones” de antígenos relacionados entre sí por sus características genéticas, bioquímicas o serológicas (Tabla 3). La colección VEL pasará en breve a integrarse en el conjunto de

sistemas de grupos sanguíneos. Y, finalmente, dos series de antígenos, una de baja frecuencia (serie 700) y otra de alta frecuencia (serie 900) que hasta el momento no han podido adscribirse a ningún sistema o colección (Tablas 4 y 5). Para conseguir una nomenclatura unificada, la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea ha establecido que cada antígeno está representado por seis dígitos.⁶⁻⁸ Los tres primeros corresponden al sistema (001-033) (por ejemplo, 006 para Kell), a la colección (205-213), o a las series 700 o 900. Los otros tres números identifican el antígeno (por ejemplo, 006003 para Kp^a). Cada sistema tiene además un símbolo alfabético. Esta terminología ha resultado muy útil para unificar criterios y para el almacenamiento electrónico de la infor-

Tabla 3. Colecciones de grupos 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	*
208	Er	ER	208001	Er ^a	>99
			208002	Er ^b	<1
			208002	Er3	>99
209		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

Tabla 4. Antígenos de baja incidencia (serie 700)

Nº	Nombre	Símbolo
700002	Batty	By
700003	Christiansen	Chr ^a
700005	Biles	Bi
700006	Box	Bx ^a
700017	Torkildsen	To ^a
700018	Peters	Pt ^a
700019	Reid	Re ^a
700021	Jensen	Je ^a
700028	Livesay	Li ^a
700039	Milne	
700040	Rasmussen	RASM
700044		JFV
700045	Katagiri	Kg
700047	Jones	JONES
700049		HJK
700050		HOFM
700052		SARA
700054		REIT

mación; sin embargo, resulta compleja para la comunicación verbal, por lo que se sigue aceptando en este entorno el uso del nombre clásico de los antígenos. El grupo de trabajo actualiza la relación de sistemas, colecciones y series con una periodicidad bianual. En la Tabla 6 se muestra un ejemplo de las diferentes nomenclaturas en el caso del sistema Kell y de los antígenos de este sistema.

La importancia clínica de los grupos sanguíneos en hematología se debe a la posibilidad de que los aloanticuerpos (dirigidos contra antígenos no presentes en el individuo que los produce) pueden ocasionar la destrucción de los hematíes transfundidos, o atravesar la placenta e inducir una hemólisis en el feto y en el recién nacido. Esto va a depender de la frecuencia con la que cada aloanticuerpo se produce, de sus características funcionales (amplitud térmica, clase de

Tabla 5. Antígenos de alta incidencia (serie 901)

Nº	Nombre	Símbolo
901003	August	At ^a
901008		Emm
901009	Anton	AnWj
901011	Sid	Sd ^a
901014		PEL
901016		MAM

inmunoglobulina, capacidad de fijar el complemento), y de la frecuencia con que el aloantígeno está presente en la población. En relación con el antígeno también van a influir factores como la densidad antigénica y la presencia del mismo en forma soluble.

Conceptos básicos en la genética de grupos sanguíneos

En el Capítulo 3 dedicado a la *Genética aplicada a la Inmunohematología* se describen ampliamente los principios que rigen esta temática, por lo que a continuación se revisan exclusivamente algunos conceptos básicos que facilitarán al lector la comprensión de los siguientes apartados.

El término *genotipo* se refiere al conjunto de alelos heredados provenientes de un determinado gen (por ejemplo AA, AO), mientras que el *fenotipo* se refiere, exclusivamente, al producto reconocible de estos alelos. Los antígenos producidos por diferentes alelos de un determinado locus se denominan anti-téticos.

Todos los cromosomas están dispuestos en parejas –y por ello son di-

Tabla 6. Ejemplo de la terminología a emplear en el caso del sistema Kell

	Tradicional	ISBT
Antígeno	K	KEL 1 (006001)
Fenotipo	K+k+Kp(a-b+)	KEL: 1,2,-3,4
Alelo	K	KEL*01
Genotipo	KKpb/kKpb	KEL*01,04/02,04

ploides— en el núcleo celular. Cuando un par de alelos perteneciente al mismo gen de ambos cromosomas son idénticos decimos que el individuo es *homocigoto*. Por el contrario, cuando este par de alelos difiere decimos que el individuo es *heterocigoto*.

Un alelo puede ser *dominante* respecto a su pareja. Esto implica que sólo se expresará la versión de la proteína codificada por este alelo. El alelo suprimido se conoce como alelo *recesivo*. Sólo cuando el alelo recesivo esté presente en ambos cromosomas (el individuo será homocigoto para este alelo recesivo) será posible reconocer la correspondiente versión de la proteína. También puede suceder que ambos alelos sean *codominantes*. Esta es la situación que concierne a la mayoría de alelos que codifican para los diferentes productos polimórficos responsables de los grupos sanguíneos. Algunos genes tienen alelos que no codifican ningún producto: son los *alelos silentes*.

Los alelos de genes muy próximos se heredan conjuntamente y constituyen lo que conocemos por *haplotipo*.

Distribución de los antígenos eritrocitarios

Pueden expresarse exclusivamente en los hematíes (antígenos Rh), o en otras

células sanguíneas (el antígeno P1), en otros tejidos (antígenos MNS), o en las células sanguíneas y en los tejidos (antígenos ABO). La mayoría de los antígenos eritrocitarios son producto directo del gen que los codifica, y se ubican en proteínas, glicoproteínas y glicolípidos de la membrana eritrocitaria. Los antígenos de los sistemas ABO, Lewis y P constituyen una excepción, porque los genes correspondientes codifican para una enzima (transferasa) responsable de catalizar la reacción por la que un determinado monosacárido o azúcar se une a un sustrato (oligosacárido) para constituir una determinada estructura antigénica. Las proteínas que expresan antígenos eritrocitarios se insertan en la membrana a través de las siguientes opciones: como proteínas de un solo paso, como proteínas de múltiples pasos, o bien como proteínas ancladas a la membrana mediante enlaces glucosilfosfatidilinositol (GPI) (Figura 1). La distribución y la frecuencia de los diversos fenotipos eritrocitarios varían según las poblaciones y grupos étnicos (Tabla 7).

Sistema ABO

Descubierto por Landsteiner en 1900, continúa siendo el sistema más importante en la transfusión sanguínea y en trasplante, debido a la presencia siste-

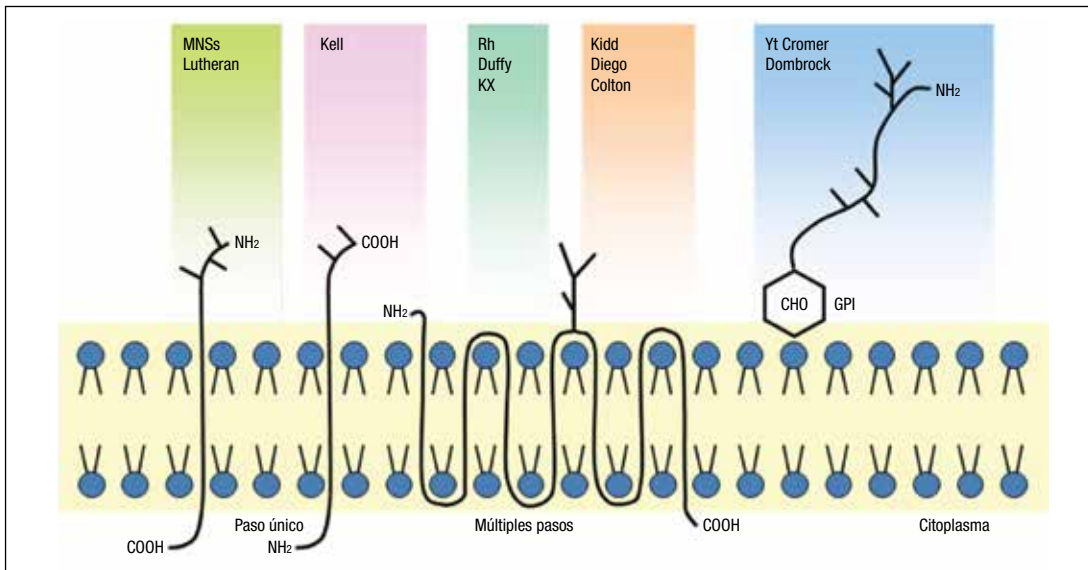


Figura 1. Representación esquemática de la membrana eritrocitaria y del modo de inserción de las proteínas donde se localizan los diferentes grupos sanguíneos eritrocitarios

Tabla 7. Principales sistemas de grupo sanguíneo, fenotipos y frecuencias en población caucásica y de raza negra

Sistema (símbolo ISBT)	Fenotipo	Frecuencia en población caucásica (%)	Frecuencia en raza negra (%)
ABO (ABO)	O	44	49
	A	42	26
	B	11	20
	AB	4	5
MNS (MNS)	S-s+	45	68
	S+s+	44	24
	S+s-	11	6
	S-s-	Raro	1.5
Rh (RH)	Dce	2	47
	DCcEe	13	4
	dce	15	6
	Dce	19	2
	Dcce	35	21
	DcE	2	0.2
	DcE	12	19
Kell (KEL)	K-k+	91	98
	K+k+	9	2
Duffy (FY)	Fy(a-b+)	34	22
	Fy(a+b+)	49	1
	Fy(a+b-)	17	9
	Fy(a-b-)	Raro	68
Kidd (JK)	Jk (a-b+)	23	9
	Jk (a+b+)	49	41
	Jk (a+b-)	27	50

mática de anticuerpos regulares reactivos a 37 °C, fijadores de complemento y dirigidos contra los antígenos de los que carece el portador de los anticuerpos. Estos anticuerpos pueden producir reacciones hemolíticas muy graves de tipo intravascular cuando se transfunden hematíes ABO incompatibles.

Genes y antígenos

Como ya ha sido comentado, a diferencia de otros sistemas de grupo sanguíneo en que los genes codifican directamente para los correspondientes antígenos, en este sistema los genes *A* y *B* codifican para unas enzimas que van a catalizar la reacción que permite la unión de determinados carbohidratos a precursores glicoproteicos o glico-

lipídicos para configurar la estructura antigénica propia de lo que conocemos como antígenos *A* y *B* (Figura 2).

Los antígenos *A* y *B* se encuentran ampliamente distribuidos en nuestro organismo y, además de los hematíes, podemos encontrarlos en linfocitos, en plaquetas (adsorbidos del plasma), en la mayoría de tejidos endoteliales y epiteliales, y en algunos órganos como los riñones. Por este motivo, en el trasplante de órganos sólidos ABO incompatibles puede producirse una grave reacción hiperaguda del injerto. Así mismo, en el caso del trasplante de progenitores hematopoyéticos con incompatibilidad ABO mayor (por ejemplo, receptor *O*, donante *A*), puede ocurrir una hemólisis aguda, a menos que

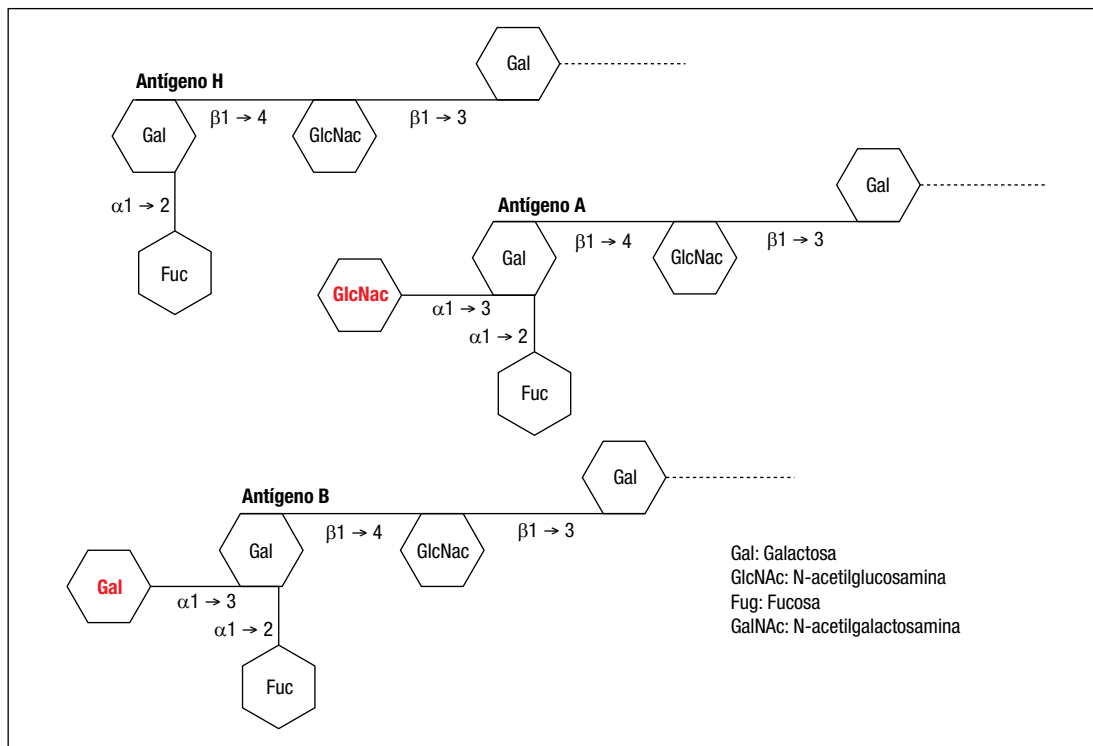


Figura 2. La adición de N-acetilgalactosamina a la cadena precursora H por acción de una transferasa A implica la aparición del antígeno A. La adición de galactosa por acción de la transferasa B implica la aparición del antígeno B

los hematíes incompatibles sean separados de las células progenitoras. Los antígenos ABH también se encuentran en forma soluble, y se localizan en las secreciones y en todos los fluidos con excepción del líquido cefalorraquídeo. En la membrana del hematíe están presentes como moléculas glicolípídicas o glicoproteicas, y en la forma soluble se hallan fundamentalmente como glicoproteínas. A las cinco o seis semanas de vida intrauterina ya pueden ser detectados, pero alcanzan su máxima expresión solo entre los 2 y los 4 años, por lo que pueden reaccionar débilmente en las muestras de cordón umbilical y durante los primeros años.

Existen cuatro posibles fenotipos ABO, y en la práctica cotidiana se dice que un individuo pertenece al grupo A, al B, al AB o al O. En los grupos A y B pueden diferenciarse diversos subgru-

pos, pero raras veces tienen significado clínico. En la Tabla 8 se muestra la relación de fenotipos y posibles genotipos en el sistema ABO, y en la Tabla 9, la distribución de los mismos en un grupo de 215 donantes de sangre españoles.⁵ Globalmente, en la raza caucásica los grupos O y A son los más frecuentes (45% y 40%, respectivamente), seguidos del grupo B (11%) y del grupo AB (4%). La frecuencia del grupo B en las razas negra y asiática es claramente superior (20% y 27%, respectivamente) a la de la raza blanca (11%).

El gen del antígeno A está constituido por 1.062 pb que codifican un total de 353 aminoácidos (AAs). La proteína resultante es una enzima (transferasa A) encargada de facilitar la unión del azúcar N-acetilgalactosamina a las cadenas activas H (Figura 2). El gen del antígeno B es idéntico en un 99% al gen A, y con-

Tabla 8. Relación de fenotipos y posibles genotipos en el sistema ABO

Fenotipo	Antígenos	Anticuerpos	Gen	Genotipos
O	Ninguno	Anti-A	O	O^1O^1
		Anti-A ₁		O^2O^2
		Anti-B		O^1O^2
		Anti-A ₁ B		
A ₁	A+A ₁	Anti-B	A ¹	A^1A^1
				A^1A^2
				A^1O^1
				A^1O^2
A ₂	A	Anti-B	A ²	A^2A^2
		Anti-A ₁ (a veces)		A^2O^1
				A^2O^2
B	B	Anti-A	B	BB
				BO^1
				BO^2
A ₁ B	A+A ₁ +B	Ninguno	A ¹ B	A ¹ B
A ₂ B	A+B	A menudo anti-A ₁	A ² B	A ² B

Tabla 9. Distribución de los fenotipos y posibles genotipos del sistema ABO en una serie de 212 donantes de sangre españoles

Fenotipo	n	Genotipos	n
A ₁	56	A ¹ A ¹	8
		A ¹ A ²	2
		A ¹ O ¹	42
		A ¹ O ²	4
A ₂	15	A ² A ²	3
		A ² O ¹	10
		A ² O ²	2
B	21	BB	1
		BO ¹	19
		BO ²	1
A ₁ B	4	A ¹ B	4
A ₂ B	2	A ² B	2
O	117	O ¹ O ¹	111
		O ² O ²	5
		O ¹ O ²	1

tiene cuatro nucleótidos distintos que comportan un cambio de aminoácido (AA) en los residuos 176, 235, 266 y 268. La proteína resultante es también una enzima (transferasa B) que añade galactosa a las cadenas H activas (Figura 2). El gen O es amorfo y codifica para una proteína funcionalmente inactiva de solo 116 AAs, como consecuencia de la delección de una base (G) cerca del extremo 5´terminal de la secuencia codificante, en la posición 261; este cambio comporta la aparición anticipada de un triplete de finalización que interrumpe el proceso de transcripción⁹⁻¹¹ (Figura 3).

Los subgrupos de A y B (Tablas 10 y 11) también se producen como consecuencia de mutaciones similares que comportan cambios en los AAs. Por ejemplo, A₂ se produce como consecuencia del cambio de leucina por

prolina en el residuo 156 de la proteína. Serológicamente, esto se traduce en la aparición de una transferasa n-acetilgalactosamina que posee un pH óptimo alterado, pero que todavía es capaz de generar la suficiente sustancia A para configurar el antígeno A. Los hematíes poseerán, en este caso, menos lugares antigénicos A que en los individuos de grupo A₁. Igualmente, otros cambios de AA son responsables de la producción de glucosiltransferasas alteradas que dan lugar a otros subgrupos de A y B, como A₃, A_x, y B₃.

El estudio molecular de los genes ABH ha permitido el descubrimiento de nuevos alelos, como O², en el que no existe el cambio de base presente en los alelos O “normales”. Este alelo es idéntico al alelo A¹, pero con dos AAs distintos: Arg--> Gli en el residuo 176 y Gli-->Arg en el residuo 268 de

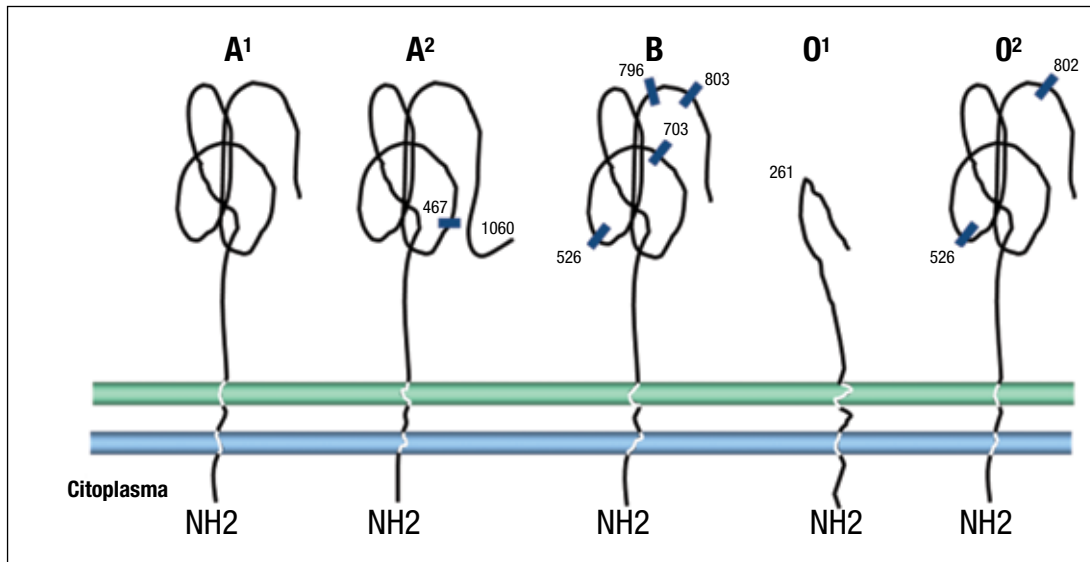


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de los productos de los alelos ABO

En la figura se indica la localización de las mutaciones responsables de las diferencias estructurales entre los alelos ABO. Cuatro mutaciones puntuales diferencian el alelo B de A^1 y dos solamente a A^2 de A^1 . El producto O^1 se debe a la delección de una base (G) en la posición 261 de la secuencia, produciendo la aparición de un triplete de finalización precoz (stop codon). La estructura del alelo O^2 es muy similar a la de los productos del gen B , pero entre ambos existen diferencias como resultado de dos mutaciones puntuales en el gen O^2 .

Tabla 10. Fenotipos débiles de A

Subgrupo de A	Reactividad* frente a:				Sustancias en saliva†	Suero Anti-A ¹	Frecuencia (%)
	Anti-A	Anti-A,B	Anti-A1	Anti-H			
A ₁	++++	++++	++++	0	A,H	No	ND
A ₂	++++	++++	0	++++	A,H	A veces	ND
A _{int}	++++	++++	++(+)	+++	A,H	No	ND
A ₃	++(+) ^{mf}	++(+) ^{mf}	0	++++	A,H	A veces	0.01
A _X	0/+	++(+)	0	++++	H	A menudo	0.03
A _{end}	+	+	0	++++	H	A veces	0.003
A _m	0/+	0/+	0	++++	A,H	No	0.0007
A _{finn}	+	+	0	++++	H	Sí	ND
A _{bantu}	++(+)	++(+)	0	++++	H	Sí	ND
A _{1ae}	0 [±]	0	+++ ^{**}	++++	H	Sí ^{***}	ND
A _y	0 [±]	0	0	++++	A,H	No	ND
A _{el}	0 [±]	0	0	++++	H	A veces	ND

Una reacción negativa se denota por 0. Las reacciones positivas se indican como desde + (aglutinación débil) a ++++ (aglutinación máxima).

^{**} *Dolichos biflorus* solamente; ^{***} Reactividad del suero contra A₁ y A₂ RBC.

† Sustancias de grupos sanguíneos ABO en la saliva y otros fluidos corporales del secretor.

± A pesar de la falta de aglutinación, anti-A puede ser adsorbido y eluido por células en este subgrupo.
mf: aglutinación en campo mixto ; ND: no determinada (muy infrecuente).

Tabla 11. Fenotipos débiles de B

	Tipaje en placa								Sustancias en saliva	Frecuencia
	Prueba globular (Beth-Vincent)				Prueba sérica (Simonin)					
	Anti-B	Anti-A	Anti-AB	Anti-H	A1	A2	B	B	H	
B ₃	±±	-	±±	+++	+++	++	-	+	+	Poco frecuente
B _x	(+)	-	(+)	+++	+++	++	(+)	(B _x)	++	Raro
B _m	-	-	-	+++	+++	++	-	+++	(+)	Raro
B _{el}	-	-	-	+++	+++	++	+0-	-	+++	Muy raro

± ± 0 ±: doble población; (+): aglutinación débil; (B_x): sustancia B detectada en la saliva de los individuos B_x por inhibición con sus propios eritrocitos.

Nota: Esta clasificación es aproximativa, sólo para definir de una manera práctica los fenotipos débiles de B, dado el gran polimorfismo de estos (mutaciones familiares)

la proteína, lo que resulta determinante para abolir la actividad biológica de la enzima resultante (Figura 3).

Relación entre los genes ABO, FUT1(H) y FUT2(Se) y la expresión de los antígenos ABO

La expresión de los antígenos ABO está controlada desde tres locus genéticos distintos: el gen *ABO*, localizado en el cromosoma 9; el gen *FUT1(H)* y el gen *FUT2(Se)*, ambos localizados en el cromosoma 19. Cada uno de estos genes codifica para diferentes enzimas (glucosiltransferasas) encargadas de la unión de monosacáridos específicos a cadenas precursoras de disacáridos.

Como ya se ha mencionado, los antígenos A y B se originan cuando las correspondientes transferasas producidas por los genes *A* y *B* facilitan

la unión de un nuevo monosacárido a su oligosacárido precursor, que no es otro que la estructura que corresponde al antígeno H (Figura 2). A su vez, el antígeno H se origina a partir de un disacárido previo cuando la enzima fucosiltransferasa producida por el gen *FUT1(H)* permite la unión de un nuevo monosacárido (fucosa) a un oligosacárido precursor (Figura 2). Este mismo oligosacárido precursor es el sustrato sobre el que se van a producir los antígenos de los sistemas Lewis, I y P. En la Tabla 12 se muestra la relación de glucosiltransferasas producidas por los genes que codifican para los antígenos pertenecientes a los sistemas ABO, H y Lewis, los azúcares incorporados y la especificidad serológica final.

Tabla 12. Glucosiltransferasas producidas por los genes que codifican para los antígenos pertenecientes a los sistemas ABO, H y Lewis, azúcares incorporados y especificidad serológica

Genes	Producto del gen por la enzima	Azúcar incorporado del oligosacárido	Estructura terminal	Especificidad serológica
H(Se)	α -L-fucosiltransferasa (1)	Fuc	Gal β (1-3)GlcNAc-R	LNT
			Gal β (1-3)GlcNAc-R	H
			1	
			2	
Le	α -L-fucosiltransferasa (2)	Fuc	Gal β (1-3)GlcNAc-R	Le ^a
			1	
			4	
			α -Fuc	
H(Se) y Le	α -L-fucosiltransferasa (1 y 2)	Fuc	Gal β (1-3)GlcNAc-R	Le ^b
			1	1
			2	4
			α -Fuc	α -Fuc
A	α -N-acetil- D-galactosaminil transferasa	GalNAc	α GalNAc(1-3)Gal β (1-3)GlcNAc-R	A
			1	
			2	
			α -Fuc	
B	α -D- galactosiltransferasa	Gal	α -Gal(1-3)Gal β (1-3)GlcNAc-R	B
			1	
			2	
			α -Fuc	

Abreviaturas: LNT = lacto-N-tetraosa; Gal = D-galactosa; GlcNAc = N-acetil-D-glucosamina; Fuc = fucosa; GalNAc = N-acetil-D-galactosamina; R = cadena restante de oligosacárido.

Fuente: Morgan y Watkins, 1969.

Los individuos portadores del raro fenotipo Bombay son homocigotos para el alelo *h* del gen *FUT1*, de manera que no pueden producir antígeno H y, en definitiva, tampoco producen antígenos A ni B. Sus hematíes suelen tipificarse como O, pero un meticuloso estudio de su suero muestra la presencia de anti-H, además de anti-A, anti-B y anti-A,B. En el resto de individuos, a partir del gen *H* aparecen los antígenos correspondientes A, B o AB en función de su estructura genómica ABO. No obstante, el antígeno H se conserva en una cierta proporción en los individuos de grupos A y B, y siempre en una pro-

porción mucho menor que la presente en los individuos de grupo O.

El gen *FUT2 (Se)* es responsable de la expresión del antígeno soluble H en las estructuras glicoproteicas de las secreciones, como sucede en el caso de la saliva. Los individuos de genotipo (*SeSe* o *Sese*) se denominan secretores, lo que ocurre en un 80% de la población, aproximadamente. El 20% restante de individuos (genotipo *sese*) son no secretores. El alelo *se* es amorfo.

En la Tabla 13 se muestran ejemplos de la interacción entre los genes *ABO*, *FUT1(H)* y *FUT2(Se)* y la expresión de los antígenos del sistema ABO en los hematíes y en la saliva.

Tabla 13. Relación entre los genes *ABO*, *FUT1(H)* y *FUT2(Se)* y la expresión de los antígenos del sistema ABO.

Ejemplo 1		
Genes Heredados	Antígenos Expresados	
	Hematíes	Saliva
AB HH SeSe	A,B,H	A,B,H
AB HH sese	A,B,H	Ninguno

Ejemplo 2		
Genes Heredados	Antígenos Expresados	
	Hematíes	Saliva
OO HH Sese	H	H
OO HH sese	H	Ninguno

Anticuerpos

Los anticuerpos ABO aparecen en los primeros meses de vida tras el contacto con diversas sustancias presentes en la dieta o en el medio ambiente (bacterias, plantas, polen) que presentan una estructura similar a los antígenos ABH. Aunque su aparición está relacionada con una exposición antigénica, su carácter precoz hace que se les considere como anticuerpos “naturales”. Habitualmente son una combinación de moléculas IgM e IgG y, a menudo, fijan complemento.¹²

Una nueva inmunización puede producirse como resultado de una transfusión de hematíes incompatible, de plasma que contiene antígenos solubles A o B incompatibles, de un embarazo de un feto ABO incompatible con la madre, o por inoculación de vacunas que contienen antígenos A o B. Esta reinmunización va a incrementar el contenido del componente IgG y su capacidad para reaccionar a 37 °C.

El título de anticuerpos ABO decrece en las personas de edad avanzada y pueden producirse discordancias entre los resultados de la prueba hemática y la prueba sérica que dificultan la correcta catalogación del grupo sanguíneo ABO. Una situación similar puede producirse con los pacientes afectados de diferentes patologías que cursan con inmunodepresión: leucosis linfática crónica, mieloma múltiple, hipogammaglobulinemia y agammaglobulinemia congénita o adquirida, pacientes en tratamiento inmunosupresor o trasplantados con progenitores hematopoyéticos.

El anti-A producido por los individuos de grupos O y B puede separarse con técnicas de adsorción y elución en dos componentes: anti-A y anti-A₁. Anti-A₁ es específico para el antígeno A₁ y no aglutina los hematíes A₂. Su temperatura óptima de reacción suele ser por debajo de los 37 °C, por lo que no es considerado clínicamente significativo. Sin embargo, puede ocasionar

discordancias hemático-séricas en la tipificación ABO. El anticuerpo anti- A_2 no existe, porque los individuos de fenotipo A_2 poseen el mismo antígeno A que las personas de fenotipo A_1 , aunque en menor proporción. Esto explica por qué los individuos de fenotipo A_1 no responden inmunológicamente tras la exposición a hematíes de fenotipo A_2 .

Sistema ABO y enfermedades

Los individuos de grupo A pueden, excepcionalmente, adquirir un grupo B y transformarse en un grupo AB, aunque la expresión de este nuevo antígeno es más débil, al igual que la del antígeno A que también se ve debilitada. En la mayoría de los casos se trata de pacientes con afecciones del aparato digestivo, mayoritariamente carcinoma de colon (cinco de los siete pacientes descritos en el artículo original presentaban esta patología). La explicación a este fenómeno reside en que ciertas enzimas bacterianas (enzima diacetilasa) tienen la capacidad de convertir N-acetilgalactosamina en α -galactosamina, que es similar a la galactosa, el azúcar inmunodominante del grupo B. El riesgo que conlleva esta situación es que el paciente sea incorrectamente transfundido con hematíes de grupo AB y que sufra una reacción hemolítica fatal por la intervención de un anti-B hiperinmune.

El debilitamiento del antígeno A es característico de los pacientes de grupo A con leucosis mieloide aguda. En algunos pacientes lo que se observa es una doble población de hematíes A y O. Los cambios en los antígenos B y H en los pacientes con leucosis no son

tan comunes. En algunas ocasiones la disminución en la expresión de estos antígenos precede al diagnóstico de la leucosis y actúa como indicador de un estado preleucémico.

La herencia de los antígenos ABH parece estar débilmente asociada a la predisposición a ciertas enfermedades:

- Carcinoma gástrico: los individuos de grupo A tienen un riesgo 1,2 veces superior al de los de grupo B u O. También es superior el riesgo para el carcinoma de colon.
- Úlcera péptica: los de grupo O tienen 1,4 veces mayor riesgo que los de los restantes grupos.
- Úlcera duodenal: los individuos no secretores tienen 1,5 veces mayor riesgo que los secretores.
- Los individuos de grupo B tienen mayor riesgo de sufrir infecciones por *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli*.

Muy poco se conoce de la función de los antígenos ABH presentes sobre los hematíes y otras células y tejidos de nuestro organismo. No obstante, sabemos que contribuyen con su presencia a lo que conocemos como glicocalix, la matriz extracelular compuesta de carbohidratos que protege a los hematíes de una posible lesión mecánica y del ataque de los diversos microorganismos.

Sistema H

El antígeno H es el único componente de este sistema, y a la vez el precursor de los antígenos A y B. La íntima relación existente entre los genes *ABO*, *FUT1(H)* y *FUT2(Se)* ya ha sido comentada anteriormente, y en la Tabla 13 se

muestran algunos ejemplos de la interacción entre estos genes y su influencia en la expresión de los antígenos del sistema ABO en los hematíes y en la saliva.

El anti-H producido por los individuos de fenotipo Bombay es muy potente y puede producir reacciones transfusionales hemolíticas inmediatas muy graves. Solamente los hematíes de otro individuo de fenotipo Bombay resultan compatibles. Los individuos secretores que carecen de antígeno H en sus hematíes presentan antígeno H soluble en las secreciones, motivo por el cual cuando se sensibilizan no producen anti-H, sino un anticuerpo similar de especificidad anti-IH que no acostumbra reaccionar a 37 °C, por lo que no es considerado clínicamente significativo. Esta misma especificidad anti-IH también puede detectarse en los individuos de grupo A, por ser los que poseen menor cantidad de antígeno H.

Sistema Lewis

Está constituido por los antígenos Le^a y Le^b. Como en el caso de los antígenos ABH, estos tampoco son productos alé-

licos. El gen *FUT3* produce una enzima fucosiltransferasa que cataliza la unión de fucosa a un disacárido precursor que puede coincidir con el mismo precursor del que también deriva el antígeno H (precursor tipo 1H), lo que da lugar al antígeno Le^a, o bien al precursor que representa el propio antígeno H (tipo 1H), y al antígeno Le^b (Figura 4). Existen cuatro posibles fenotipos^{1-6,12,13} (Tabla 14):

1. Le(a+b-). Sólo presente en los individuos ABH no secretores. El gen *FUT2* es inactivo, por lo que sólo existe precursor tipo 1H y sólo el antígeno Le^a acabará incorporándose a la membrana del hematíe.
2. Le(a-b+). Sólo en individuos ABH secretores. La mayor parte de la estructura correspondiente al precursor tipo 1H se convierte en el tipo 1H en las secreciones mediante la enzima fucosiltransferasa codificada por el gen *FUT2*, por lo que predominantemente detectaremos Le^b y muy poco Le^a, y sólo Le^b se detectará sobre los hematíes.
3. Le(a+b+). Sólo detectable en individuos ABH secretores con un gen

Tabla 14. Fenotipos y genotipos del sistema Lewis

Fenotipo	Genotipo		Frecuencias aproximadas (%)		
	Lewis (FUT3)	Secretor (FUT2)	Caucásicos	Afro-amer.	Chinos
Le(a+b-)	<i>Le/Le Le/le</i>	<i>se/se</i>	22	20	0
Le(a-b+)	<i>Le/Le Le/le</i>	<i>Se/Se Se/se</i>	72	55	62
Le(a+b+)	<i>Le/Le Le/le</i>	<i>Sew/Sew Sew/se</i>	0	0	27
Le(a-b-)	<i>le/le</i>	Ninguno	6	25	11

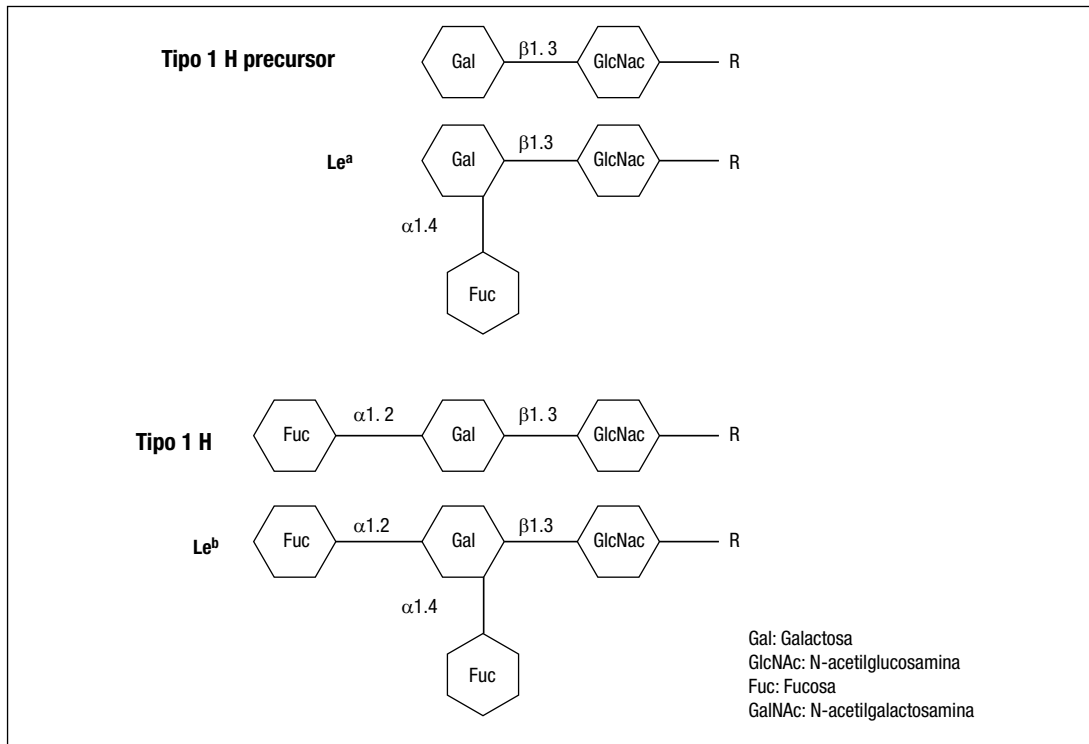


Figura 4. Representación del antígeno Le^a y su precursor Tipo 1H, y de Le^b y su precursor, Tipo 1H

FUT2 débil. La cantidad de precursor tipo 1H convertido a tipo 1H es menor que en el caso anterior, por lo que la presencia de ambos antígenos en las secreciones es abundante y pueden detectarse sobre los hematíes.

4. Le(a-b-). Independientemente del tipo ABH secretor, los hematíes Le(a-b-) carecen de antígenos Lewis debido a la homocigocidad de las mutaciones responsables de la inactivación del gen *FUT3* que comporta la no producción de transferasas.

Los anticuerpos anti-Lewis sólo son producidos por los individuos de fenotipo Le(a-b-), y no suelen ser clínicamente significativos porque rara vez reaccionan a 37 °C.

Referencias

1. Issitt, P. D., Anstee, D. J. Applied blood group serology. 4th ed. Durhan NC: Montgomery Scientific publications, 1998.
2. Reid, M., Lomas-Francis, C., Olsson, M. The Blood Group Antigen Facts Book. 3 ed. Facts Book Series. Elsevier. Academic Press, 2012.
3. Roback, J. D., Grossman, B. J., Harris, T., Hillyer, C. D. Technical Manual. 17th ed. AABB, 2011.
4. Daniels, G. Human Blood Groups. 2nd ed. Blackwell Science, 2002.
5. Muñiz-Díaz, E., Martín-Vega, C. Grupos sanguíneos e inmunohematología. En: Farreras P, Rozman C. Medicina Interna. 16 ed. Elsevier, 2009: 1819-1827.
6. ISBT Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Working Party. <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>

7. Daniels, G., Fletcher, A., Garratty, G., Henry, S., Jorgensen, J., Judd, W. J. et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang*, 2004;87:304-316.
8. Storry, J. R., Castilho, L., Daniel, G., Flegel, W. A., Garratty, G., Francis, C. L. et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and Blood group terminology: Berlin report. *Vox Sang*, 2011; 101: 77-82.
9. Chester, A. M., Olsson, M. L. The ABO Blood group gene: a locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev*, 2001; 15: 177-200.
10. Yamamoto, E. Review: ABO Blood group system-ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. *Immunohematology*, 2004; 20: 3-22.
11. Storry, J. R., Olsson, M. L. The ABO blood group system: a review and update. *Immunohematology* 2009;25(2):48-59.
12. Klein, H., Anstee, D. J. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 11th ed. Oxford: Blackwell Science, 2005.
13. Combs, M. R. Lewis blood group system review. *Immunohematology*, 2009; 25(3)112-118.

Sistema Rh

EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ*
CARLOS COTORRUELO**
NÚRIA NOGUÉS***

Introducción

El sistema Rh es el sistema de grupo sanguíneo más importante en medicina transfusional después del sistema ABO. Se trata de un sistema muy complejo y extraordinariamente polimórfico que actualmente incluye un total de 52 antígenos (Tabla 1). La complejidad de este sistema también se evidencia en su estructura genómica, en la que hasta el momento se han definido más de 200 alelos con importancia clínica.¹⁻⁴

El descubrimiento del sistema Rh o, más exactamente, la autoría del mismo resultó controvertida durante algunos años a raíz de la confusión generada entre éste y el que hoy en día conocemos como sistema Landsteiner-Wiener (LW).

* *Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. emuniz@bst.cat*

** *Profesor asociado. Área Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Investigador adjunto. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina. ccotorru@fbioyf.unr.edu.ar*

*** *Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. mnogues@bst.cat*

Tabla 1. Relación de antígenos Rh

Designación numérica	Antígeno o Símbolo(s)	Prevalencia	Designación numérica	Antígeno o Símbolo(s)	Prevalencia
Rh1	D	Caucásicos: 85% Negros: 92%	Rh32 ^{&}		Negros: 1% R ^N
Rh2	C	Caucásicos: 68% Negros: 27%	Rh33	R ₀ ^{Har} , D ^{HAR}	0.01% Alemanes
Rh3	E	Caucásicos: 29% Negros: 22%	Rh34 ^{&&}	Hr ^B	Alta
Rh4	C	Caucásicos: 80% Negros: 96%	Rh35		Baja
Rh5	e	98%	Rh36	Be ^a	Baja
Rh6	ce o f	Caucásicos: 65% Negros: 92%	Rh37	Evans	Baja (numerosos híbridos D/CE o CE/D)
Rh7	Ce o rh	Caucásicos: 68% Negros: 27%	Rh39	C-like	Alta
Rh8	C ^w	Caucásicos: 2%	Rh40	Tar	Baja (DVII)
Rh9	C ^x	1,8% en finlandeses	Rh41	Ce-like	Blancos: 70%
Rh10	V	Negros: 30%	Rh42	Ce ^S , Cc ^S	Negros: 2%
Rh11	E ^w	Baja	Rh43	Crawford	Negros: 0,1%
Rh12 [*]	G	Caucásicos: 84% Negros: 92%	Rh44	Nou	Alta
Rh17 ^{**}	Hr ₀	Alta	Rh45	Riv	Baja
Rh18 ^{***}	Hr, Hr ^S	Alta	Rh46	Sec	Alta
Rh19 ^{****}	Hr ^S	98%	Rh47	Dav	Alta
Rh20	VS	Negros: 32%	Rh48	JAL	Baja
Rh21	C ^G	Caucásicos: 68%	Rh49 ^{&&&}	STEM	Negros: 6%
Rh22	CE	<1% (DCE, CE)	Rh50	FPTT	Baja (DFR, R ₀ ^{Har})
Rh23 ⁺	D ^w	Baja (DVa)	Rh51	MAR	Alta
Rh26	c-like	Alta (la mayoría c+)	Rh52 ⁺	BARC	Baja (DVI)
Rh27	cE	Caucásicos: 28% Negros: 22% (DcE, cE)	Rh53	JAHK	Baja
Rh28	hr ^H	Baja	Rh54 ⁺	DAK	Baja (DIII ^a , DOL, R ^N)
Rh29 ⁺⁺	Rh total	100%	Rh55	LOCR	Baja
Rh30 ⁺	Go ^a	Baja (DIVa)	Rh56	CENR	Baja (híbrido CE/D)
Rh31 ^{****}	hr ^B	98%	Rh57	CEST	Alta
			Rh58	CELO	Alta
			Rh59	CEAG	Alta
			Rh60	PARG	
			Rh61	CEVF	

Nota: Los antígenos Rh13, Rh16, Rh24, Rh25 y Rh38 están obsoletos.

*Presente en los hematíes que expresan C o D.

**Anticuerpo producido por los individuos con delección de D y fenotipos D⁻, Dc⁻, y DC^{w-}.

***Anticuerpo producido por individuos con fenotipo e y/o D alterados prevalentes en grupos étnicos de África.

****Ausente de los hematíes de fenotipo DcE/DcE (R2R2), o hematíes con variante e detectada en grupos étnicos de África.

+Antígeno de baja incidencia asociada a la variante D parcial indicada.

++Anticuerpo producido por los individuos con fenotipo Rh_{null}

&Antígeno de baja frecuencia expresado por los hematíes RN o la variante DBT.

&&Anticuerpo producido por los individuos con fenotipos C, E y/o D alteradas prevalente en grupos étnicos de África.

&&&Asociado con el 65% de los hematíes hr^S-Hr- y 30% de hr^B-Hr^B-

En 1939, Levine y Stetson investigaron la reacción hemolítica sufrida por una mujer que había sido transfundida con sangre de su esposo y que, previamente, había dado a luz a un feto muerto.^{5,6} El anticuerpo encontrado en la madre era capaz de aglutinar los hematíes del esposo, y aproximadamente el 80% de los hematíes ABO compatibles escogidos al azar. Demostraron, además, que este nuevo antígeno era independiente de los grupos sanguíneos conocidos en aquel momento (ABO, MN y P), y también sugirieron que la madre habría resultado inmunizada durante su embarazo y que el anticuerpo resultante sería responsable de la reacción frente a los hematíes del esposo, así como del cuadro clínico desarrollado por su hijo, el que hoy conocemos como enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN).

En 1940, Landsteiner y Wiener, al inyectar eritrocitos del mono *Macacus rhesus* a conejos y cobayas, aislaron un anticuerpo que también era capaz de aglutinar al 85% de los hematíes humanos.⁷ Los individuos cuyos eritrocitos eran aglutinados por el suero antirhesus se catalogaron como Rh positivo, y el 15% restante, como Rh negativo. En ese momento los autores creyeron que este era el mismo anticuerpo descrito en el caso de Levine.⁸ El motivo de la confusión es que anti-LW reacciona tanto con los hematíes D positivo como D negativo, pero preferentemente con los primeros. Al diluir el suero para eliminar la reactividad anti-especie, la única reacción que persistía era con los hematíes D positivo creando la falsa impresión de que esta era la especificidad del anticuerpo.

Hasta 1961 no quedó completamente aclarada la confusión entre el anticuerpo de origen humano y el anticuerpo antirhesus de origen animal. Sin embargo, en aquel momento ya se había extendido tanto el término Rh en la práctica transfusional que resultaba imposible modificarlo. Levine sugirió entonces dar el nombre de anti-LW al anticuerpo antirhesus de conejo, en honor a sus descubridores. Hoy en día se sabe que se trata de dos sistemas genéticamente independientes, cuyos antígenos son reconocidos por anticuerpos diferentes.⁹

El término “Rh positivo” y “Rh negativo” sigue definiendo la presencia o ausencia del antígeno D en un individuo. A mediados de los años cuarenta, cuatro antígenos más fueron identificados, dos pares de antígenos antitéticos (C/c y E/e) estrechamente relacionados entre sí y a la vez con el antígeno D. Fisher los designó con estas letras para seguir el orden del abecedario que se había comenzado a emplear para designar a los antígenos del sistema ABO. En conjunto, estos cinco antígenos (D,C,c,E,e) constituyen el grupo de antígenos Rh principales y son responsables de la mayoría de anticuerpos clínicamente significativos que identificamos en la práctica clínica cotidiana. La relación existente entre cada par de antígenos antitéticos, incluyendo el supuesto par D/d, llevó a Fisher a postular la idea de que estos antígenos se transmitirían en forma de tres pares de alelos D/d, C/c y E/e ligados entre sí en forma de haplotipo, y que las diversas combinaciones posibles entre los mismos darían lugar a los diferentes fenotipos.

A finales de los años ochenta se consiguió el aislamiento a gran escala de las proteínas Rh por cromatografía seguido de la secuencia de la región N-terminal. Este hecho permitió la clonación del gen *RHCE*, en 1990, en Francia;¹⁰ y dos años después, la clonación del gen *RHD*.¹¹ La definición de los diferentes alelos responsables de los antígenos C o c y E o e se completó en 1994.¹² Los últimos casi veinte años han sido testigos de una larga serie de hallazgos en torno a la diversidad genética del locus *RH* traducidos en la descripción de un número creciente de alelos que todavía hoy no ha finalizado. Los estudios en diferentes poblaciones han puesto de manifiesto las distintas prevalencias de estos alelos con las consiguientes implicaciones clínicas, tanto en la práctica clínica transfusional, como en el control inmunohematológico de las gestantes. La *Rhesus-Base website* (<http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/>) mantiene un registro de los alelos *RH* y el dbRBC o *Blood Group Antigen Gene Mutation Database* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/home>) se encarga del registro de todos los alelos, incluidos los alelos *RH*. Por su parte, el *Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology* de la Sociedad Internacional de Transfusión (ISBT, en el acrónimo inglés) se ocupa de la catalogación de nuevos alelos (<http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics>).

Nomenclatura

A lo largo de la historia se han venido empleando diferentes nomenclaturas

para definir los genotipos y fenotipos de este sistema en función de la concepción de estructura genómica y patrón de herencia aceptada en cada momento.^{1,2}

- La **nomenclatura de Fisher-Race** denomina a los antígenos por separado, y los haplotipos resultantes se expresan por la conjunción de tres letras. Es la nomenclatura D C c E e. Esta terminología deriva de la idea de la existencia de tres genes Rh.
- En la **nomenclatura de Wiener (Rh-Hr)**, apoyándose en la existencia de un solo gen, se asigna un nombre a cada haplotipo, empleando la letra R mayúscula para los haplotipos D positivo y la r minúscula para los D negativo. La letra se acompaña de un número (0, 1, 2) o de un carácter (', ') para definir la presencia o ausencia de los otros cuatro antígenos mayores. Por ejemplo, en presencia de D se asigna el 1 para Ce (R₁), el 2 para cE (R₂), el 0 para ce (R₀), y la letra Z para CE (Rz). En ausencia de D, se asigna la letra r para ce, r' para Ce, r'' para cE y r^y para CE.
- La **nomenclatura de Rosenfield** no tiene en cuenta la estructura genética y trata de construir un sistema práctico que facilite la clasificación de los antígenos siguiendo una numeración correlativa de acuerdo con el orden de la fecha del descubrimiento de cada antígeno, o la de su inclusión en el sistema Rh. Cada antígeno se expresa por un número determinado (1, 2, 3, etc.), y su ausencia, por el mismo número, pero precedido del signo - (-1, -2, -3, etc.).

Actualmente continúa siendo habitual el uso de la nomenclatura de Fisher en la escritura ordinaria, y la nomenclatura de Wiener en el lenguaje oral por la facilidad que supone definir con un solo término el conjunto de antígenos incluido en cada haplotipo. No obstante, el tiempo ha demostrado que ninguna de las concepciones de estructura genómica imaginadas para el locus *RH* era correcta. Sólo Tipett, en 1986, propuso un modelo que, aunque no totalmente correcto, sí se aproximaba mucho a lo que hoy en día conocemos.¹³ Según Tipett, existirían dos loci estrechamente ligados, *D* y *CcEe*, con dos alelos en el primer locus: *D* y *no D*, y cuatro alelos en el segundo locus, *CcEe*, que incluyen *ce*, *Ce*, *cE* y *CE*. Si exceptuamos el desacuerdo con respecto a la existencia de un antígeno no D (o d), el resto del modelo coincide con el que posteriormente fue demostrado, como se verá en el apartado siguiente.

De acuerdo con **la nomenclatura de la ISBT**, el sistema Rh tiene asignado el número 004, y cada antígeno tiene asignados tres dígitos más. Por ejemplo, a D le corresponde 001, a C 002, a E 003, a c 004, a e 005, y así sucesivamente. Por otra parte, la terminología empleada para referirse por escrito a los antígenos, genes y proteínas Rh está sujeta a unas reglas. Los antígenos se expresan empleando sus correspondientes letras (D, C, c, E, e), los genes *RH* se expresan empleando mayúsculas, generalmente en cursiva (*RHD* y *RHCE*), y finalmente, las proteínas se expresan como RhD, o Rhce, RhCe, RhcE y RhCE, según los antígenos que se expresan en ellas.¹⁴

En la Tabla 2 se muestra la prevalencia de los principales haplotipos Rh.

Locus *RH* y proteínas Rh

El locus *RH* está constituido por dos genes homólogos, *RHD* y *RHCE*, de 10

Tabla 2. Prevalencia de los principales haplotipos Rh

Haplotipo	Haplotipo modificado	Prevalencia (%)		
		Raza blanca	Raza negra	Raza asiática
Rh Positivo				
DCe	R ₁	42	17	70
DcE	R ₂	14	11	21
Dce	R ₀	4	44	3
DCE	R _Z	<0,01	<0,01	1
Rh Negativo				
Ce	r	37	26	3
Ce	r'	2	2	2
cE	r''	1	<0,01	<0,01
CE	r ^y	<0,01	<0,01	<0,01

exones cada uno, con una extensión cercana a 60 kb de ADN genómico. 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", que tienen un papel primordial en la formación del haplotipo *RHD* negativo en la raza caucásica (Figura 1). La delección del gen *RHD* responsable del fenotipo D negativo se produjo, probablemente, por el entrecruzamiento desigual de las cajas Rhesus de dos haplotipos *RH* mal alineados en "trans", lo que dio lugar a una caja Rhesus híbrida¹⁻⁴ (Figura 2). Los individuos de fenotipo D positivo pueden ser

homocigotos para el gen *RHD*, o bien, hemicigotos (una sola copia del gen). Algunos individuos de fenotipo D negativo, mayoritariamente de poblaciones no caucásicas, conservan secuencias propias del gen *RHD* en el locus *RH*, lo que suele comportar discordancias entre fenotipo y genotipo. El ejemplo más común es el de la variante alélica *RHD*Ψ, o pseudogen *RHD*, que está presente hasta en un 66% de los individuos D negativo de raza negra.¹⁵

En cuanto al gen *RHCE*, existen cuatro formas alélicas de este gen: *RHce*, *RHcE*, *RHCE* y *RHCE*. Los alelos que codifican para el antígeno C se diferencian en seis nucleótidos (cuatro aminoácidos) de los alelos que codifican para el antígeno c, aunque parece ser que es la posición aminoacídica 103

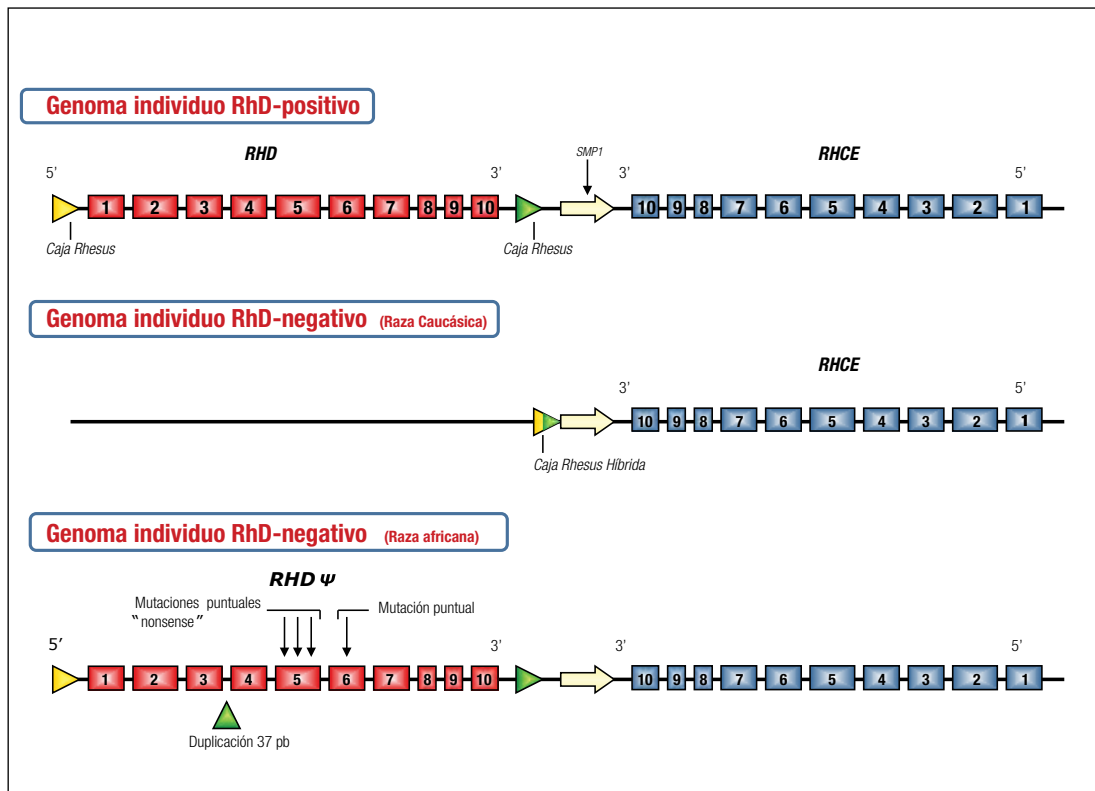


Figura 1. Organización genómica del locus RH humano

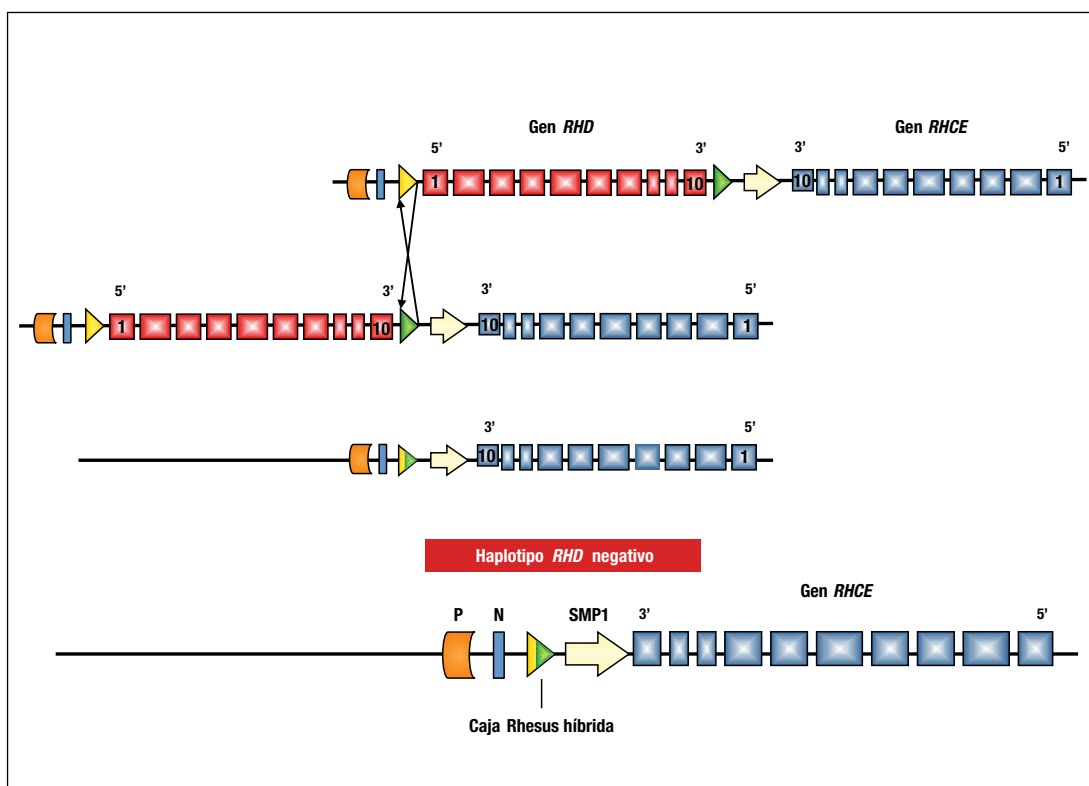


Figura 2. Recombinación genética en "trans"

la que determina la especificidad. Los alelos *RHE* y *RHe*, en cambio, se diferencian en un único nucleótido que comporta un cambio de aminoácido (AA) en la posición 226.¹²

Las proteínas resultantes, RhD y RhCE, son proteínas transmembrana no glicosiladas de múltiples pasos, compuestas, cada una de ellas, por 417 AAs que difieren entre sí en un total de 32 a 35 AAs. A lo largo de las proteínas se distinguen seis bucles extracelulares, doce segmentos transmembrana y siete segmentos intracelulares. Cada uno de los exones del gen codifica para un segmento de la proteína, de manera que los diez exones dan lugar a una proteína completa (Figura 3). Las proteínas Rh

forman complejo en la membrana con la glicoproteína RhAG (Rh-associated glycoprotein), la cual en 2008 fue considerada como un sistema independiente del sistema Rh, asignándosele el número 30 como sistema.¹⁶

Tras el descubrimiento de la base molecular del locus *RH* se han ido sucediendo en cascada numerosos hallazgos relacionados con las bases moleculares de los diferentes fenotipos Rh(D), incluidos los fenotipos D parcial y D débil. Precisamente, las similitudes moleculares subyacentes en ambos fenotipos han propiciado el cambio hacia una visión unitaria de los mismos y a su inclusión dentro de lo que actualmente conocemos como variantes *RHD*.¹⁷

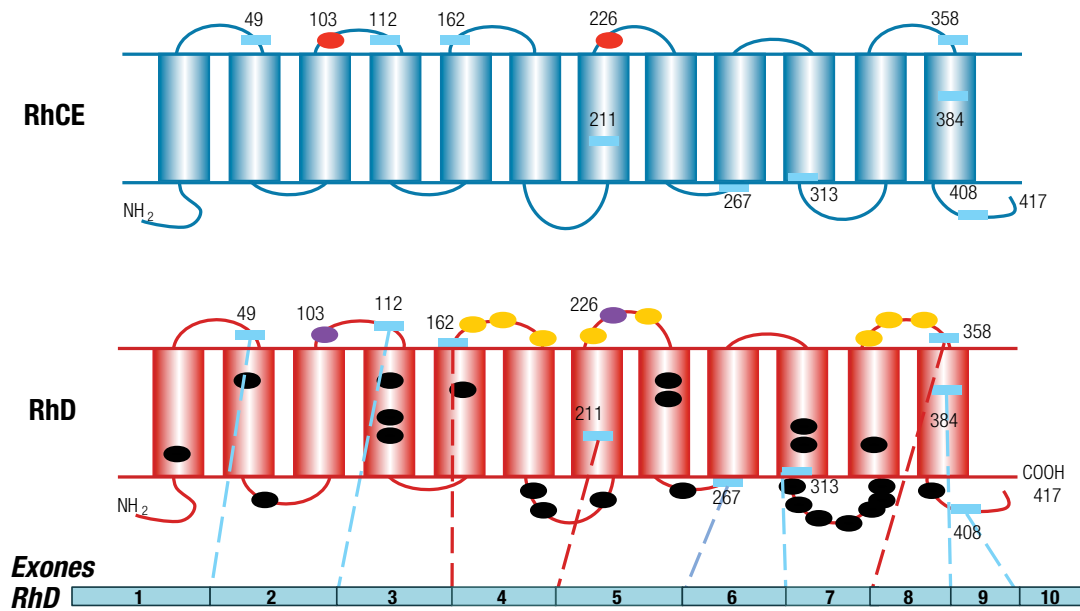


Figura 3. Proteínas RhD y RhCE. Cada uno de los exones codifica para un fragmento de la proteína, y los diez exones conforman una proteína completa.

Antígenos y fenotipos Rh

Antígenos D, C, c, E y e

El antígeno D es con diferencia el más inmunogénico seguido de c y E. Al referirnos al grupo Rh, en realidad nos remitimos al antígeno D, generalmente el único antígeno considerado en el tipaje de rutina. No obstante, en los últimos años los países más desarrollados han comenzado a incluir el tipaje de los antígenos Rh principales (D, C, c, E, e) con el objetivo de respetar la compatibilidad entre donantes y receptores en un grupo cada vez más numeroso de pacientes. Los resultados del tipaje de estos cinco antígenos se muestra en la Tabla 3, junto al fenotipo y a los genotipos más probables predecibles. Algunos fenotipos son más comunes en determinados grupos étnicos. Por ejemplo, una persona de origen europeo portadora de los antígenos D, C, c, e puede

tener como genotipo más probable R_1r (DcE/cE), mientras que una persona de origen africano con el mismo fenotipo probablemente será portadora de un genotipo R_1R_0 (DcE/DcE). Esta diferencia indica que la predicción del genotipo RH en una persona de etnia mixta puede resultar muy incierta. El tipaje serológico tampoco permite distinguir entre un individuo homocigoto (D/D) de uno hemocigoto (D/-), para lo cual se requiere un estudio molecular.¹⁻⁴

El haplotipo Rh ejerce una influencia sobre la expresión del antígeno D. La expresión de D es menor en presencia de C; además, los hematíes de un individuo R_2R_2 (DcE/DcE) poseen más lugares antígenicos D y muestran una titulación y un *score* más elevado que los hematíes de un individuo R_1R_1 (DcE/DcE). En un análisis de la expresión antigénica realizado por citometría de flujo, la expresión decrecería en

Tabla 3. Resultados del tipaje de los cinco antígenos Rh mayores, fenotipo y genotipo predecible

Anti-D	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e	Fenotipo de los Antígenos	Genotipo Previsto	Genotipo Alternativo
Rh Positivo*							
+	+	0	+	+	D,C,c,e	$R^1 r$ DcE/cE	$R^1 R^0$ DcE/DcE $R^0 r'$ DcE/DcE
+	+	0	0	+	D,C,e	$R^1 R^1$ DcE/DcE	$R^1 r'$ DcE/Ce
+	+	+	+	+	D,C,c,E,e	$R^1 R^2$ DcE/DcE	$R^1 r''$ DcE/Ce $R^2 r'$ DcE/Ce $R^2 r$ DcE/cE $R^0 R^2$ DcE/DcE
+	0	0	+	+	D,c,e	$R^0 r$ DcE/DcE	$R^0 R^0$ DcE/DcE
+	0	+	+	+	D,c,E,e	$R^2 r$ DcE/cE	$R^2 R^0$ DcE/DcE $R^0 r''$ DcE/cE
+	0	+	+	0	D,c,E	$R^2 R^2$ DcE/DcE	$R^2 r''$ DcE/cE
+	+	+	0	+	D,C,E,e	$R^1 R^2$ DcE/DcE	$R^2 r'$ DcE/Ce
+	+	+	+	0	D,C,c,E	$R^2 R^2$ DcE/DcE	$R^2 r''$ DcE/cE
+	+	+	0	0	D,C,E	$R^2 R^2$ DcE/DcE	$R^2 R^y$ DcE/Ce
Rh Negativo †							
0	0	0	+	+	c,e	rr ce/cE	
0	+	0	+	+	C,c,e	$r'r$ Ce/cE	
0	0	+	+	+	c,E,e	$r''r$ cE/cE	
0	+	+	+	+	C,c,E,e	$r'r''$ Ce/cE	

* No se muestran los genotipos raros (<0,01%) $R^0 r^y$, $R^1 r^y$, $R^2 r^y$ † No se muestran los genotipos raros (<0,01%) rr^y , $r'r^y$, $r''r^y$, $r^y r^y$

el siguiente orden: R_2R_2 (DcE/DcE) > R_1R_2 (DcE/DcE) > R_1R_1 (DcE/DcE) > R_2r (DcE/cE) > R_1r (DcE/cE).

El antígeno D está compuesto por numerosos epítomos (epD) que fueron originalmente definidos con anticuerpos producidos por individuos D positivo que habían desarrollado anti-D.

Posteriormente, con la ayuda de anticuerpos monoclonales (Ac Mo) se definieron hasta treinta o más epítomos designados de epD1 a epD9 con algunas subdivisiones (por ejemplo epD6.1 etc).^{18,19} Los epítomos D son muy conformacionales y representan algo más que una simple secuencia lineal de AAs.

Muchos epítomos implican a secuencias localizadas en los bucles extracelulares, pero determinados cambios de AAs de las regiones intracelulares también pueden alterar la expresión de los epítomos D.

La mayoría de los fenotipos D positivo tienen una proteína RhD convencional. No obstante, se han descrito numerosos alelos que codifican para proteínas que muestran diferentes cambios de AAs. Estas proteínas presentan diferentes niveles de expresión del antígeno D, y son propias, entre otros, de los fenotipos D débil, D parcial y DEL.¹⁷ En la práctica transfusional rutinaria, a menudo se detectan hematíes que muestran una expresión de D inferior a la esperada o anómala que corresponden a hematíes portadores de estos fenotipos.

El fenotipo D negativo en individuos de raza caucásica muestra una prevalencia aproximada del 15%, en negros africanos del 3%-5%, y en asiáticos y amerindios es muy raro (<0,1%). La delección completa del gen *RHD* es la base molecular más frecuente responsable del fenotipo D negativo en individuos caucásicos, aunque también se han descrito alelos nulos (también llamados alelos silentes) que originan un fenotipo D negativo. Y de estos alelos nulos han sido descritos dos tipos distintos:

1. Algunos poseen mutaciones “inactivadoras” que producen un codón de finalización (*stop codon*) prematuro y originan proteínas RhD truncadas que no se expresan en la membrana eritrocitaria. Por ejemplo, el alelo *RHD* ψ , característico de la etnia africana, presenta una duplicación

de 37pb a comienzos del exón 4 (además de varias mutaciones puntuales) que provoca un corrimiento en el marco de lectura y la aparición de un codón de finalización en el exón 6. Por otro lado, el alelo *RHD(361del11)*, encontrado en caucásicos, posee una delección de once nucleótidos en el exón 3 que altera el marco de lectura originando también un codón de finalización prematuro.

2. Otros alelos nulos se caracterizan por ser estructuras híbridas *RHD-RHCE* que codifican proteínas quiméricas que, pese a integrarse en la membrana del glóbulo rojo, no expresan epítomos D. Por ejemplo, el alelo *RHD-CE-D^s*, característico de población africana, posee un segmento *RHCE* específico en la región comprendida entre los exones 3 y 7 de un alelo *RHD*. Si bien esta proteína quimérica no expresa epítomos D, se caracteriza por una expresión débil y parcial del antígeno C. En la población caucásica, el alelo *RHD-CE(3-9)-D* es la estructura híbrida más frecuente entre los alelos nulos.^{15, 20-22}

La delección del gen *RHD* regularmente se encuentra formando parte de un haplotipo junto con el alelo *RHCE*ce*, por ello, aproximadamente el 90% de los individuos D negativo (homocigotos para la delección del gen *RHD*) presentan sólo los antígenos c y e (genotipo *dce/dce*). Por su parte, el alelo *RHD* ψ también presenta desequilibrio de ligamiento con el alelo *RHCE*ce*, mientras que *RHD-CE-D^s* forma un haplotipo con una variante alélica de *RHCE* denominada *RHCE*ceAR* y *RHD-CE (3-9)-D*

con *RHCE*Ce*. A excepción del alelo *RHD ψ* , los alelos silentes se encuentran generalmente en fenotipos D negativo que expresan los antígenos C o E (es decir, en fenotipos *r'r* o *r''r*).

Antígenos compuestos: *ce* (RH6), *Ce* (RH7), *cE* (RH27), *CE* (RH22) y *G* (RH12)

El antígeno ***ce* (RH6)** o antígeno ***f*** se expresa cuando los antígenos *c* (RH4) y *e* (RH5) están sobre una misma proteína (*Rhce*), por ejemplo en *R₁r* (*DCE/ce*), *R₀R₀* (*Dce/Dce*). El antígeno no se expresa cuando *c* y *e* están sobre proteínas separadas, como por ejemplo, *R₁R₂* (*DCE/DcE*). El antígeno ***f*** también puede estar presente en algunos individuos portadores de un haplotipo *Dc-*. Anti-*f* suele detectarse acompañando a anti-*c* o a anti-*e*, y puede ser producido por individuos portadores de antígenos *c* y *e* parciales.²³

El antígeno ***Ce* (RH7)** se expresa en los hematíes en que *C* (RH2) y *e* (RH5) están sobre la misma proteína (*RhCe*), por ejemplo, *DCE/ce* (*R₁r*), pero no en *DCE/ce* (*R₂r*). Anti-*Ce* a menudo se detecta acompañando a anti-*C*.

El antígeno ***cE* (RH27)** es muy poco común, de manera que solo se han reportado algunos ejemplos en los cuales el correspondiente anticuerpo reacciona con hematíes en los que *c* (RH4) y *E* (RH3) estaban sobre la misma proteína (*RhcE*), por ejemplo, *R₂r* (*DcE/ce*) y *r''r* (*cE/ce*). El antígeno no se expresa cuando *c* y *E* están en haplotipos separados (en *trans*) como en el caso de *R₂r* (*DCE/ce*).

El antígeno ***CE* (RH22)** ha sido reconocido hasta el momento por dos ejemplos de anti-*CE* aparentemente naturales, y formando parte de una mezcla con anti-*C*. Se expresa en hematíes en los que *C* y *E* están sobre la misma proteína (*RhCE*), por ejemplo, *DCE* (*R₂*) y *CE* (*r^y*) (Tabla 4).

Anti-G reacciona con los hematíes que expresan *D* o *C*, es decir, *D+C+*, *D+C-* y *D-C+*. El AA primario que define al antígeno *C* es serina103 en la proteína *RhCcEe*. La proteína *RhD* también presenta una serina en la misma posición. Por esta razón, el anti-*G* reconoce la presencia de serina 103, ya sea en el contexto de la proteína *D* o de la proteína *CcEe*, en contraste con anti-*C* que es más conformacional y sólo reconoce la presencia de serina 103 en el contexto de una proteína *CcEe*.

Tabla 4. Antígenos Rh compuestos en las proteínas Rh

Antígeno compuesto	Proteína Rh	Presente en los hematíes con haplotipos
<i>ce</i> o <i>f</i>	<i>Rhce</i>	<i>Dce</i> (<i>R₀</i>) o <i>ce</i> (<i>r</i>)
<i>Ce</i> o <i>rh₁</i> , <i>Rh7</i>	<i>RhCe</i>	<i>Dce</i> (<i>R₁</i>) o <i>Ce</i> (<i>r'</i>)
<i>cE</i> o <i>Rh27</i>	<i>RhcE</i>	<i>DcE</i> (<i>R₂</i>) o <i>cE</i> (<i>r''</i>)
<i>CE</i> o <i>Rh22</i>	<i>RhCE</i>	<i>DCE</i> (<i>Rz</i>) o <i>CE</i> (<i>r^y</i>)

Anti-G se detecta a menudo en sueros que contienen anti-D más anti-C, y puede ser motivo de confusión en las investigaciones de anticuerpos irregulares que se realizan en las gestantes dentro del protocolo de prevención de la EHRN.²⁴

C^w (RH8), C^x (RH9)

C^w (RH8) es un antígeno de relativa baja frecuencia en todas las poblaciones, aunque su incidencia es variable. En España, la frecuencia estimada es de un 1,9%, muy similar a la de otras poblaciones estudiadas en Europa. La mayoría de individuos C^w positivo son C positivo, aunque se han descrito algunos ejemplos de individuos C^w positivo y C negativo. Existe una asociación entre los antígenos C^w (RH8) y MAR (RH51).

C^x (RH9) es un antígeno raro, con una incidencia de 0,1% y 0,3% en población caucásica. Los individuos C^x positivo son C positivo, excepto en el raro haplotipo C^x ce^s V- VS + detectado en Somalia. Existe una asociación entre los antígenos C^x (RH9) y MAR (RH51).

VS (RH20), V (RH10)

El antígeno VS (RH20) tiene una frecuencia de 30%-40% en la población africana de raza negra, pero es muy raro en otros grupos étnicos. Los hematíes VS+ son habitualmente V+, aunque hasta un 20% de ellos carece del antígeno V. El haplotipo del gen alterado que con frecuencia se asocia con un fenotipo VS+ V- no contiene *RHD*, pero posee un gen híbrido *RHD-CE-D* que no produce D pero sí un C anormal.

Hr₀ (RH17)

Es un antígeno de alta frecuencia presente en todas las poblaciones. Parece estar compuesto de diferentes epítomos, algunos de los cuales pueden estar ausentes en haplotipos Rh poco comunes, incluidos aquellos con expresión C o c y/o e parcial. Las personas portadoras de fenotipos que tienen alterados los antígenos C o c y/o e pueden producir un aloanticuerpo que reconoce a todas las proteínas RhCE, y que se comporta como anti-Rh17. Estos anticuerpos, después de un meticuloso estudio, suelen mostrar una especificidad más precisa.

Go^a (RH30)

El antígeno Go^a (RH30) es un antígeno de baja frecuencia presente en aproximadamente un 2% de los individuos de raza negra. Se asocia con el D parcial categoría DIVa.

Rh32

El antígeno Rh32, antes R^N, se expresa en el alelo híbrido *RHCE*ceRN* en el que el exón 4 del gen *RHCE* ha sido reemplazado por el correspondiente exón del gen *RHD*. Este alelo conlleva una expresión más débil de C (RH2) y e (RH5), y puede estar asociado a una expresión aumentada del antígeno D (RH1).

El fenotipo D parcial tipo DBT que resulta de un alelo híbrido en el que los exones 5 al 7 o 5 al 9 del gen *RHD* han sido reemplazados por los correspondientes al gen *RHCE*, también expresan el antígeno Rh32.

Crawford (RH43)

El antígeno Crawford es un antígeno de baja frecuencia presente en el 0,1% de

individuos de raza negra. Está codificado por un alelo RHCE (*RHCE*ceCF*) que además codifica algunos AAs específicos de D. Estos AAs específicos de D pueden ser reconocidos por Ac Mo potentes de especificidad anti-D, y los individuos D negativo Crawford positivo pueden tiparse erróneamente como D positivo.

Sec (RH46)

El antígeno Sec (RH46) se encuentra en todos los hematíes con fenotipo Rh común y, por el contrario, está ausente en los fenotipos: R^N, D⁻, D^{..}, Dc⁻, y DCw⁻.

MAR (RH51)

El antígeno **MAR (RH51)** es un antígeno de alta incidencia. La prevalencia de individuos MAR negativo en finlandeses es del 0,2%. Los hematíes MAR negativo pueden expresar C^w y C^x. Su localización está comprendida entre los residuos 36-41 de la proteína RhCe. Existe una asociación entre los antígenos C^w, C^x y MAR.

Fenotipo D variante: D débil, D parcial, DEL

En la tipificación de rutina no resulta extraño encontrar glóbulos rojos con una expresión disminuida del antígeno D. Estas variaciones fenotípicas pueden ser cuantitativas (fenotipo D débil) y/o cualitativas (fenotipo D parcial). La dicotomía D débil / D parcial tiene, en realidad, límites confusos y depende principalmente de la sensibilidad y avidéz de los reactivos utilizados para intentar establecer diferencias entre ambas variantes. Debido a la dificultad que presenta la discriminación seroló-

gica de estos fenotipos, se les agrupa bajo la denominación “variantes D” o fenotipo “D variante”, permitiendo así una visión unitaria de los mismos.

Se estima que entre el 1% y el 2% de los individuos caucásicos son portadores de alelos *RHD* que codifican un fenotipo D variante. Esta incidencia es más alta en poblaciones africanas. La caracterización molecular de los alelos responsables de fenotipos D variante permite clasificarlos en alelos D débil y alelos D parcial. Sin embargo, esta asignación molecular no es suficiente, en general, para establecer una conducta transfusional u obstétrica. Más bien, la conducta a seguir debe basarse en las evidencias clínicas disponibles para cada alelo en particular.²⁵ Se ha demostrado que los pacientes portadores de ciertas variantes D no son susceptibles de desarrollar una aloinmunización frente al antígeno D, por lo que pueden ser considerados D positivo (ver más adelante).

D débil

Los glóbulos rojos portadores de un fenotipo D débil poseen un menor número de sitios antigénicos que los eritrocitos D positivo. Históricamente se clasificaba como D débil a aquellos glóbulos rojos en los que la expresión del antígeno D era detectada por la prueba indirecta de la antiglobulina. Actualmente, esta clasificación depende, en cierto modo, de la avidéz de los Ac Mo que se utilizan para la asignación del fenotipo D. En general, los glóbulos rojos con fenotipo D débil presentan una reacción de aglutinación débil o negativa con anticuerpos anti-D monoclonales en medio salino que se potencia en

fase antiglobulina utilizando reactivos anti-D de clase IgG.

Los alelos D débil poseen mutaciones puntuales en diferentes exones que originan sustituciones de AAs en los dominios intracelulares o transmembranales de la proteína RhD. Estos cambios de AAs modificarían la estructura secundaria y terciaria del polipéptido RhD, alterarían su integración a la membrana eritrocitaria o afectarían su interacción con la glicoproteína RhAG, provocando una disminución en la expresión de los epítomos D.²⁶ La identificación molecular de los distintos alelos D débil permite clasificar a los mismos en diferentes “tipos” según la mutación responsable de la expresión disminuida del antígeno D. Se han descrito más de ochenta alelos distintos, y entre todos ellos las variantes D débil tipo 1, 2, 3 y 4 representan los fenotipos más frecuentes en poblaciones caucásicas,

superando el 95% de todos los D débil. Algunos alelos D débil se dividen a su vez en varios subtipos. Por ejemplo, D débil tipo 4.0, D débil tipo 4.0.1, D débil tipo 4.1, D débil tipo 4.2.0, D débil tipo 4.2.1, D débil tipo 4.2.2, D débil tipo 4.2.3 y D débil tipo 4.3. En la raza negra africana, el D débil tipo 4.2.0, también conocido como DAR, se detecta con una frecuencia muy superior a la encontrada en la raza caucásica europea. En la Tabla 5 se indican algunos alelos D débil y en la Figura 4 las correspondientes sustituciones de AAs.

Generalmente, los alelos D débil tipo 1 y 3 se encuentran en un haplotipo R₁ y están asociados a la expresión del antígeno C, mientras que el alelo D débil tipo 2 forma parte de un haplotipo R₂ y está asociado a la expresión de E. Por otro lado, el alelo D débil tipo 4 se encuentra en un haplotipo R₀, es

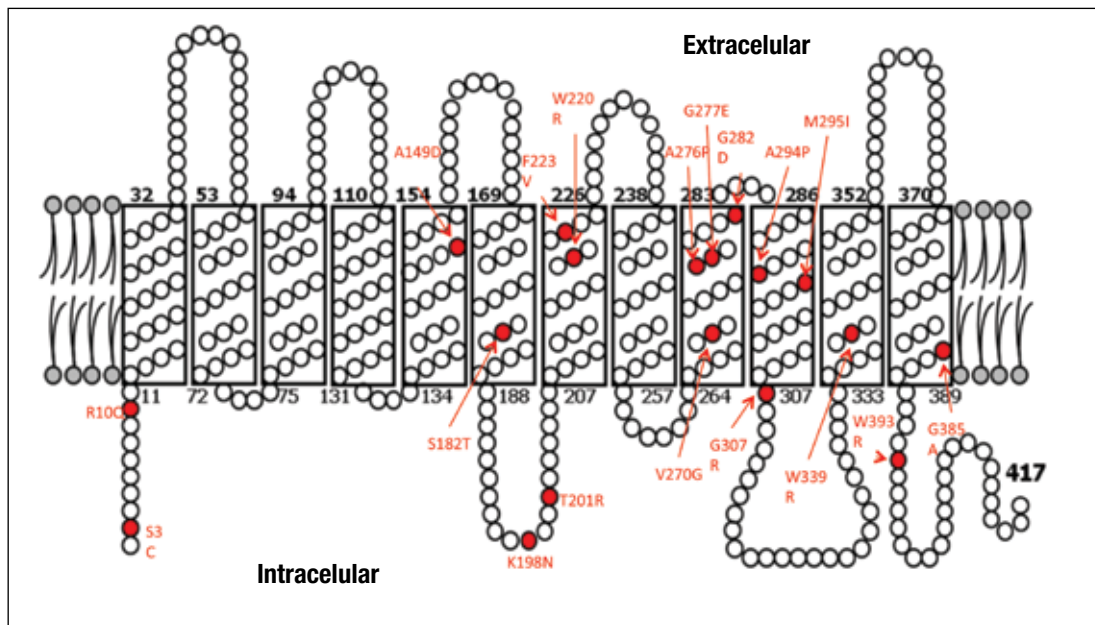


Figura 4. Localización de los AAs sustituidos en algunas de las variantes *RHD* que determinan un fenotipo D débil.

Tabla 5: Alelos D débiles

Alelo	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico
D débil tipo 1	809T>G	V270G
D débil tipo 2	1154G>C	G385A
D débil tipo 3	8C>G	S3C
D débil tipo 4.0	602C>G 667T>G 819G>A	T201R F223V ---
D débil tipo 4.0.1	602C>G 667T>G	T201R F223V
D débil tipo 4.1	48G>C 602C>G 667T>G 819G>A	W16C T201R F223V ---
D débil tipo 4.2.0 (DAR)	602C>G 667T>G 1025T>C	T201R F223V I342T
D débil tipo 4.2.1	602C>G 667T>G 957 G>A 1025T>C	T201R F223V --- I342T
D débil tipo 4.2.2	602C>G 667T>G 744C>T 957 G>A 1025T>C	T201R F223V --- --- I342T
D débil tipo 4.2.3	602C>G 667T>G 744C>T 1025T>C	T201R F223V --- I342T
D débil tipo 4.3	602C>G 667T>G 819G>A 872C>G	T201R F223V --- P291R
D débil tipo 5	446C>A	A149D
D débil tipo 6	29G>A	R10Q
D débil tipo 7	1016G>A	G339E
D débil tipo 8	919G>A	G307R
D débil tipo 9	880G>C	A294P
D débil tipo 10	1177T>C	W393R
D débil tipo 11	885G>T	M295I
D débil tipo 12	830G>A	G277E
D débil tipo 13	826G>C	A276P
D débil tipo 14	544T>A 594A>T 602C>G	S182T K198N T201R
D débil tipo 15	845G>A	G282D
D débil tipo 16	658T>C	W220R

decir, asociado a un fenotipo C-c+E-e+. Algunos alelos D débil tipo 1 han sido detectados en haplotipos R₀.

Un fenotipo D débil puede producirse también en presencia de un alelo *RHD* normal, es decir, sin ninguna mutación en su secuencia nucleotídica. En estos casos, la disminución de la expresión del antígeno D es debida a un efecto de posición causado por el haplotipo dCe (r') en *trans* (ver *Efecto de posición* en el Capítulo 3). La observación más

frecuente de este efecto de posición sobre el gen *RHD* ocurre en individuos portadores del genotipo R₀r', aunque eventualmente también se ha descrito en R₂r' y R₁r'.

D parcial

Los glóbulos rojos con fenotipo D parcial se caracterizan por la ausencia de uno o más epítomos del antígeno D. Los individuos con este fenotipo son capaces de producir aloanticuerpos anti-D

contra los epítomos ausentes tras una inmunización con hematíes D positivo.

Los fenotipos D parcial fueron inicialmente clasificados en categorías en función de la presencia o ausencia de nueve epítomos en la proteína RhD. Así, se caracterizaron los fenotipos D parcial categoría DII hasta DVII con subdivisiones en algunos de ellos basadas en diferencias serológicas muy sutiles. Posteriormente surgieron nuevos fenotipos D parcial que han sido denominados con diferentes siglas como DBT, DFR, DMH, DHAR, etc.

El fenotipo D parcial puede reaccionar de forma débil con los anticuerpos anti-D (por ejemplo, el fenotipo DVI aparece en la tipificación de rutina como una variante D), pero también puede mostrar una reactividad equivalente a la de un fenotipo D normal (por ejemplo, el fenotipo DIII) e incluso puede observarse una sobreexpresión del antígeno D o “D de expresión aumentada” (por ejemplo, el fenotipo DIVa).

Los alelos D parcial son generados principalmente por intercambios de segmentos de ADN entre los genes

RHD y *RHCE* (ver *Mutaciones* en el Capítulo 3). Este fenómeno de conversión génica origina alelos híbridos *RHD-CE-D* o *RHCE-D-CE* que producen proteínas quiméricas en las cuales no solo se pierden algunos epítomos D, sino también se pueden expresar antígenos de baja incidencia o perder la expresión de antígenos de alta prevalencia. En la Tabla 6 se muestran algunos ejemplos de alelos D parciales y la asociación con antígenos de baja frecuencia. Los alelos D parcial también pueden ser producto de otros eventos moleculares como sustituciones en múltiples posiciones nucleotídicas que no involucran grandes segmentos de ADN y mutaciones con cambio de sentido (*missense*). En la Figura 5 se representan las bases moleculares de algunos alelos D parcial.²⁶

El fenotipo DVI es el más frecuente de todas las variantes D parcial reportadas con una incidencia que varía entre 1:2000 y 1:5000 en poblaciones europeas. Los glóbulos rojos DVI carecen de la mayoría de los epítomos D, entre ellos el epD6/7, el cual se caracteriza por ser altamente inmunogénico. El fenotipo

Tabla 6. Alelos D parciales

Alelo	Antígeno de baja frecuencia
<i>DIII</i>	DAK (RH54)
<i>DIVa</i>	Goa (RH30)
<i>DIVb</i>	Evans (RH37)
<i>DV</i>	Dw (RH23)
<i>DVI</i>	BARC (RH52)
<i>DVII</i>	Tar (RH40)
<i>DBT</i>	RH32
<i>DFR</i>	FPTT (RH50)
<i>DHAR</i>	RH33, FPTT

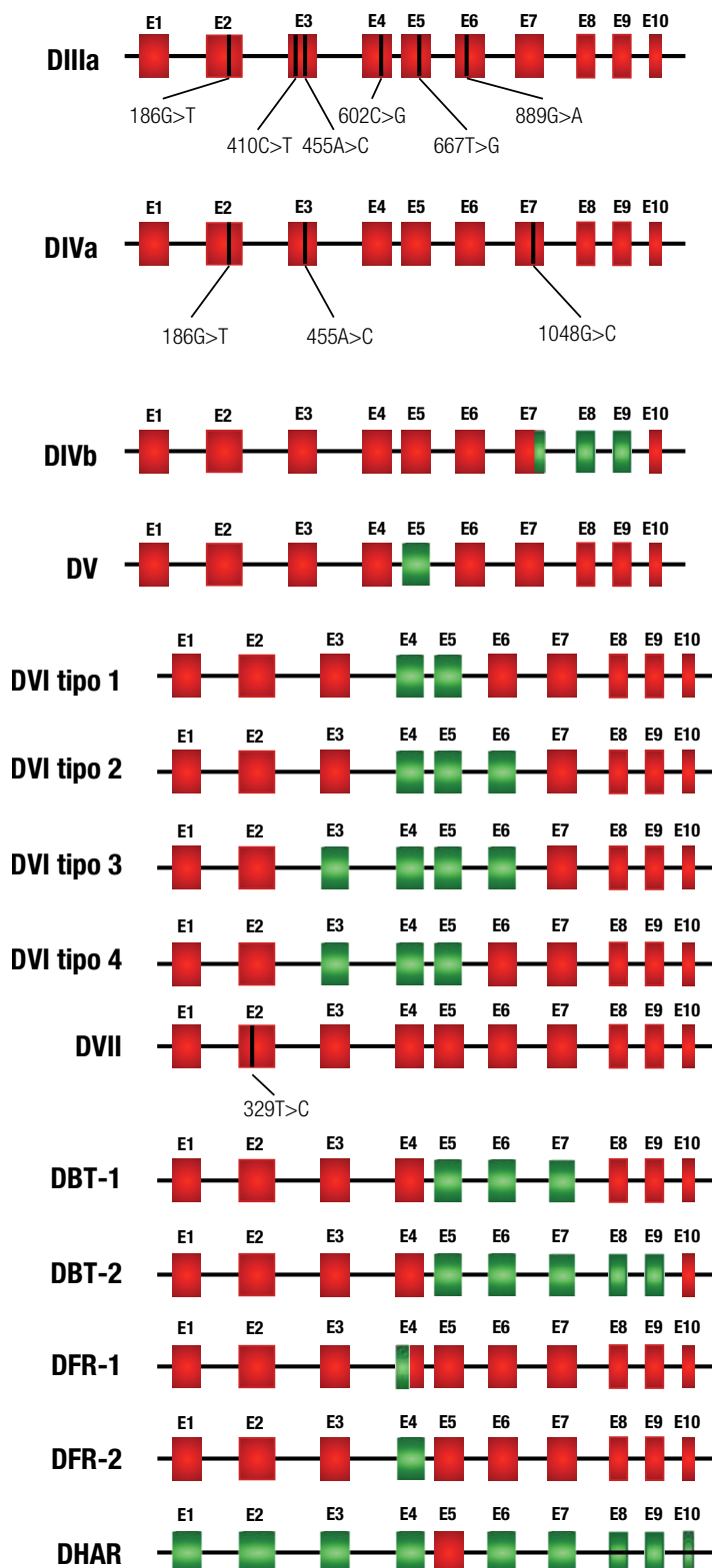


Figura 5. Bases moleculares de diferentes variantes *RHD* que determinan un fenotipo D parcial. Los antígenos de baja frecuencia asociados a estas variantes se indican en la Tabla 5. En color rojo se representan las secuencias *RHD* específicas, mientras que en verde se indican las secuencias *RHCE* específicas. Las líneas negras verticales indican mutaciones puntuales.

DVI presenta gran importancia clínica, ya que los individuos portadores de esta variante se inmunizan fácilmente tras el contacto con hematíes D positivo. Los aloanticuerpos producidos por individuos DVI están implicados en reacciones hemolíticas transfusionales y pueden provocar una EHRN grave e incluso muerte neonatal. La identificación de este fenotipo en receptores es importante porque deben recibir sangre D negativo para evitar la formación de aloanticuerpos anti-D. Por esta misma razón, las mujeres embarazadas con fenotipo DVI deben recibir la profilaxis con gammaglobulina anti-D.

DEL

Los individuos portadores de un fenotipo DEL expresan una cantidad mínima de antígeno D en la membrana del hematíe que no es suficiente para ser detectada mediante los métodos serológicos convencionales utilizados en la tipificación de rutina. Solo una pequeña cantidad de anti-D puede ser recuperada de hematíes DEL utilizando pruebas especializadas de adsorción-elución. Debido a la dificultad para identificar estos fenotipos mediante las técnicas serológicas, la mayoría de los donantes portadores de variantes DEL son tipificados erróneamente como D negativo, con el riesgo potencial de inducir una aloinmunización en receptores D negativo.

El fenotipo DEL está fuertemente asociado a la expresión concomitante del antígeno C o E, es decir, suele detectarse, generalmente, en individuos tipificados por los métodos de rutina como r'r o r'r. Es más frecuente en poblaciones del este asiático, donde

se encuentra entre el 10% y el 30% de los individuos D negativo, mientras que en caucásicos su detección es excepcional.

Los alelos *DEL* son producto de diferentes alteraciones genéticas como mutaciones puntuales con cambio de sentido, cambios en los sitios de empalme (*splicing*) del ARNm, recombinaciones homólogas, deleciones e inserciones de nucleótidos.^{20,27} Las variantes *DEL* más frecuentes en la población europea son *RHD(M295I)* y *RHD(IVS3+1g>a)*, mientras que en asiáticos el alelo prevalente es *RHD(1227G>A)*.

Epítomos D en RhCE

Algunas variantes de la proteína RhCE poseen AAs D específicos (residuos específicos de la proteína RhD en las posiciones homólogas de la proteína RhCE) que generan epítomos D. Estas proteínas mutadas pueden complicar la tipificación del antígeno D, ya que reaccionan con ciertos reactivos anti-D monoclonales generando discrepancias o resultados falsos positivos. Por ejemplo, el fenotipo DHAR, presente en individuos de descendencia alemana, y el fenotipo Crawford, encontrado en individuos africanos, presentan una fuerte reactividad con algunos anti-D monoclonales, pero no son reactivos con otros, incluso con anti-D policlonales. También se han descrito proteínas RhCE mutadas que generan epítomos D "like" en las cuales los AAs modificados han sido reemplazados por otros que no son D específicos.^{28,29} Cabe destacar que estos fenotipos que expresan epítomos D en

RhCE son detectados solo en ausencia de una proteína RhD convencional, ya que la reactividad normal de un polipéptido RhD enmascararía la reacción con los epítomos D en RhCE.

Epítomos D con expresión aumentada

Algunos fenotipos con delección parcial de los antígenos Rh, como ser D⁻, Dc⁻ y DC^w- se caracterizan por presentar una expresión exacerbada del antígeno D (D elevado). Este fenómeno ocurre como resultado de la presencia de epítomos D específicos en la proteína RhCE, ya que estos fenotipos deleccionados son generados por alelos híbridos del tipo *RHCE-D-CE*. Las secuencias adicionales de *RHD* en *RHCE* junto con un alelo *RHD* normal explica la aparición del antígeno D elevado y la ausencia de los antígenos C/c y/o E/e. Los individuos portadores de fenotipos con delección parcial generan anti-Rh17 si entran en contacto con eritrocitos D positivo.¹

Fenotipos Rh-deficitarios.

Rh_{null} y Rh_{mod}

Los hematíes de los individuos de fenotipo Rh_{null} son excepcionales y se caracterizan por la ausencia de antígenos Rh en su membrana. Estas personas cuando se inmunizan producen un anticuerpo anti-Rh29 que reacciona con todos los hematíes, excepto con los del mismo fenotipo.¹ El fenotipo Rh_{null} es debido, en la mayoría de casos, a la presencia de mutaciones llamadas “reguladoras” del gen *RHAG*, que no sólo inciden en la proteína RhAG resultante, sino también en la expresión de

las proteínas RhCE y RhD. En algunos casos el gen *RHAG* es capaz de producir una mínima cantidad de proteína RhAG, lo que explica la presencia de antígenos Rh con expresión muy débil, como sucede con el fenotipo Rh_{mod}.

Menos frecuente es que el fenotipo Rh deficitario se deba a mutaciones del gen *RHCE* unidas a la delección del gen *RHD*, lo que produce el llamado fenotipo Rh_{null} de tipo amorfo.

Las células Rh_{null} son anómalas, tanto morfológica como funcionalmente. La mayoría de individuos de fenotipo Rh_{null} y Rh_{mod} presentan un cierto grado de anemia hemolítica que, en algunos casos, puede ser subsidiaria de una esplenectomía. Los estudios bioquímicos efectuados en estos individuos demuestran la ausencia de otras proteínas asociadas con las proteínas Rh, como es el caso de Rh50, CD47, LW y la GPB. La anemia resultante también indica el papel desarrollado por las proteínas Rh, junto a estas otras proteínas asociadas, consistente en mantener íntegra la estructura de la membrana del hematíe.

Anticuerpos

Los anticuerpos Rh son habitualmente de clase IgG (IgG1 y/o IgG3) y la mayoría no fijadores de complemento. El anti-D suele acompañarse de anti-C, en un 30% de casos, y de anti-e, en un 2%.^{1,23} La inmunización primaria de una persona D negativo, después de una transfusión D positivo, suele conllevar la aparición de un aloanticuerpo de especificidad anti-D a las veinte semanas de la transfusión, aproximadamente, hasta en un 20% de individuos.³⁰ En ocasiones, la exposición a

una pequeña cantidad de hematíes D positivo no es suficiente para que el anticuerpo sea detectable, como puede suceder durante la gestación o en el posparto inmediato; sin embargo, una nueva exposición a hematíes D incompatibles provocará una rápida e intensa respuesta anamnésica.

Anti-D puede causar reacciones transfusionales hemolíticas, en algunas ocasiones de carácter grave, y EHRN. Las gestantes portadoras de una variante de D que se sensibilizan pueden producir EHRN cuando el feto es portador de un antígeno D completo. Si se conoce que la gestante es portadora de una de estas variantes, y da a luz a un recién nacido D positivo, la gestante es candidata a recibir la dosis preceptiva de gammaglobulina anti-D.

De los restantes anticuerpos Rh, anti-c ha venido considerándose el segundo más frecuente, seguido de anti-E; sin embargo, en los últimos años, y coincidiendo con la utilización de técnicas más sensibles de detección de anticuerpos irregulares, los anticuerpos anti-E parecen detectarse con mayor frecuencia que los de especificidad anti-c, aunque muchos de ellos suelen ser de origen "natural". La presencia aislada de la especificidad anti-C es muy rara en ausencia de anti-D. Clínicamente, anti-c es el más importante, ya que es capaz de producir EHRN grave; por el contrario, anti-C, anti-E y anti-e raramente la producen, y cuando lo hacen, los recién nacidos presentan una afectación moderada.

Algunos anticuerpos Rh suelen detectarse asociados. Por ejemplo, en un individuo R_1R_1 (DCe/DCe) que ha producido un anti-E, y que lógicamente ha-

brá estado expuesto al antígeno c, es de esperar la presencia concomitante de anti-c, aunque a menudo se encuentre en menor concentración, es decir, prácticamente indetectable. Al seleccionar los hematíes para transfusión siempre habrá que respetar ambas incompatibilidades, si no se hace, anti-c será capaz de inducir una reacción transfusional inmediata o retardada. Por el contrario, no tiene sentido perseguir un anti-E en un paciente que haya desarrollado un anti-c, porque cabe la posibilidad de que sólo haya estado expuesto al antígeno c a través de una transfusión D negativo (ce); por otra parte, la gran mayoría de hematíes que seleccionaremos para transfundir, además de ser c negativo también serán E negativo.

Los aloanticuerpos dirigidos contra antígenos de alta incidencia del sistema Rh incluyen anti-Rh29, producido por los portadores de un fenotipo Rh_{null}, así como otros que frecuentemente son producidos por pacientes transfundidos afectados de drepanocitosis. Estas especificidades (anti-hr^s, anti-hr^B, y anti-Hr) resultan muy complejas de identificar, pueden ser clínicamente significativas y provocar complicaciones graves. Anti-Rh32 puede ser inmune, pero a menudo es de tipo natural en sueros pluriespecíficos. Este anticuerpo no puede separarse por adsorción/elución de sueros que contengan anti-Go^a (RH30) o anti-Evans (RH37).

En el suero de pacientes afectados de anemia hemolítica autoinmune (AHAI) de tipo caliente, y en algunos casos de AHAI inducida por fármacos, es posible identificar autoanticuerpos dirigidos contra antígenos Rh de alta incidencia.

Tipaje serológico de D

Los primeros reactivos desarrollados para el tipaje del antígeno D eran anticuerpos policlonales procedentes de mujeres sensibilizadas por el embarazo, o bien de donantes voluntarios hiperinmunizados. Estos anticuerpos policlonales eran fundamentalmente de clase IgG y reconocían diferentes epítomos D. Las soluciones hiperproteicas en los que estaban suspendidos favorecían la aglutinación espontánea de los hematíes y exigían unos controles apropiados para asegurar la veracidad del resultado.

La llegada de los Ac Mo supuso notables mejoras en el tipaje, evitando estas falsas aglutinaciones, al no requerir para su conservación soluciones tan ricas en proteínas. No obstante, las muestras tipificadas como AB, D positivo no deben ser validadas sin antes excluir una aglutinación espontánea de los hematíes del paciente, para lo que se requerirá un autocontrol. El mejor control consiste en la incubación de los hematíes del paciente con el diluyente en el que está suspendido el anticuerpo; sin embargo, no siempre el fabricante provee este control, y en ese caso puede emplearse una solución de albúmina al 6%-8%. A pesar de la exquisita especificidad de los Ac Mo, capaces de reaccionar con un solo epítomo, no garantizan la detección de todas las muestras D positivo, lo que ha obligado a emplear diversos protocolos y estrategias de tipaje en pacientes y donantes para catalogar de la manera más exacta posible el carácter D positivo o negativo de todas las muestras.

Los reactivos Rh, con la excepción de anti-D, no están diseñados para rea-

lizar el tipaje con la prueba indirecta de la antiglobulina. En el tipaje Rh, como en el de cualquier otro reactivo, deben seguirse muy estrictamente las instrucciones del fabricante.

Tipificación serológica en pacientes y gestantes

La estrategia para la tipificación del antígeno D en pacientes y gestantes no ha variado sustancialmente en los últimos años. En realidad, para el tipaje de D solo se requiere un anti-D monoclonal de clase IgM capaz de aglutinar a todos los fenotipos que expresan D, con la excepción de las variantes DVI. En algunos países, esta estrategia ha sido regulada por ley, como es el caso de Alemania, Reino Unido, Francia y Holanda.^{4,17,31} Con esta estrategia se pretende que los pacientes portadores de esta variante sean catalogados como D negativo y se beneficien de una transfusión con hematíes D negativo. La lógica de este planteamiento ha favorecido su adopción por la mayoría de servicios de transfusión y laboratorios de inmunohematología implicados en el tipaje de pacientes y gestantes. Sin embargo, el empleo cada vez más generalizado de tarjetas para los estudios inmunohematológicos de tipaje y escrutinio de anticuerpos irregulares ha hecho que en la práctica se estén empleando dos reactivos anti-D, uno que aglutina las variantes DVI y otro que no lo hace, de tal manera que la variante pueda ser fácilmente reconocida. Como parte del procedimiento de tipaje se tiene la recomendación de no realizar la prueba indirecta de la antiglobulina en los pacientes o gestantes tipados como D ne-

gativo, o que muestran una reactividad claramente inferior a la esperada. De no hacerlo así pueden cometerse muchos errores que nos llevarán a catalogar como D positivo a las variantes DVI y, lo que es peor, a transfundir hematíes D positivo o a no indicar la administración de gammaglobulina anti-D.

Cuando la reactividad de las muestras no es la esperada, ya sea porque las reacciones son de intensidad inferior a lo habitual ($\leq 2+$) con uno o ambos reactivos, o bien por una discordancia entre la reactividad de uno y otro anticuerpo de tipaje que sugiera la presencia de una variante DVI, es aconsejable adoptar provisionalmente la solución más favorable para el paciente o la gestante, que es su catalogación como D negativo. Esta actitud permitirá que se realice la transfusión con hematíes D negativo y que se administre la dosis profiláctica de gammaglobulina anti-D, respectivamente. Posteriormente, cabe la posibilidad de remitir la muestra a un laboratorio de inmunohematología de referencia para su caracterización definitiva. En el caso de pacientes con previsión de futuras transfusiones, la confirmación del carácter D positivo nos permitirá aliviar el “stock”, habitualmente mermado, de unidades D negativo, y en el caso de las gestantes nos permitirá ahorrar la administración innecesaria de gammaglobulina anti-D. Este es el caso de los fenotipos D débil tipos 1, 2 y 3 que pueden considerarse D positivo a todos los efectos. En España también incluimos en este grupo a los fenotipos D débil 4.0 y 4.1, que sumados a los anteriores representan, tal como se comentó anteriormente, más del 95% de los fenotipos débiles. Si la caracterización de la

muestra permite su adscripción al grupo restante de fenotipos D débil (5% en europeos) o al grupo de fenotipos D parcial, deberemos respetar la condición D negativo del paciente o la gestante.³²

Los laboratorios de inmunohematología especializados disponen de diferentes estrategias para la caracterización de estas muestras que suelen incluir la tipificación completa Rh D, C, E, c y e, y un examen serológico con una batería de Acs Mo dirigidos contra diferentes epítomos del antígeno D. El fenotipo Rh completo puede ayudar a predecir algunos de los tipos de D débil y de D parcial que habitualmente están asociados a determinados haplotipos *RH*. Por ejemplo, un D débil con fenotipo CDe (R_1) suele asociarse a los D débil tipo 1 y 3. El fenotipo cDE (R_2) se asocia a las variantes D débil tipos 2 y 5. Y el fenotipo cDe (R_0) se asocia al fenotipo D débil tipo 4.^{26,33,34} El examen de los hematíes con Acs Mo suele demostrar una reactividad más débil frente a algunos de los anticuerpos empleados y, en el mejor de los casos, un patrón de reacción compatible con uno de los fenotipos bien definidos de D parcial o de D débil. El siguiente paso suele ser el análisis molecular que nos permite caracterizar la variante alélica responsable del fenotipo del paciente, bien confirmando el tipo de variante sugerida por el estudio serológico con Acs Mo, o bien revelando el alelo responsable de la expresión anómala del antígeno D.

Con esta estrategia para el tipaje de D que es mayoritariamente empleada, sabemos que algunos individuos portadores de variantes *RHD*, susceptibles de inmunizarse, pueden ser erróneamente

catalogados como D positivo. Sin embargo, la frecuencia de estas variantes es muy baja y el grado de evidencia sobre el riesgo real de inmunización es todavía muy escaso.

Tipificación serológica en donantes

La estrategia ideal en donantes consistiría en disponer de un reactivo anti-D capaz de aglutinar directamente a la mayoría de las variantes del antígeno D, de tal forma que estos donantes quedarán inequívocamente catalogados como D positivo. Sin embargo, en la práctica no disponemos de un reactivo de estas características, lo que nos obliga a utilizar más de un reactivo y, en última instancia, a emplear la técnica indirecta de la antiglobulina para confirmar el carácter D positivo de una muestra que inicialmente no es reactiva o que reacciona de forma más débil de lo esperado.

En los últimos años se ha difundido una serie de publicaciones que describen pacientes que han resultado inmunizados después de recibir hematíes de donantes portadores de variantes del antígeno D del tipo D débil y DEL. En el *International Forum* publicado en 2005 por la revista *Vox Sanguinis*, dedicado al tema del “D débil”, se incluyó un total de siete pacientes procedentes de un total de diecisiete países participantes que resultaron inmunizados con hematíes portadores de determinadas variantes.³⁵ Observaciones como estas han generado una cierta inquietud y han suscitado dudas respecto a la estrategia de tipificación D en donantes, y a la actuación a seguir con los mismos una vez confirmado su carácter de

portadores de variantes con una potencial capacidad inmunizante. Por otra parte, algunos centros de transfusión están empleando técnicas moleculares de tipificación en donantes al azar o en donantes con un determinado fenotipo (donantes D negativo, pero con fenotipo r' y/o r'') que han puesto de manifiesto una serie de discordancias respecto a los resultados serológicos que también exigen una revisión pragmática de la actitud a adoptar para la catalogación definitiva del grupo Rh (D) en los mismos.^{21,36}

Las variantes de D y DEL que parecen resultar inmunizantes para los pacientes Rh(D) negativo corresponden, entre otras, al D débil tipo 2³⁷, el tipo 1^{38,39}, el tipo 26³⁴, y el DEL portador del alelo *RHD*(K409K).³⁹ Aunque la capacidad inmunogénica de las mismas no es discutible, la probabilidad de que un paciente se inmunice cuando es transfundido con hematíes de este fenotipo es muy baja^{40,41} y sin duda inferior a la que poseen otros antígenos que habitualmente no contemplamos en la práctica transfusional, como es el caso de E o K. No obstante, en individuos previamente inmunizados, la limitada capacidad inmunizante puede ser suficiente para desencadenar una respuesta secundaria.³⁸⁻⁴² El impacto y las posibles consecuencias de estas variantes en los pacientes pueden ser muy diferentes dependiendo de la prevalencia de las mismas en la población y, por tanto, según se trate de población europea, africana o del este asiático. En las tres poblaciones se dan prevalencias muy diferentes de individuos D negativo, de individuos considerados serológicamente D negativo, pero por-

tadores del gen *RHD*, y de individuos portadores de variantes *RHD*.^{20,27,43-45} Por esta razón, la estrategia de tipaje Rh (D) en cada caso debe estar acorde con la realidad presente en cada población.

En el este asiático donde, como ha sido mencionado, más de una tercera parte de los donantes originalmente catalogados como D negativo son en realidad portadores de un fenotipo DEL,²² todavía no se ha adoptado la medida de analizar sistemáticamente el genotipo *RHD* de los donantes, pero sí se aboga por estudiar las posibles consecuencias de esta situación en los pacientes, investigando los casos de pacientes D negativo inmunizados que fueron transfundidos con hematíes aparentemente D negativo.^{46,47}

En Alemania, y desde el año 2001, se examina la presencia del gen *RHD* en todos los donantes de primera vez que serológicamente se comportan como D negativo, y tras el genotipaje de unos treinta mil donantes han detectado que uno de cada mil son portadores de un gen *RHD* responsable de un fenotipo DEL. Estos donantes son definitivamente catalogados como D positivo.^{31,40}

Teniendo en cuenta la información existente, el grado de evidencia en torno a la capacidad inmunizante de algunas variantes, y las estrategias adoptadas por otros países de la comunidad europea, cabe preguntarse cuál puede ser la estrategia más adecuada en nuestro medio, tanto para el tipaje de D como para el manejo de los donantes que hasta ahora habían sido serológicamente catalogados como D negativo. En el punto en que nos encontramos, todavía resulta prematuro y costoso aconsejar que se realice el genotipo *RHD* en

todos los donantes o en los donantes de primera vez. Sin embargo, sería deseable que los bancos de sangre y centros de transfusión que, por diferentes razones y con distintos objetivos ya están trabajando en el análisis del genotipo *RHD* de donantes, sumaran sus experiencias para conocer, sobre la base de una muestra de tamaño considerable, la prevalencia exacta de las variantes *RHD* con capacidad inmunizante en cada población de donantes. Además, los donantes deben ser informados de su carácter de portadores de un fenotipo DEL, o de variantes potencialmente inmunizantes, y proveerlos de una carta o tarjeta de identificación en la que se indique de forma clara su carácter de portador de un fenotipo D positivo como donante, y de un fenotipo D negativo en calidad de receptor. Sólo en el caso que se demuestre de forma inequívoca que el gen *RHD* detectado no se expresa, se podría mantener la catalogación D negativo del donante, como sucede en el caso del alelo *RHD* Ψ u otros alelos nulos.

Mientras se avanza en la realización de estos estudios es aconsejable no emplear las unidades D negativo, C y/o E positivo (fenotipos r' y r'') para la transfusión de pacientes con indicación absoluta de recibir componentes D negativo, como es el caso de las gestantes y de las mujeres en edad fértil, en general. Por otra parte, la investigación sistemática de los casos de pacientes con aloinmunización anti-D después de transfusiones con componentes D negativo, también puede ayudar a conocer mejor la capacidad inmunizante de las variantes *RHD* o, lo que es igual, la magnitud real del problema.

Tipaje molecular

La complejidad genética del Sistema Rh y el elevado número de variantes alélicas descritas suponen un verdadero reto para el genotipaje *RH*. Debido a la particular topología de las proteínas Rh, existen numerosos polimorfismos en la secuencia genética que contribuyen y/o afectan a la expresión de los antígenos de este sistema, dificultando el diseño de estrategias de genotipaje que puedan identificar todas las variantes alélicas *RH* clínicamente relevantes. A todo ello se suma la existencia de múltiples alelos silentes, que no se expresan o se expresan de forma aberrante, con lo que dependiendo de la cigosidad *RHD*, el fenotipo RhD resultante podría ser D negativo. Como ya se ha comentado anteriormente, la prevalencia de estos alelos silentes varía mucho en función del origen étnico y es mucho más elevada en población de raza negra. De todos modos, y a pesar de la heterogeneidad molecular observada en el conjunto de alelos nullos descritos, las principales variantes alélicas de este tipo, con representación significativa en determinadas poblaciones, están bien caracterizadas y su identificación está incluida en las estrategias de genotipaje *RH* que se aplican hoy en día en poblaciones multiétnicas.

Actualmente, los estudios de genotipaje *RH* se llevan a cabo mayoritariamente en laboratorios de inmunohematología especializados, donde se aplican diferentes estrategias con base en el conocimiento de estos polimorfismos genéticos y de las variantes alélicas *RH* que pueden estar presentes en la población diana. Por otro lado, el

ámbito de aplicación abarca desde el genotipaje fetal, el tipaje de pacientes transfundidos, la determinación de la cigosidad *RHD* y la identificación de variantes *RH*, especialmente en casos de discrepancia entre reactivos serológicos o cuando la expresión del antígeno D es débil o anómala.

Estrategias de genotipaje

Los primeros métodos para la determinación del genotipo *RHD* se desarrollaron en la primera mitad de la década de los noventa, poco después del clonaje y caracterización de los genes *RHD* y *RHCE*. Dada la elevada homología existente entre ambos genes (92%), todos ellos centraban el análisis en alguna de las regiones más divergentes, como el intrón 4⁴⁸, el exón 10⁴⁹, o el exón 7.⁵⁰ El intrón 4 del gen *RHD* presenta una delección de 600 pb comparado con la misma región del gen *RHCE*, por lo que una amplificación de esta región intrónica permite evidenciar de una forma simple la presencia del gen *RHD*.¹ Así mismo, la región 3' no codificante del exón 10, con un grado de homología entre ambos genes mucho más reducida, o la secuencia codificante del exón 7, que concentra el mayor número de polimorfismos *RHD/CE*, han sido las siguientes regiones diana para el diseño de reacciones de amplificación *RHD* específicas.^{49,50}

Todas estas aproximaciones, sin embargo, pueden dar resultados erróneos cuando se aplican de forma individual,⁵¹ debido a la existencia de variantes alélicas en las que secuencias del gen *RHD* están reemplazadas por secuencias *RHCE*. En consecuencia, y

dada la importancia clínica del tipaje RhD, existe el consenso/recomendación de analizar al menos dos regiones no adyacentes del gen *RHD* en cualquier aproximación de genotipaje *RHD* aplicada a la práctica clínica.⁵²

En esta línea, diversos métodos de genotipaje *RHD* han sido diseñados *a posteriori*, usando la estrategia de PCR-SSP (ya comentada en el Capítulo 3 *Principios de la Genética*), con cebadores *RHD*-específicos. La aproximación más utilizada es el análisis simultáneo de los exones más informativos que componen el gen *RHD* (también conocido como “*RHD exon-scanning*”), ya sea en reacciones paralelas (en batería) con iguales condiciones de amplificación,⁵³ o bien en multiplex, donde los diferentes exones se amplifican en un mismo tubo de reacción.⁵⁴ En la Figura 6 se puede observar el patrón de amplificación de una variante DVI tipo 2 en la batería de reacciones *RHD*-específicas descrita por Gassner y colaboradores.⁵³

Este tipo de análisis se puede complementar con reacciones de PCR-SSP

adicionales para la determinación del genotipo *RHCE*. Como ya se ha comentado anteriormente, el polimorfismo *E/e* consiste en un único cambio nucleotídico en la posición 676 del exón 5 *RHCE*, que puede analizarse con relativa facilidad utilizando cebadores alelo-específicos.^{53,55} Los alelos *RHC* y *RHc*, en cambio, difieren en seis posiciones nucleotídicas, de las cuales cinco se localizan en el exón 2. La secuencia codificante del exón 2 es totalmente idéntica en el alelo *RHC* y el gen *RHD*, con lo que la discriminación entre *RHC* y *RHc*, en individuos RhD positivo, no puede basarse en el análisis de esta región. El único cambio nucleotídico restante es un cambio de citosina a guanina en la posición 48 del exón 1, aunque la citosina 48 tampoco es exclusiva del alelo *RHC*.⁵³ A pesar de no ser muy frecuentes, existen variantes *Rhc* que presentan una citosina en esta posición, por lo que no puede considerarse como polimorfismo diana sobre el cual basar la determinación del genotipo *RHC/c*. La detección inequívoca

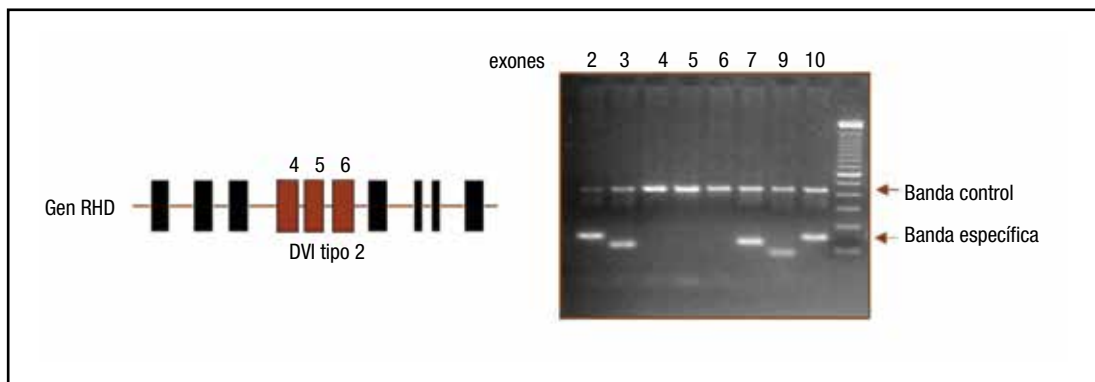


Figura 6 . Tipificación molecular *RHD* mediante “exon scanning” utilizando cebadores *RHD*-específicos. Estrategia descrita por Gassner y colaboradores (Transfusion, 37: 1020,1997). En la Figura se muestra el patrón de amplificación correspondiente a la variante DVI tipo 2, en la que los exones 4, 5 y 6 del gen *RHD* están reemplazados por las secuencias equivalentes del gen *RHCE*. La ausencia de amplificación de los exones 4, 5 y 6 del gen *RHD* permite identificar la presencia de este alelo híbrido.

del alelo *RHC* requiere, por todo ello, un diseño complementario basado en la amplificación de un fragmento del intrón 2 del gen *RHCE*, en el que existe una inserción de 108 pb que identifica de forma específica el alelo *RHC*.⁵⁶ En cambio, la presencia o ausencia de un alelo *Rhc* se detecta mediante una combinación de cebadores específicos que identifican los polimorfismos característicos de este alelo en las posiciones 201 y 307.⁵³

Aparte de estas estrategias de genotipaje *RHD/CE*, se han desarrollado otros métodos de tipificación molecular que permiten la identificación de las variantes D débil más comunes, especialmente en población caucásica.⁵⁷ La descripción de las bases moleculares asociadas a este tipo de variantes *RHD* ha permitido el diseño de reacciones de amplificación específicas para detectar

las mutaciones características de estas variantes alélicas. Una aproximación de este tipo se puede ver en el ejemplo de la Figura 7.

La detección específica de los principales alelos *RHD* silentes, especialmente el *RHD ψ* y el gen híbrido *RHD-CE-D^s*, es otro de los aspectos que cubren la mayoría de las estrategias de genotipaje *RH* aplicadas actualmente en poblaciones multiétnicas, ya sea mediante reacciones de amplificación específicas,¹⁵ o en combinación con el cribaje de otros polimorfismos *RHD*.²⁰

Determinación de la cigosidad *RHD*

La determinación del fenotipo Rh completo en individuos RhD positivos nos da una idea de la posibilidad de que sea homocigoto (D/D) o hemici-



Figura 7. Detección de las variantes D débil más comunes mediante una estrategia de PCR-SSP. La aproximación consiste en una batería de cinco reacciones de PCR, cada una de las cuales utiliza cebadores para detectar la mutación específica característica de las variantes D débil tipo 1, tipo 2, tipo 3, tipo 4 y tipo 5, respectivamente. En la Figura se muestra la detección de una variante D débil tipo 2, en la que sólo amplifica el fragmento correspondiente a los cebadores específicos para esta variante alélica.

gato (D/d) para el gen *RHD*, con base en lo que deducimos como el genotipo “más probable”. Sin embargo, sólo las técnicas de tipificación molecular permiten asignar con precisión el estado *RHD* hemicigoto u homocigoto de un individuo, evitando las presunciones obtenidas mediante la determinación del fenotipo.

Se han descrito dos estrategias diferentes para realizar el estudio de la cigosidad *RHD* en individuos D positivo. Por un lado, es posible cuantificar el gen *RHD* y, por otro, se puede investigar a nivel del ADN genómico la existencia de un haplotipo que porte la delección del gen *RHD*.

Dosaje del gen *RHD*

Este abordaje se realiza mediante una técnica denominada PCR cuantitativa, y permite estimar en forma absoluta o relativa la cantidad del gen *RHD* por comparación con el dosaje de un gen reportero cuyo estado homocigoto o heterocigoto es conocido. Los métodos más utilizados se basan en estrategias de PCR en tiempo real con sondas fluorogénicas^{58,59} y PCR con *primers* fluorescentes seguida de electroforesis capilar⁶⁰ (Figura 8).

Detección de la delección del gen *RHD*

El gen *RHD* está flanqueado por secuencias de ADN altamente homólogo-

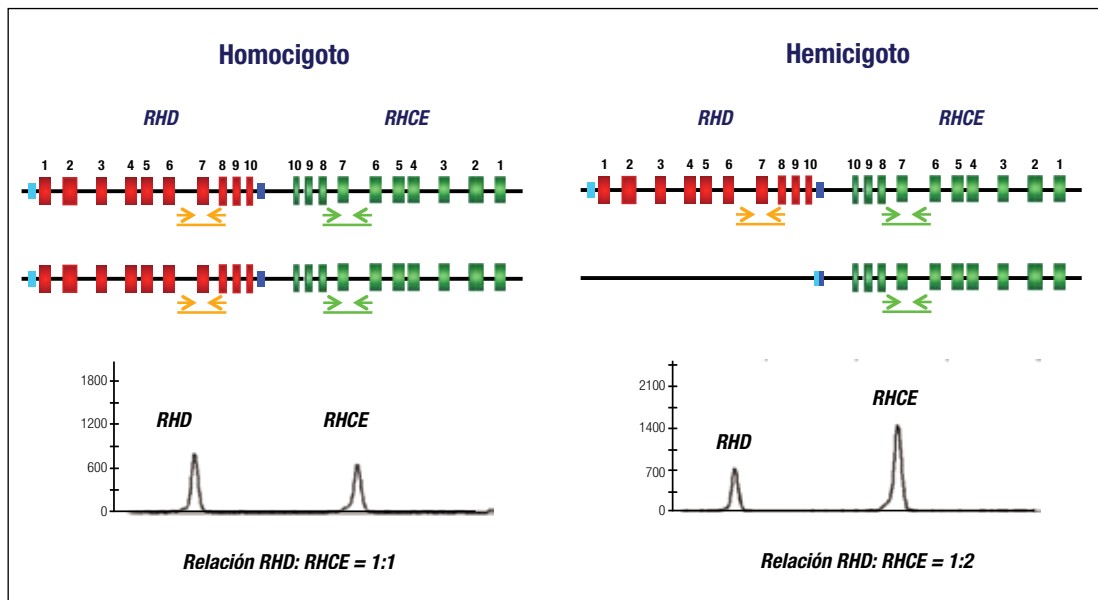


Figura 8. Dosaje del gen *RHD*. El método de PCR con *primers* fluorescentes seguida de electroforesis capilar consiste en determinar el número de copias del gen *RHD* coamplificando con *primers* fluorogénicos dos regiones homólogas de ambos genes *RH* (por ejemplo, exón 7) y comparando las intensidades de fluorescencia obtenidas de cada una de ellas luego de una electroforesis capilar. Debido a que todas las personas poseen dos genes *RHCE* por célula, en los individuos *RHD* homocigotos se obtiene una relación 1:1 entre las intensidades de fluorescencia provenientes de ambos genes, mientras que en los individuos hemicigotos la relación entre las intensidades de fluorescencia provenientes del gen *RHD* y *RHCE* es 1:2. En el primer caso, la cantidad relativa del gen *RHD* es igual a la del gen *RHCE* que se encuentra en estado homocigoto, mientras que en el segundo caso la cantidad relativa del gen *RHD* es igual a la mitad de la del gen *RHCE*.

gas denominadas cajas Rhesus 5' y 3' que contienen una región de identidad de 1463 pb completamente iguales. La delección del gen *RHD* responsable del fenotipo D negativo fue, probablemente, el resultado de un entrecruzamiento desigual entre las regiones de identidad 5' y 3' con formación de una caja Rhesus híbrida en el sitio de la delección.

El análisis de estas cajas es útil para definir la cigosidad del gen *RHD*. La detección de una caja Rhesus híbrida en un individuo D positivo indica la presencia de un cromosoma con de-

lección del gen *RHD*, lo cual permite determinar que la persona es *RHD* hemicigoto. Por el contrario, la ausencia de una caja Rhesus híbrida en un individuo D positivo indica que es *RHD* homocigoto, ya que en ninguno de los cromosomas homólogos del par 1 se encuentra delecionado el gen *RHD*. Se han descrito dos estrategias para determinar la presencia o ausencia de cajas Rhesus híbridas. Una de ellas está basada en la metodología de PCR-RFLP,⁶¹ y la otra, en la técnica de PCR-SSP⁶² (Figura 9).

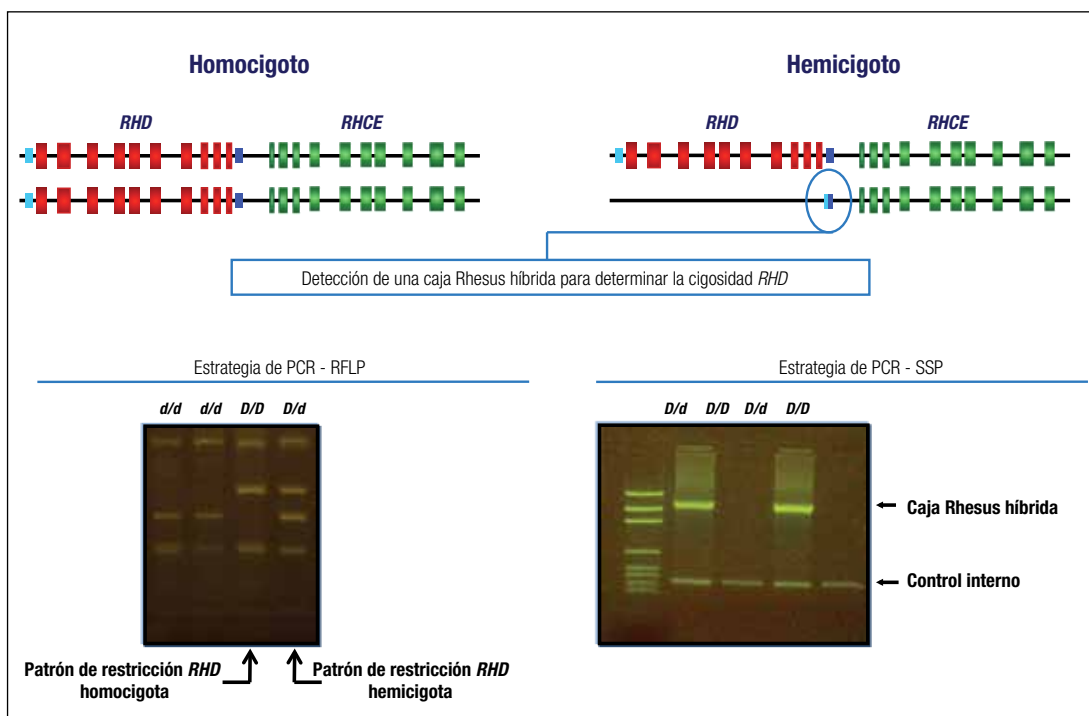


Figura 9. Detección de la delección del gen *RHD*. Este método consiste en determinar la presencia o ausencia de una caja Rhesus híbrida en individuos D positivo. La detección de una caja Rhesus híbrida en un individuo D positivo indica su estado *RHD* hemicigoto, mientras que la ausencia de una caja Rhesus híbrida indica su condición *RHD* homocigoto. Con la metodología de PCR-RFLP se coamplifican la caja Rhesus 3' y la caja Rhesus híbrida, y luego de la digestión enzimática se obtienen patrones de restricción que permiten diferenciar a los individuos *RHD* homocigotas de aquellos *RHD* hemicigotos. Mediante el método de PCR-SSP se amplifica específicamente un fragmento de ADN proveniente de la caja Rhesus híbrida.

Análisis del genotipo *RHD* fetal

La determinación del genotipo *RHD* fetal, al igual que el genotipo *RHCcEe*, puede llevarse a cabo a partir del ADN obtenido de muestras de líquido amniótico o de vellosidades coriales, utilizando cualquiera de las estrategias de genotipaje *RH* antes comentadas. No obstante, el descubrimiento de la presencia de ADN fetal en el plasma de las gestantes abrió la posibilidad de utilizar el plasma materno como fuente alternativa de ADN fetal. La determinación no invasiva del genotipo *RHD* fetal en gestantes D negativo, se lleva a cabo hoy en día en diferentes centros de muchos países, y se consolidó como método de elección para la tipificación D fetal.

Desde la primera descripción de una aproximación técnica para determinar el genotipo *RHD* fetal a partir del plasma materno,⁵⁴ múltiples protocolos han sido desarrollados y validados para esta aplicación, y muestran un elevado grado de fiabilidad de los resultados en todos ellos.^{15, 55-57} La mayoría de laboratorios utilizan la tecnología de PCR cuantitativa a tiempo real, con sondas TaqMan™ específicas para una o varias regiones del gen *RHD*. El patrón de amplificación detectado mediante esta técnica cuantitativa permite distinguir fácilmente la amplificación del ADN de origen fetal respecto a una posible amplificación de un gen *RHD* silente materno, una circunstancia que se da en población caucásica con una frecuencia relativamente baja (2%-3%), pero que aumenta significativamente si se analiza población multiétnica.²⁰ Este hecho también condiciona la estrategia

utilizada, de allí que existan aproximaciones en las que el diseño de las regiones del gen *RHD* que se analizan en el ADN de plasma permite distinguir los alelos *RHD* silentes mayoritarios en población de raza negra.⁶³ Aparte de los múltiples métodos *in house* que están en uso hoy en día, existe un kit comercial (Free DNA Fetal Kit RhD) desarrollado por el Instituto de Biotecnología Jacques Boy de Francia.⁶⁴

Ventajas y limitaciones del tipaje molecular

Las ventajas del tipaje molecular se ven reflejadas en el abanico de aplicaciones que presenta actualmente el genotipaje *RH*. Más allá de la determinación del genotipo fetal, el tipaje molecular nos permite resolver las discrepancias entre reactivos utilizados en la tipificación serológica Rh. También nos permite discriminar entre aloanticuerpos versus autoanticuerpos, e identificar de forma inequívoca las variantes alélicas *RHD* asociadas a un patrón de expresión del antígeno D alterado.

Como cualquier otra metodología, el tipaje molecular *RH* tiene también sus limitaciones, ya comentadas por la propia complejidad genética de este sistema de grupo sanguíneo. El elevado número de variantes alélicas descritas en el sistema Rh dificulta enormemente el diseño de estrategias que identifiquen todas y cada una de ellas. La detección puntual de discrepancias entre genotipo y fenotipo puede deberse también a la presencia de algún alelo silente, que si no está previamente caracterizado, o la técnica utilizada no contempla su

identificación, nos dará un resultado falsamente positivo.

Función putativa de las proteínas Rh y RhAG

Las proteínas Rh y RhAG son estructuras homólogas con idéntica topología en la membrana y un 33% de identidad en la secuencia de AAs. Su conformación característica de proteínas de múltiples pasos de entrada y salida en la membrana es característica de las moléculas transportadoras.⁶⁵ Además, la secuencia proteica de ambas también es homóloga con la de los transportadores de amonio en animales inferiores y plantas. Las células de levadura que carecen de transportadores de amonio no son capaces de desarrollarse en un medio bajo en amonio, pero la situación cambia cuando se efectúa una transfección de la célula con *RHAG*. De confirmarse esta función como proteínas transportadoras de amonio, cabe especular con la posibilidad de que estas proteínas contribuyan de algún modo al transporte de amonio desde el cerebro hasta el hígado o el riñón para su metabolización o excreción.⁶⁶

Una hipótesis alternativa es que las proteínas Rh y RhAG, junto a la proteína Banda 3, podrían actuar como proteínas de intercambio entre el oxígeno y el dióxido de carbono. Esta hipótesis estaría alineada con la función primordial del hematíe, la de transporte de oxígeno y conversión del dióxido de carbono a bicarbonato mediante la acción de la anhidrasa carbónica en el citoplasma del propio hematíe.⁶⁷

De lo que no existe duda es de la función estructural de las proteínas Rh

y RhAG y de su contribución a mantener íntegra la membrana del hematíe.⁶⁸

Referencias

1. Daniels, G. Human Blood Groups. 3rd Ed. Wiley Blackwell, Oxford UK, 2013
2. Avent, N. New insight in the Rh system: structure and function. Vox Sanguinis, ISBT Science Series, 2007; 2: 35-43.
3. Westhoff, C. M. The structure and function of the Rh antigen complex. Semin Hematol, 2007; 44(1): 42-50.
4. Flegel, W. A. Molecular genetics and clinical applications for *RH*. Transf Apheresis Sci, 2011;44: 81-91.
5. Levine, P., Stetson, R. E. An unusual case of intragroup agglutination. JAMA, 1939;113: 126-127.
6. Levine, P., Burnham, L., Katzin, W. M., Vogel, P. The role of isoimmunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. Am J Obstet Gynecol, 1941; 42: 925-937.
7. Landsteiner, K., Wiener, A. S. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. Proc Soc Exp Biol Med, 1940;43: 223-4.
8. Landsteiner, K., Wiener, A. S. Studies on an agglutinin (Rh) in human blood reacting with anti-rhesus sera and with human isoantibodies, 1941. J Exp Med; 74(4): 309-320.
9. Grandstaff Moulds, M. K. The LW blood group system: a review. Immunohematology, 2011; 27(4): 136-142.
10. Cherif-Zahar, B., Mattei, M. G., Le Van Kim, C., Bailly, P., Cartron, J. P., Colin, Y. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome 1p34.3-1p36.1 region by in situ hybridization. Hum Genet, 1991; 86: 398-400.
11. Arce, M. A., Thompson, E.S., Wagner, S., Coyne, K. E., Ferdman, B. A., Lublin, D. M. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in Rh.D positive, but not RhD-negative individuals. Blood, 1993; 82:651-655.
12. Simsek, S., de Jong, C.A.M., Cuijpers, H. T. M et al. Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNAs coding for Rh po-

- lypeptides and demonstration of E7e and C/c polymorphism. *Vox Sang*, 1994; 67:203-209.
13. Tippett, P. A. speculative model for the Rh blood groups. *Ann Hum Genet*, 1986; 50(3):241-247.
 14. Daniels, G. L., Anstee, D. J., Cartron, J. P. et al. Blood group terminology 1995. From the ISBT Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigens. *Vox Sang*, 1995; 69:265-79.
 15. Singleton, B. K., Gree, C. A., Avent, N. D., Martin, P. G., Smart, E., Daka, A. et al. The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in most Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*, 2000; 95:12-18.
 16. Chou, S. T., Westhoff CM. The Rh and RhAG blood group systems. *Immunohematology*, 2010; 26(4):178-86.
 17. Daniels, G. Variants of RhD. Current testing and clinical consequences. *Br J Haematol*, 2013; 161:461-470.
 18. Lomas, C., Tippett, P., Thompson, K. M. Relamed MD, Hugues-Jones NC. Demonstration of seven epitopes on the Rh antigen D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang*, 1989; 57:261-264.
 19. Scott, M. L., Voak, D., Liu, W., Jones, J. W., Avent, N. D. Epitopes on Rh proteins. *Vox Sang*, 2000; 78 (Suppl 2):117-120.
 20. Wagner, F. F., Frohmajer, A., Flegel, W. A. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet*, 2001; 2:10.
 21. Gassner, C., Doescher, A., Drnovsek, T. et al. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion*, 2005; 45: 527-38.
 22. Okubo, Y., Yamaguchi, H., Tomita, T., Nagao, N. A. D. variant, Del (letter). *Transfusion*, 1984; 24:542.
 23. Reid, M., Lomas-Francis, C., Olsson, M. The Blood Group Antigen Facts Book. Third ed. Facts Book Series. Elsevier. Academic Press, 2012.
 24. Baia, F., Muñiz-Díaz, E., Boto, N., Salgado, M., Montero, R., Ventura, T. et al. A simple approach to confirm the presence of anti-D in sera with presumed anti-D+C specificity. *Blood Transfus*, 2013; 23:1-4.
 25. Wagner, F. F., Frohmajer, A., Ladewig, B., Eicher, N. I., Lonicer, C. B., Müller, T. H. et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*, 2000; 95: 2699-708.
 26. Wagner, F. F., Gassner, C., Müller, T. H., Schönitzer, D., Schunter, F., Flegel, W. A. I. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*, 1999; 93: 385-93.
 27. Shao, C. P., Maas, J. H., Su, Y. Q., Köhler, M., Legler, T. J. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(e) and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang*, 2002; 83: 156-61.
 28. Beckers, E. A., Porcelijn, L., Ligthart, P., Vermeij, H., Von dem Borne, A. E., Overbeeke, M. A. et al. The RoHar antigenic complex is associated with a limited number of D epitopes and alloanti-D production: a study of three unrelated persons and their families. *Transfusion*, 1996; 36: 104-108.
 29. Flegel, W. A., Wagner, F. F., Chen, Q., Schlanser, G., Frame, T., Westhoff, C. M. et al. The RHCE allele ceCF: the molecular basis of Crawford (RH43). *Transfusion*, 2006; 46: 1334-1342.
 30. Frohn, C., Dumbgen, L., Brand, J. M., Görg, S., Luhm, J., Kirchner, H. Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. *Transfusion*, 2003; 43:893-898.
 31. Flegel, W. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Curr Opin Hematol*, 2006; 13:476-483.
 32. Denomme, G. A., Wagner, F. F., Fernández, B. J., Li, W., Flegel, W. Partial D, weak D types and novel RHD alleles among 33864 multi ethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion*, 2005; 45:1574-1580.
 33. Müller, T. H., Wagner, F. F., Trockenbacher, A., Eicher, N. I., Flegel, W. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three central European populations. *Transfusion*, 2001; 41:45-52.
 34. Flegel, W., Wagner, F. F., Müller, T. H., Gassner, C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med*, 1998; 8:281-302.
 35. Engelfriet, C. P., Reesink, H. W. International Forum. Testing for weak D. *Vox Sang*, 2006; 90(2): 140-153.
 36. Nogués, N., Tarragó, M., Subirana, L., Boto, N., Salgado, M., Ibáñez, M. et al. RHD null alleles in the Spanish population. *Vox Sang*, 2007; 93 (Suppl 1):205.

37. Flegel, W., Khull, S., Wagner, F. F. Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBC. *Transfusion*, 2000;40:428-434.
38. Mota, M., Fonseca, N. L., Rodrigues, A., Kutner, J. M., Castillo, L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang*, 2005; 88: 130-135.
39. Roxby, D. J., Coloma, M., Flegel, W. Observation of an anti-D alter D-positive transfusion in an individual with weak D type 1 phenotype (abstract). *Vox Sang*, 2004; 87:S77-S78.
40. Flegel, W. Homing on D antigen immunogenicity. *Transfusion*, 2005; 45:466-468.
41. Kumpel, B. M. Are weak D RBCs really immunogenic? *Transfusion*, 2006; 46:1061-1062.
42. Wagner, T., Körmöcz, G. F., Buchta, C. et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*, 2005; 45: 520-6.
43. Wagner, F. F., Moulds JM, Tounkara A, Kouriba B, Flegel W. RHD allele distribution in Africans of Mali. *BMC Genet*, 2003; 4:14.
44. Gassner, C., Doescher, A., Drnovsek, T. D., Rozman, P., Eicher, N. L., Legler, T. J. et al. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion*, 2005; 45:527-538.
45. Xu, Q., Grootkerk-Tax, M. G., Maaskant-van Wijk, P. A., van der Schoot, C. E. Systemic analysis and zygosity determination of the RHD gene in a D-negative Chinese Han population reveals a novel D-negative RHD gene. *Vox Sang*, 2005; 88:35-40.
46. Ohto, H., Yasuda, H. Response to: are weak D RBCs really immunogenic? *Transfusion*, 2006; 46:1065.
47. Kim, J. Y., Kim, S. Y., Kim, C.A., Yon, G. S., Park, S. S. Molecular characterization of D negative Korean persons: development of a diagnostic strategy. *Transfusion*, 2005; 45:345-352.
48. Arce, M., Thompson, E. S., Wagner, S., Coyne, K. E., Ferdman, B. A., Lublin, D. M. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. *Blood*, 1993; 82:651-655.
49. Bennett, P. R., Le Van Kim, C., Colin, Y., Warwick, R. M., Cherif-Zahar, B., Fisk, N. M., Cartron, J. P. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *New England Journal of Medicine*, 1993; 329: 607-610.
50. Simsek, S., Faas, B. H. W., Bleeker, P. M. M., Overbeeke, M. A. M., Cuijpers, H. T. H., van der Shoot, C. E., von dem Borne, A. E. G. Rapid RhD genotyping by polymerase chain reaction-based amplification of DNA. *Blood*, 1995; 85:2975-2980.
51. Aubin, J. T., Le Van Kim, C., Mouro, I., Colin, Y., Bignozzi, C., Brossard, Y., Cartron, J. P. Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *British Journal of Haematology*, 1997; 98: 356-364.
52. Flegel, W. A., Wagner, F. F., Müller, T. H., Gassner, C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfusion Medicine*, 1998; 8: 281-302.
53. Gassner, C., Schmarda, A., Kilga-Nogler, S., Jenny-Feldkircher, B., Rainer, E., Müller, T. H., Wagner, F. F., Flegel, W. A., Schönitzer, D. *RHD/CE* typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Transfusion*, 1997; 37: 1020-1026.
54. Maaskant-van Wijk, P. A., Faas, B. H. W., de Roister J. A. M., Overbeeke, M. A. M., von dem Borne, AEGKr, van Rhenen, D. J., van der Schoot, C. E. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six *RHD*-specific exons. *Transfusion*, 1998; 38: 1015-1021.
55. Faas, B. H., Simsek, S., Bleeker, P. M. et al. RhE/e genotyping by allele-specific primer amplification. *Blood*, 1995; 85: 829-32.
56. Rozman, P., Dovc, T., Gassner, C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion*, 2000; 40: 936-942.
57. Müller, T. H., Wagner, F. F., Trockenbacher, A., Eicher, N. I., Flegel, W. A., Schönitzer, D., Schunter, F., Gassner, C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion*, 2001; 41: 45-52.
58. Chiu, R. W., Murphy, M. F., Fidler, C., Wainscoat, J. S., Lo, Y. M. Technical optimization of RhD zygosity determination by real-time quantitative polymerase chain reaction: implication for fetal RhD status determination

- by maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci*, 2001; 945: 156-160.
59. Krog, G. R., Clausen, F. B., Dziegiel, M. H. Quantitation of RHD by real-time polymerase chain reaction for determination of RHD zygosity and RHD mosaicism/chimerism: an evaluation of four quantitative methods. *Transfusion*, 2007; 47: 715-722.
 60. Pertl, B., Pieber, D., Panzitt, T., Haeusler, M. C., Winter, R., Tului, L., Brambati, B., Adinolfi, M. RhD genotyping by quantitative fluorescent polymerase chain reaction: a new approach. *BJOG*, 2000; 107: 1498-1502.
 61. Wagner, F. F., Flegel, W. A. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*, 2000; 95: 3662-3668.
 62. Perco, P., Shao, C. P., Mayr, W. R., Panzer, S., Legler, T. J. Testing for the D zygosity with three different methods revealed altered Rhesus boxes and a new weak D type. *Transfusion*, 2003; 43: 335-339.
 63. Grootkerk-Tax, M., Ait Soussan, A. et al. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion*, 2006; 46: 2142-2148.
 64. Rouillac-Le Sciellour, C., Sérazin, V. et al. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD[®]. *Transfus Clin Biol*, 2007; 14: 572-577.
 65. Conroy, M. J., Bullough, P. A., Merrick, M., Avent, N. D. Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. *Br J Haematol*, 2005;131:543-551.
 66. Westhoff, C. M., Wylie, D. E. Transport characteristics of mammalian Rh and Rh glycoproteins expressed in heterologous systems. *Transfus Clin Biol*, 2006; 13:132-138.
 67. Matasi, G., Cherif-Zahar, B., Pesole, G., Raynal, V., Cartron, J. P. The members of the RH gene family (TH50 and RH30) followed different evolutionary pathways. *J Mol Evol*, 1999; 48:151-159.
 68. Dahl, K. N., Westhoff, C. M., Discher, D. E. Fractional attachment of CD47 (IAP) to the erythrocyte cytoskeleton and visual colocalization with Rh protein complexes. *Blood*, 2003; 101:1194-1199.

Otros sistemas de grupos sanguíneos y otros antígenos no incluidos en sistemas

EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ*

NÚRIA NOGUÉS **

ROSA MONTERO ***

CARMEN CANALS SURÍS****

Sistemas Kell y Kx

Genes y antígenos

El **sistema Kell** está constituido por treinta y cinco antígenos numerados del 1 al 38, de los que tres han sido considerados obsoletos (Tabla1). Todos estos antígenos se localizan en una proteína integral de membrana eritrocitaria de Pm 93000.¹⁻⁸ Las características estructurales y la secuencia de la proteína Kell es homóloga a la de las endopeptidasas zinc-dependientes que intervienen en el procesamiento de diversas hormonas peptídicas. La función de esta proteína no se conoce plenamente, pero parece

* Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España.
emuniz@bst.cat

** Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España.
nnoques@bst.cat

*** Diplomado en Enfermería. Coordinadora del Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. rmontero@bst

**** Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España.
ccanals@bst.cat

Tabla 1. Relación de los antígenos eritrocitarios incluidos en los treinta y tres sistemas de grupos sanguíneos

Sistema	Número de antígeno																																					
001	A	B	A,B	A1	...	U	He	Mi ^a	M ^a	Vw	Mur	M ^a	Vr	M ^a	Mt ^a	St ^a	Ri ^a	Cl ^a	Ny ^a	Hut	Hil	M ^a	Far	S ^o	Mt	Dantu	Hop	Nob	En ^a	En ^a KT	N ^a	*						
002	MNS	M	N	S	...	S	U	He	Mi ^a	M ^a	Vw	Mur	M ^a	Vr	M ^a	Mt ^a	St ^a	Ri ^a	Cl ^a	Ny ^a	Hut	Hil	M ^a	Far	S ^o	Mt	Dantu	Hop	Nob	En ^a	En ^a KT	N ^a	*					
003	P1PK	P1	...	P ^a	NOR	...	U	He	Mi ^a	M ^a	Vw	Mur	M ^a	Vr	M ^a	Mt ^a	St ^a	Ri ^a	Cl ^a	Ny ^a	Hut	Hil	M ^a	Far	S ^o	Mt	Dantu	Hop	Nob	En ^a	En ^a KT	N ^a	*					
004	RH	D	C	E	c	e	f	Ce	C ^a	C ^a	C ^a	V	E ^a	G	Hr ^a	Hr ^a	Vs	C ^o	CE	D ^a	c like	ce	hr ^a	Rh29	Go ^a	*					
005	LU	Lu ^a	Lu3	Lu4	Lu5	Lu6	Lu7	Lu8	Lu9	Lu11	Lu12	Lu13	Lu14	...	Lu16	Au ^a	Au ^a	Lu20	Lu21	LURC				
006	KEL	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Ku	J ^a	J ^b	J ^b	Uf ^a	K11	K12	K13	K14	K16	K17	K18	K19	Km	Kp ^a	K22	K23	K24	VLAN	TOU	RAZ	VONG	KALT	KTIM	*						
007	LE	Le ^a	Le ^b	Le ^{ab}	Le ^{ab}	Le ^{ab}	Le ^{ab}	Le ^{ab}	Le ^{ab}			
008	FY	Fy ^a	Fy ^b	Fy3	...	Fy5	Fy6			
009	JK	Jk ^a	Jk ^b	Jk3		
010	DI	Di ^a	Di ^b	Wf ^a	Wf ^b	Wg ^a	Wg ^b	WARR	ELO	WU	Bp ^a	Mb ^a	Hg ^a	Vg ^a	Sw ^a	BOW	NFLD	KREP	Tr ^a	Ff ^a			
011	YT	Yt ^a	Yt ^b		
012	XG	Xg ^a	Xg ^b	CD99		
013	SC	Sc1	Sc2	Sc3	Rd	STAR	SCER	SCAN		
014	DO	Do ^a	Do ^b	Gy ^a	Gy ^b	DoVA	DOMR	DOLG	
015	CO	Co ^a	Co ^b	Co3	Co4
016	LW	LW ^a	LW ^b	
017	CH/RG	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	Ch6	WH	
018	H	H	
019	XK	Kx	
020	GE	...	Ge2	Ge3	Ge4	Wb	Ls ^a	An ^a	DR ^a	GEIS	GEPL	GEAT	GETI	
021	CROM	Cr ^a	Tc ^a	Tc ^b	Tc ^c	Dr ^a	Es ^a	IFC	WES ^a	UMC	GUTI	SERF	ZENA	CROV	CRAM	CROZ	CRAG		
022	KN	Kn ^a	Kn ^b	MC ^a	SJ1	Yk ^a	Mc ^b	SJ2	SJ3	KCAM	
023	IN	In ^a	In ^b	INFI	INJA	
024	OK	OK ^a	OKV	OKVM	
025	RAPH	MER2	
026	JMH	JMH	JMHK	JMHL	JMHG	JMHM	JMHQ	
027	I	I	
028	GLOB	P	
029	GIL	GIL	
030	RHAG	Dudios	Oi ^a	DSLK	RHAG4	
031	FORS	FORS1	
032	JR	Jr ^a	
033	LAN	Lan	

Sistema	Número de antígeno																																																
031	DANE	TSEN	MINY	MUT	SAT	ERIK	OS ^a	ENEP	ENEH	HAG	ENAV	MARS	ENDA	ENEY	MNTD	032	DANE	TSEN	MINY	MUT	SAT	ERIK	OS ^a	ENEP	ENEH	HAG	ENAV	MARS	ENDA	ENEY	MNTD	033	DANE	TSEN	MINY	MUT	SAT	ERIK	OS ^a	ENEP	ENEH	HAG	ENAV	MARS	ENDA	ENEY	MNTD		
*002	MNS	Or	hr ^a	Rh32	Rh33	Hr ^a	Rh35	Be ^a	Evans	...	Rh39	Tar	Rh41	Rh42	Frawford	Nou	Riv	Sec	Dav	JAL	STEM	FPTT	MAR	BARC	JAHK	DAK	LOCR	CENR	CEST	CELO	DEAG	PARG	CEVF	034	DANE	TSEN	MINY	MUT	SAT	ERIK	OS ^a	ENEP	ENEH	HAG	ENAV	MARS	ENDA	ENEY	MNTD
*004	RH	hr ^a	Rh32	Rh33	Hr ^a	Rh35	Be ^a	Evans	...	Rh39	Tar	Rh41	Rh42	Frawford	Nou	Riv	Sec	Dav	JAL	STEM	FPTT	MAR	BARC	JAHK	DAK	LOCR	CENR	CEST	CELO	DEAG	PARG	CEVF	035	DANE	TSEN	MINY	MUT	SAT	ERIK	OS ^a	ENEP	ENEH	HAG	ENAV	MARS	ENDA	ENEY	MNTD	
*006	KEL	KYO	KUCI	KANT	KASH	KELP	KETI	KHUL	KYOR	...	Rh39	Tar	Rh41	Rh42	Frawford	Nou	Riv	Sec	Dav	JAL	STEM	FPTT	MAR	BARC	JAHK	DAK	LOCR	CENR	CEST	CELO	DEAG	PARG	CEVF	036	DANE	TSEN	MINY	MUT	SAT	ERIK	OS ^a	ENEP	ENEH	HAG	ENAV	MARS	ENDA	ENEY	MNTD

comportarse como una enzima activa encargada de catalizar la reacción que convierte el péptido inactivo endotelina-3 en un vasoconstrictor activo.^{9,10}

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 diecinueve exones codificantes. La producción de los diferentes antígenos está también ligada a genes pertenecientes al locus *XK* del cromosoma X.

El antígeno K se detecta con una frecuencia del 9% en norteamericanos, un 1,5% 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 (Tabla 2). El antígeno Kp^a se detecta en un 2% de individuos de raza blanca, y está ausente en la raza negra y en los japoneses, y el antígeno Kp^b es de alta frecuencia en todas las poblaciones examinadas. El antígeno Js^a parece exclusivo de la raza negra. Su frecuencia en negros americanos de origen africano es de un 16%. El antígeno Js^b es de alta incidencia en todas las poblaciones.

La mayoría de los restantes antígenos son de baja o de alta frecuencia, y su presencia o ausencia obedece a mutaciones puntuales que comportan el

cambio de un solo AA en la glicoproteína Kell.

Los antígenos K y k resultan de un cambio de base (C-->T) en el exón 6 que comporta un cambio de AA en el residuo 193 de la proteína (metionina, en los individuos K -->; treonina, en los k).

Las bases moleculares del fenotipo Kell nulo (K₀) son muy diversas, y se atribuyen a diferentes tipos de mutaciones (mutaciones puntuales, mutaciones sin sentido y mutaciones en lugares de *splicing*), en individuos en los que la mutación está presente en forma homocigota.

Los antígenos Kp^a, Kp^b y Kp^c surgen de un cambio de base en el exón 8: Kp^a TGG-->Trp281; Kp^b CGG-->Arg281; Kp^c CAG-->Gln281. Actualmente están definidas las bases moleculares de los antígenos Js^a/Js^b (KEL 6 y KEL 7), K11/K17 y del antígeno Ul^a (KEL 10).

La glicoproteína Kell está unida a través de un puente disulfuro a la proteína Xk en la que reside el antígeno Kx (XK1), el único componente del **sistema Kx**. La proteína viene codificada por el gen *XK* localizado en el cromosoma Xp21.1 (Figura 1).

El **síndrome de McLeod** es una patología ligada al cromosoma X que se presenta de forma casi exclusiva en

Tabla 2. Relación de fenotipos y frecuencia en el sistema Kell

Reacciones con anti-		Frecuencia (%)		
K	k	Fenotipo	Raza blanca	Raza negra
+	0	K+k-	0,2	Raro
+	+	K+k+	8,8	2
0	+	K-k+	91,0	98
0	0	K ₀	Muy raro	

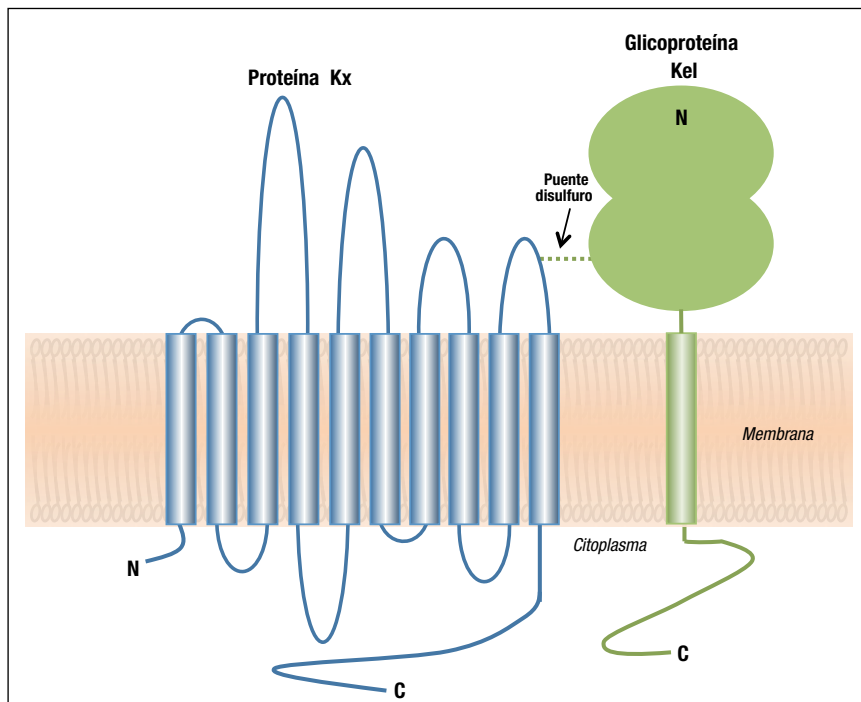


Figura 1. Glicoproteína Kell y proteína Kx, unidas por un puente disulfuro.

hombres y que se asocia a acantocitosis, a problemas musculares y a una variedad de síntomas neurológicos y psiquiátricos. Se produce por hemici-gosidad de mutaciones inactivadoras o deleciones del gen XK. El síndrome de Mcleod se asocia al fenotipo McLeod en el que la expresión de los antígenos Kell es mucho más débil y los antígenos Km (KEL20) y Kx están ausentes.

Al igual que sucede con los sistemas ABO y RH, existen individuos en los que la expresión del sistema Kell aparece deprimida por diferentes causas:

1. Existe una relación, cuyo mecanismo íntimo se desconoce, entre ciertos fenotipos Gerbich y la depresión de los antígenos Kell.
2. El alelo codificante de Kp^a induce en ocasiones una expresión débil del resto de antígenos; es posible que la presencia de Trp281 produz-

ca un cambio de conformación en la molécula que afecte a la expresión de los demás antígenos.

3. Los fenotipos K_{mod} no son más que un cajón de sastre que engloba una variedad de fenotipos Kell débiles.
4. En el síndrome de McLeod, tal como se ha comentado, la expresión de todos los antígenos Kell está deprimida, y los antígenos Km (KEL20) y Kx están ausentes.
5. El **síndrome de granulomatosis crónica** ligado al cromosoma X también se debe a una deleción del cromosoma X que incluye los genes XK y al gen responsable de esta patología.

Anticuerpos

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-Kp^b y anti-Js^b 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 enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN).¹¹ La proteína Kell se expresa en fases muy precoces del proceso de maduración eritroide, y ello permite que los anticuerpos anti-K puedan inhibir la eritropoyesis y provocar una anemia aplásica que puede superar al componente hemolítico de la anemia fetal.

Los individuos de fenotipo K₀ (Kell nulo) pueden producir un anticuerpo de especificidad anti-Ku (anti-KEL5) cuando se sensibilizan, y éste aglutina todos los hematíes, excepto los de otros individuos de fenotipo idéntico.

Los individuos con síndrome de McLeod y enfermedad granulomatosa crónica, cuando se sensibilizan producen un anticuerpo anti-Kx más anti-Km que hace prácticamente inviable encontrar hematíes de idéntico fenotipo para la transfusión. Por esta razón la indicación de transfundir a niños con estas patologías debe ser valorada con mucha cautela a fin de evitar su sensibilización.

Sistema Duffy (Fy)

Genes y antígenos

El **sistema Fy** está constituido por cinco antígenos: Fy^a, Fy^b, Fy3, Fy5 y Fy6 (Tabla 1), localizados en una glicoproteína codificada por el gen *Duffy* o *DARC* que se localiza en el cromosoma 1. Tiene un Pm de 35-45 kD y está constituida por un total de 338 AAs (Figura 2).

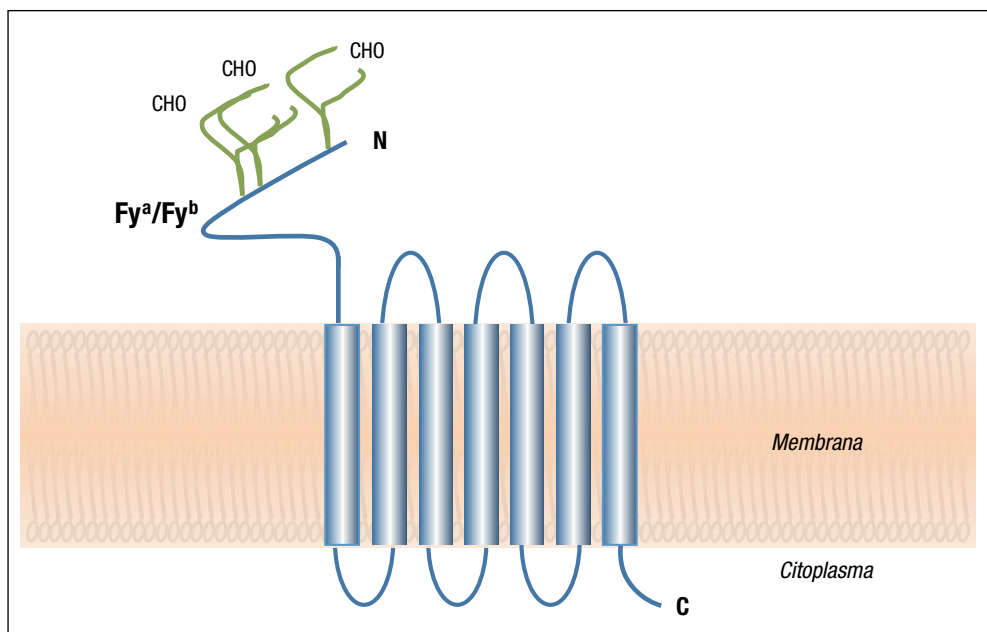


Figura 2. Glicoproteína Duffy, DARC. CHO= Carbohidrato.

En los individuos de raza caucásica y asiática los antígenos más comunes son Fy^a y Fy^b , que se combinan y dan lugar a tres posibles fenotipos; y en los individuos de origen africano existe un alelo adicional, Fy , que origina un cuarto fenotipo, $Fy(a-b-)$ (Tabla 3).

El polimorfismo Fy^a/Fy^b , que se encuentra tanto en individuos de raza blanca como de raza negra, resulta de un cambio de base que da lugar a la presencia del AA glicina en el residuo 44 de la proteína Fy^a y de aspártico en la proteína Fy^b .

La región codificante del alelo Fy es idéntica a la del alelo Fy^b ; en cambio los individuos con fenotipo $Fy(a-b-)$ carecen de este antígeno en sus hematíes. Tournaville y col.¹² encontraron una mutación en el gen *Duffy* de las personas con este fenotipo, situada en la región promotora del gen, a una distancia de 41 nucleótidos del inicio de la transcripción. Esta mutación afecta a una secuencia consensus para la unión de los factores de transcripción GATA, de tal manera que impide la unión del factor de transcripción específico eritroide GATA-1 y, en definitiva, no resulta posible la expresión del producto génico en los hematíes, aunque sí en otros tejidos de nuestro organismo. Esto expli-

ca por qué cuando estos individuos se sensibilizan lo hacen desarrollando un anti- Fy^3 y no un anti- Fy^b . El fenotipo $Fy(a-b-)$ en la raza negra oscila entre el 70% en americanos de origen africano y el 100% en Gambia. Aunque infrecuente, este fenotipo también se ha descrito en individuos de raza caucásica. En este caso la mutación responsable difiere de la propia de la raza negra, y el resultado es la ausencia de la proteína Duffy en los hematíes y en todos los tejidos del organismo. En un estudio realizado en España se verificó que un 2,4% de los donantes de sangre analizados presentaban la mutación responsable del fenotipo $Fy(a-b-)$.¹³

El alelo Fy^x , responsable de un antígeno Fy^b débil, se debe a una mutación adicional sobre la secuencia del alelo Fy^b (265C>T). La incidencia de este fenotipo Fy^b débil en población de raza blanca oscila entre 2% y 3%.

La glicoproteína Duffy actúa como receptor de múltiples quimiocinas, incluida la interleucina-8, por lo que se le atribuye un papel en el curso de la cascada inflamatoria. Además, en los hematíes actúa como receptor para *Plasmodium vivax* y *Knowlesi*, responsables de la malaria, una infección ampliamente difundida en el continente africano.

Tabla 3. Polimorfismos del Sistema Duffy y frecuencia de los diferentes genotipos en la población africana y europea

Europeos			Africanos	
Fenotipo	Genotipo	Frecuencia	Genotipo	Frecuencia
$Fy(a+b+)$	Fy^a/Fy^a	20%	Fy^a/Fy^a o Fy^a/Fy	10%
$Fy(a+b+)$	Fy^a/Fy^b	48%	Fy^a/Fy^b	3%
$Fy(a-b+)$	Fy^b/Fy^b	32%	Fy^b/Fy^b o Fy^b/Fy	20%
$Fy(a-b-)$	Fy/Fy	Muy raro	Fy/Fy	67%

Los hematíes de fenotipo Fy(a-b-) y, por tanto, carentes de la glicoproteína Duffy, son resistentes a la invasión de este tipo de *Plasmodium*. La ausencia de esta glicoproteína no sólo no es esencial para la vida, sino que la mutación detectada en esta raza representa una ventaja selectiva en las áreas donde la malaria terciaria es endémica.^{14,15}

Anticuerpos

Anti-Fy^a es hasta veinte veces más común que anti-Fy^b. El resto de posibles aloanticuerpos son muy poco comunes. Son predominantemente IgG1 y, en ocasiones, fijadores de complemento. Ambos anticuerpos pueden producir reacciones transfusionales hemolíticas inmediatas y retardadas, en general de carácter moderado, así como EHRN que puede oscilar entre formas clínicas moderadas y graves.¹¹

Anti-Fy3 es uno de los anticuerpos desarrollados por los individuos de fenotipo Fy(a-b-) y, a diferencia de anti-Fy^a y anti-Fy^b, es resistente a la acción

de proteasas. Anti-Fy5 también puede ser producido por los individuos de fenotipo Fy(a-b-) y más concretamente por los de raza negra repetidamente transfundidos. A diferencia de anti-Fy3 no reacciona con las células Rh_{null}. No se conoce la causa de esta asociación entre las proteínas Rh y Duffy. Anti-Fy3 ha producido reacciones transfusionales inmediatas y retardadas, y anti-Fy 5, reacciones retardadas.

Sistema Kidd (Jk)

Genes y antígenos

El **sistema Kidd** está constituido por tres antígenos (Jk^a, Jk^b y Jk3) que se corresponden con tres alelos producidos por el gen *SLC14A1 (JK)* localizado en el cromosoma 18. La proteína resultante es de varios pasos, en la que se localizan los diversos antígenos Jk y el transportador eritrocitario de urea (Tabla 1 y Figura 3). Los antígenos codominantes Jk^a y Jk^b resultan de un polimorfismo del gen *HUT11* consistente en un cam-

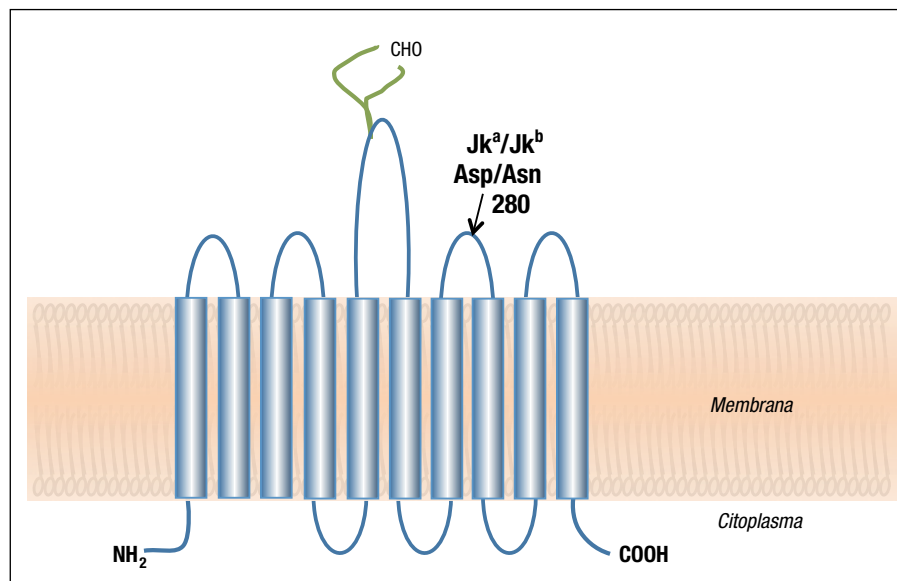


Figura 3. Glicoproteína Kidd (CHO= carbohidrato)

bio de base en la secuencia de DNA que determina un cambio de AA en la posición 280 (Asp/Asn) de la proteína.¹⁻⁸ La frecuencia de ambos antígenos es muy similar en las poblaciones caucásica y asiática; sin embargo, Jk^a es mucho más frecuente en africanos.

El fenotipo Jk (a-b-) es muy raro y se debe a la presencia en estado homocigoto de un alelo silente, *Jk*, en el locus *JK*, o bien a la herencia de un gen dominante inhibidor *In (Jk)*, independiente del locus *JK*. Los hematíes Jk (a-b-) son resistentes a la lisis inducida por la urea y muestran un defecto selectivo en el transporte de urea (Tabla 4).¹⁶ En la Polinesia, el fenotipo nulo puede llegar a detectarse en uno de cada cuatrocientos individuos. Curiosamente, en Finlandia la prevalencia del fenotipo Kidd nulo es superior a la del resto de poblaciones caucásicas, y con una base molecular claramente diferenciada (mutación puntual) de la que produce el mismo fenotipo en polinesios (mutación en un lugar de *splicing*).¹⁷

Anticuerpos

Anti-Jk^a es más común que anti-Jk^b. Suelen ser de clase IgG, IgG1 e IgG3,

y hasta un 50% son fijadores de complemento, por su componente IgG3. La detección de estas especificidades en ocasiones resulta complicada debido a su efecto de dosis que hace reaccionar a los anticuerpos exclusivamente con las células en las que el antígeno se encuentra en estado homocigoto, o bien a su presencia en una concentración prácticamente indetectable relacionada con su rápida tendencia a disminuir hasta casi desaparecer. Pueden producir reacciones hemolíticas inmediatas muy graves, y también reacciones retardadas relacionadas con su peculiar tendencia a caer a niveles indetectables. Por el contrario, raramente producen EHRN.¹¹

Los individuos con fenotipo nulo, Jk(a-b-), desarrollan un anti-Jk3 cuando se inmunizan, y también pueden producir reacciones hemolíticas inmediatas y retardadas.

Sistema MNS

Genes y antígenos

El sistema MNS está constituido por cuarenta y seis antígenos (Tabla 1). Los

Tabla 4. Distribución de los diferentes fenotipos del sistema Kidd en población caucásica y en un grupo de 197 donantes de sangre españoles

Reacciones con anti-				Frecuencia (%)	
Jk ^a	Jk ^b	Fenotipo	Genotipo	Caucásicos en general	Españoles
+	0	Jk (a+b-)	<i>Jk^aJk^a</i>	26	26
+	+	Jk (a+b+)	<i>Jk^aJk^b</i>	51	50
0	-	Jk (a-b+)	<i>Jk^bJk^b</i>	23	24
0	0	Jk (a-b-)	<i>Jk nulo</i>	Muy raro	

genes *GYPA* y *GYPB* están íntimamente relacionados en el cromosoma 4 y codifican para las glicoforinas respectivas GPA y GPB. Ambas son sialoglicoproteínas de un solo paso y en ellas se expresan los antígenos M y N (GPA) y Ss (GPB), respectivamente^{1-8,18} (Tabla 5). Las bases moleculares de este sistema son muy complejas. El gen *GYPA* tiene varias posiciones polimórficas que según la secuencia nucleotídica determinan la expresión del antígeno M o N. Concretamente, el alelo que codifica para el antígeno N presenta los siguientes cambios respecto al alelo M: 59C>T; 71G>A; 72T>G. En cuanto al gen *GYPB*, presenta una única posición polimórfica que distingue los alelos S y s (143C>T).

Los antígenos M (MNS1) y N (MNS2) son antitéticos y polimórficos en todas las poblaciones estudiadas, al igual que los antígenos S (MNS3) y s (MNS4) (Tabla 5).

La complejidad de este sistema radica en que los genes que codifican para estas dos proteínas son altamente homólogos, lo que favorece los fenómenos de recombinación entre ambos con la consiguiente formación de numerosos alelos híbridos. Algunos antígenos

de baja incidencia, pero clínicamente significativos, son precisamente fruto de estas recombinaciones, como el antígeno GP.Mur (MNS10) (antes Mi.III), cuya frecuencia en algunas poblaciones orientales llega a ser de un 7% en China y hasta de un 10% en Tailandia.

El antígeno U se encuentra en los hematíes de todos los individuos de raza caucásica y en aproximadamente un 99% de los de raza negra. Los individuos U negativo son, con pocas excepciones, S-s- y carecen de la GPB, o poseen una GPB alterada.

La GPA se expresa únicamente sobre los hematíes, por lo que es utilizada como un marcador exclusivo de línea eritroide.

Anticuerpos

Anti-M es un aloanticuerpo relativamente frecuente que puede ser de clase IgM (a menudo “natural”) o IgG. Habitualmente no es activo a 37 °C, pero en los casos en que sí es reactivo a esta temperatura puede ocasionar una reacción transfusional hemolítica aguda y retardada. Aunque muy poco habitual, anti-M también ha sido implicado en la EHRN.

Tabla 5. Fenotipos y frecuencias en el sistema MNS

Reacciones con anti-				Frecuencia (%)		
M	N	S	s	Fenotipo	Raza blanca	Raza negra
+	0			M+N-	28	26
+	+			M+N+	50	44
0	+			M-N+	22	30
		+	0	S+s-	11	3
		+	+	S+s+	44	28
		0	+	S-s+	45	69

Anti-N es muy poco común y carece de trascendencia clínica.

Anti-S y anti-s son habitualmente de clase IgG y activos a 37 °C, por lo que pueden ocasionar reacciones hemolíticas y EHRN de carácter grave.

Anti-U es muy poco común, y habitualmente contiene la fracción IgG1. Se han descrito casos de reacciones transfusionales hemolíticas fatales y de EHRN grave, debidos a este anticuerpo.¹¹

Anti-Mur puede producir reacciones hemolíticas graves y EHFRN. En Hong Kong y Taiwan, anti-Mur es el anticuerpo más común después de anti-A y anti-B.

Sistema Lutheran

Está constituido por veinte antígenos (Tabla 1), incluyendo cuatro pares de antígenos antitéticos que resultan de mutaciones puntuales del gen Lutheran o *BCAM*. Originalmente fue descrito como un sistema con un “locus” y dos alelos, Lu^a y Lu^b , que darían lugar a las combinaciones fenotípicas habituales (Tabla 6). La base molecular de estos dos antígenos antitéticos es un cambio nucleotídico (230GA) en la secuencia del gen *LU*, que comporta a su vez un cambio de aminoácido (Arg77His). La frecuencia génica del alelo que codifica para el antígeno Lu^a

Tabla 6. Relación de fenotipos y frecuencia en los sistemas Lutheran (Lu), Cartwright (Yt), Colton (Co), Dombrock (Do)

Sistemas	Reacciones con anti-		Fenotipo	Frecuencia (%) raza blanca
	Lu^a	Lu^b		
Lu	+	0	Lu (a+b-)	0,15
	+	+	Lu (a+b+)	7,5
	0	+	Lu (a-b+)	92,35
	0	0	Lu (a-b-)	Muy raro
Yt	Yt^a	Yt^b		
	+	0	Yt (a+b-)	91,9
	+	+	Yt (a+b+)	7,9
Co	0	+	Yt (a-b+)	0,2
	Co^a	Co^b		
	+	+	Co (a+b-)	89,3
	+	+	Co (a+b+)	10,4
Do	0	+	Co (a-b+)	0,3
	0	0	Co (a-b-)	Muy raro
	Do^a	Do^b		
	+	0	Do (a+b-)	17,2
Do	+	+	Do (a+b+)	49,5
	0	+	Do (a-b+)	33,3

es de 0,035, y la del alelo que codifica para Lu^b, de 0,96, por lo que este último se considera un antígeno de alta frecuencia.^{1-8,19}

Las glicoproteínas Lutheran son un par de isoformas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. No se conoce bien la función de estas glicoproteínas, aunque sí se sabe que se unen a la laminina de la matriz extracelular.

El mayor interés del sistema Lutheran radica en el fenotipo Lu (a-b-), también conocido como In (Lu). Este fenotipo, heredado con carácter dominante, se ha asociado durante mucho tiempo a un gen inhibidor (*In*) que inhibía al mismo tiempo el sistema P, el antígeno i y el sistema Auberger. Hoy en día se conoce que la causa del fenotipo Lu (a-b-) son mutaciones en el gen que codifica para el factor EKLF (erythroid Krüppel-like factor), un factor de transcripción que resulta crítico para la expresión de diversos genes en los eritrocitos.

Los antígenos del sistema Lutheran no están bien desarrollados en el momento de nacer.

El anti-Lu^a es poco común y rara vez clínicamente significativo. Por el contrario, anti-Lu^b puede ocasionar hemólisis intravascular.

Sistema Cartwright (Yt)

Comprende un par de antígenos anti-téticos, Yt^a y Yt^b (His353Asn), que se expresan en una enzima acetilcolinesterasa que se une a la membrana eritrocitaria a través de una molécula GPI¹⁻⁸ (Tabla 6). No se han descrito casos de fenotipo nulo, lo que probablemente

refleja la importancia de la acetilcolinesterasa en neurotransmisión.

Se han descrito algunos ejemplos de anti-Yt^a con capacidad para producir reacción hemolítica, pero en general no son clínicamente significativos ni en transfusión ni en relación con la EHFRN.

Sistema Colton

El antígeno Co^a (Ala45) es un antígeno de alta incidencia, y Co^b (Val145), su antitético, presenta una frecuencia en caucásicos del 8%, y algo inferior en otras etnias (Tabla 6). Se expresan en una proteína transportadora de agua (Aquaporina 1 o CHIP-1).¹⁻⁸

Los anticuerpos de especificidad anti-Co^a y el más raro, anti-Co^b, han estado implicados en reacciones hemolíticas graves y EHRN. Anti-Co3 es el anticuerpo producido por los individuos de fenotipo Colton nulo. Recientemente se han descrito varios ejemplos de fenotipo Colton nulo en mujeres de etnia gitana residentes en diversos países de Europa, todas ellas con una base molecular común responsable del fenotipo nulo.²⁰

Sistema Dombrock

Este sistema incluye ocho antígenos, además de un par de antígenos anti-téticos, los antígenos Do^a (DO1) y Do^b (DO2) (Asn265Asp) (Tabla 1 y Tabla 6). La estructura de la proteína Dombrock (unida a la membrana por moléculas fosfatidilinositol) es propia de una ADP-ribosiltransferasa.¹⁻⁸

Los anticuerpos anti-Do^a y anti-Do^b han ocasionado reacciones transfusio-

nales hemolíticas. Anti-Gy^a es el anticuerpo característico producido por los individuos de fenotipo Dombrock nulo.

Sistemas P1PK, Globósido y Forsmann

Los antígenos de estos sistemas son cadenas de carbohidratos unidas a glicolípidos derivados de lactosilceramida (Gal-Glc-ceramida). Los tres sistemas representan tres genes que codifican para tres glicosiltransferasas distintas (Tabla 1).

El antígeno P (GLOB1), que originalmente formaba parte de la colección Globósido junto con los antígenos P^k y LKE, pasó a constituir el sistema GLOB cuando, en 2002, se establecieron sus bases moleculares.²¹

Recientemente,²² también se han descrito las bases moleculares del an-

tígeno P1 que han puesto de manifiesto su estrecha relación con el antígeno P^k. Esta observación ha hecho que el antígeno P^k haya pasado a formar parte del mismo sistema que el antígeno P1, ahora denominado sistema P1Pk (anteriormente, sistema P). Por su parte, el antígeno LKE permanece en la colección Globósido. En la Figura 4 se resume la relación entre los sistemas GLOB, P1P^k y ABH.

El antígeno P está considerado de alta incidencia en todas las poblaciones estudiadas.

El significado clínico de los anticuerpos anti-P es incierto, aunque se han relacionado con reacciones transfusionales, algunas de ellas de carácter grave, y EHRN de perfil moderado. Por su parte, el antígeno P1 está presente en aproximadamente un 80% de individuos de raza caucásica. La mayoría

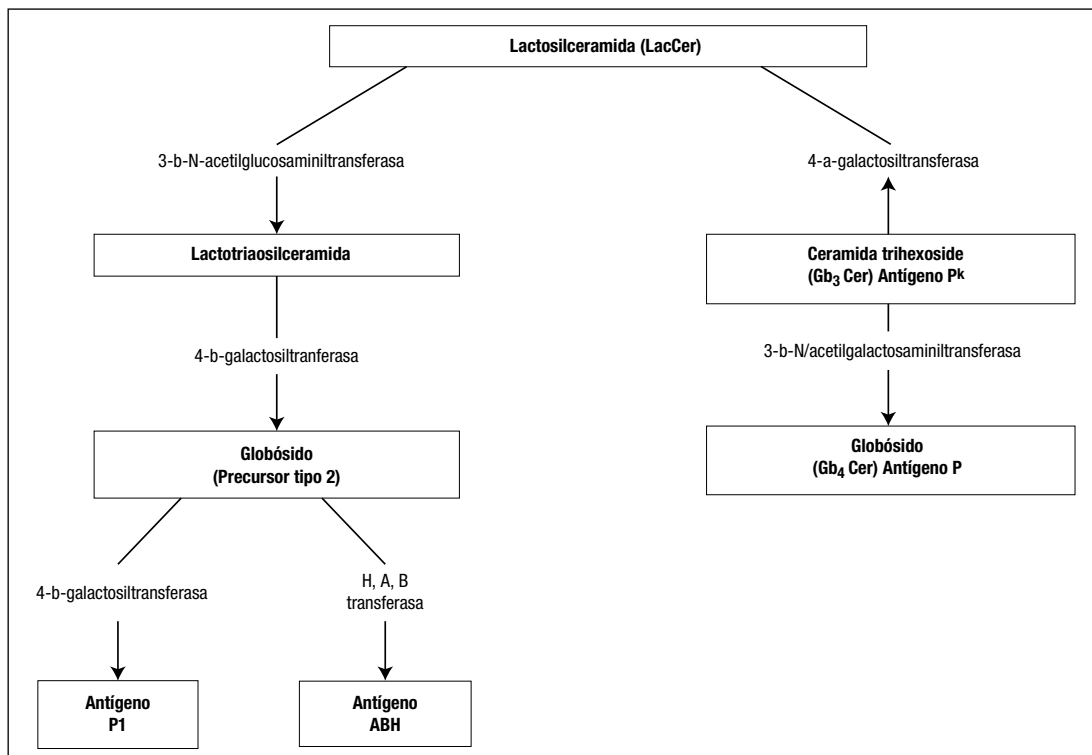


Figura 4. Relación entre los sistemas GLOB, P1P^k y ABH.

de anticuerpos anti-P1 no aglutinan los hematíes por encima de los 25 °C, por lo que no se consideran clínicamente significativos.¹¹

Relacionado con estos sistemas se encuentra el fenotipo p, que resulta de la ausencia de los antígenos P, P1 y P^k. Cuando se inmunizan estos individuos desarrollan un potente anticuerpo conocido como anti-PP1P^k, anteriormente anti-Tj^a.¹¹

Sistema Diego

Los veintidós antígenos del sistema Diego se localizan en la proteína Banda 3, o AE1, término empleado para denominar a una proteína que actúa como intercambiador de aniones en los hematíes (Figura 5). Está considerada una de las glicoproteínas mayores de

la membrana, con un número de copias por hematíe muy elevado, del orden de 10.⁶ Tiene dos funciones, como mínimo: la de intercambio de aniones y transporte de CO₂, y la de elemento de sostén o de integridad de la célula, anclando la membrana al citoesqueleto.^{1-8,22} Los tetrámeros de la Banda 3 forman parte del núcleo de macrocomplejo de proteínas de membrana eritrocitaria (Banda3/Rh/Ankyrina) que también incluye las proteínas Rh, RhAG, Glicoforinas A y B, la glicoproteína LW (ICAM-4) y CD47. A la vez forma parte de otro complejo de proteínas que contribuyen a anclar la membrana eritrocitaria al citoesqueleto a través de la glicoforina C, y que incluye las proteínas Rh y probablemente la glicoproteína Kell, Xk y la proteína Duffy (DARC) (Figura 6).

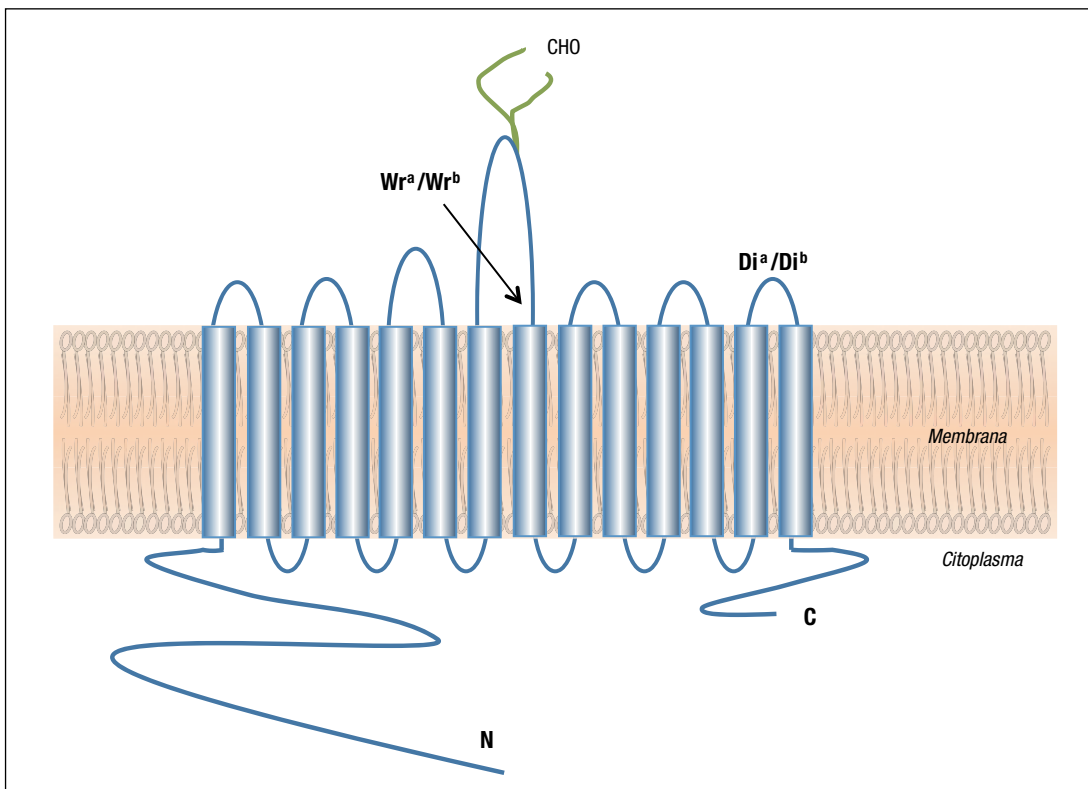


Figura 5. Glicoproteína Banda 3 y sistema Diego.

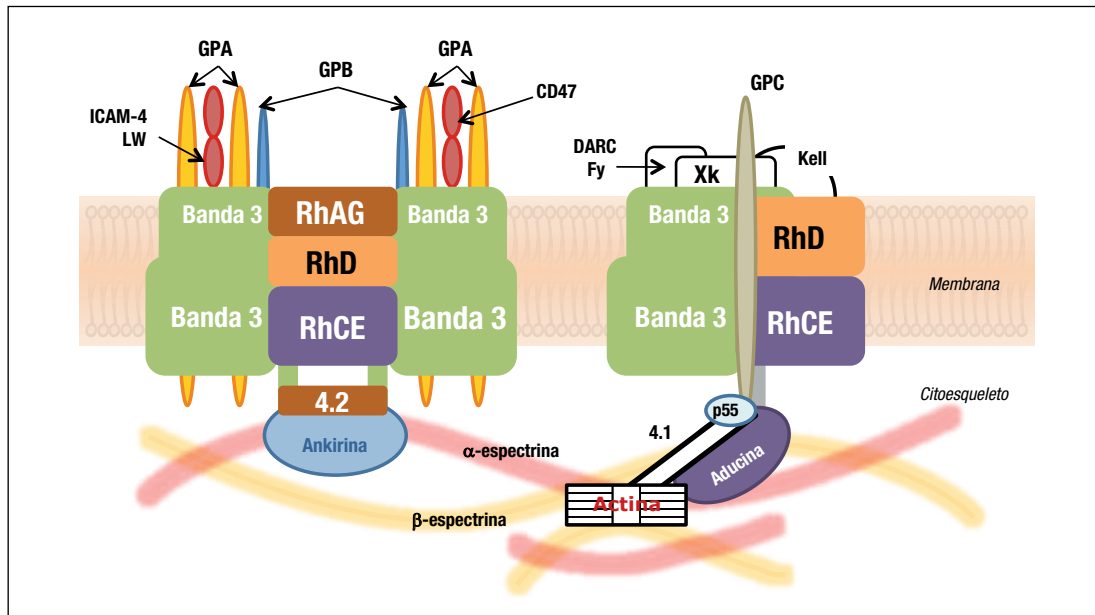


Figura 6. Proteínas del macrocomplejo Banda 3/Rh (izda) y del complejo de anclaje (dcha) en la membrana eritrocitaria y su fijación al citoesqueleto.

El gen de la Banda3, o *SLC4A1*, se localiza en el cromosoma 17.

El antígeno Di^a (Leu854) es muy poco usual en europeos y africanos, pero alcanza una frecuencia de un 5% en chinos y japoneses, y una incidencia alta en nativos del norte y sur de América, del orden de un 54% en indios brasileños. Di^b (Pro854) es un antígeno de alta incidencia en prácticamente todas las poblaciones.

Anti- Di^a y anti- Di^b son habitualmente de clase IgG1 más IgG3. Anti- Di^a puede ocasionalmente fijar complemento. En pacientes politransfundidos de Brasil se detecta hasta en un 3,6%, y puede ocasionar EHRN grave. Anti- Di^b también puede ocasionalmente producir EHRN.¹¹ Por el contrario, ninguno de los dos anticuerpos parecen causar reacciones hemolíticas.

Wr^a (DI13) (Lys658) es un antígeno de baja frecuencia, y su antitético Wr^b (DI14) (Glu658) es de alta incidencia.

La expresión de Wrb es dependiente de la presencia de la GPA.

Los anticuerpos anti- Wr^a son relativamente frecuentes, mayoritariamente de clase IgG1, pero en ocasiones pueden ser de clase IgM, o IgM más IgG. Puede producir EHRN grave y reacciones transfusionales hemolíticas. Anti- Wr^b es raro, y su significado clínico no se conoce bien; sin embargo, como autoanticuerpo es relativamente común y puede estar implicado en la anemia hemolítica autoinmune.

Los restantes antígenos, con la excepción del antígeno DISK (DI22), son de baja frecuencia.

Sistema Xg

El antígeno Xg^a (XG1) está codificado por *XG*, un gen ligado al cromosoma X que tiene una frecuencia del 66% en hombres y de 89% en mujeres. CD99 es un antígeno producido por un gen de

ambos cromosomas, X e Y. XG y CD99 son genes homólogos íntimamente relacionados y CD99 es considerado como el antígeno XG2 del sistema Xg.

Anti-Xg^a no es clínicamente significativo.^{1-8,23}

Sistema Scianna

Está constituido por siete antígenos, incluyendo una pareja de antígenos antitéticos, localizados en una proteína de adhesión de la membrana eritrocitaria (ERMAP) perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas (Tabla 1).

Los anticuerpos anti-Scianna no se han relacionado, hasta el momento, con reacciones transfusionales ni EHRN.^{1-8,24}

Sistema Landsteiner-Wiener

LW^a (LW5) y LW^b (LW7) (Gln70arg) son un par de antígenos antitéticos, de alta y baja frecuencia, respectivamente. Anti-LW^{ab} reacciona con todos los hematíes portadores del antígeno LW^{ab} (LW6), excepto con los de fenotipo LW nulo y Rh_{null} que también son LW(a-b-).

Los anticuerpos anti-LW no son, en general, clínicamente significativos. Los autoanticuerpos anti-LW pueden detectarse en la anemia hemolítica autoinmune.

La glicoproteína LW, también llamada molécula de adhesión intercelular 4 (ICAM-4), es una molécula de adhesión perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas.^{1-8,25}

Sistema Chido/Rodgers

Los nueve antígenos Chido/Rodgers no son verdaderos antígenos eritrocitarios

porque no son producidos por las células eritroides (Tabla 1). Se localizan en el cuarto componente del complemento (C4), presente originalmente en el plasma, pero que se acaba uniendo a los hematíes.^{1-8,26}

Los anticuerpos anti-Chido no son clínicamente significativos, aunque en ocasiones han sido implicados en reacciones anafilácticas después de la transfusión de plasma y derivados plasmáticos.

Sistema Gerbich

Está constituido por siete antígenos de alta incidencia y cinco de baja incidencia que se localizan en sialoglicoproteínas de las glicoforinas C (GPC) y D(GPD), o en ambas. La función de la GPC es de anclaje de la membrana al citoesqueleto.

Los anticuerpos anti-Ge no son clínicamente significativos habitualmente, pero anti-Ge3 ha producido EHRN.¹⁻⁸

Sistema Cromer

Está constituido por dieciocho antígenos, quince son de alta incidencia y tres de baja frecuencia, y residen en una glicoproteína reguladora del complemento (DAF o CD55) que se une a la membrana a través de moléculas fosfatidilinositol (Tabla 1). Los hematíes de los pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna son deficitarios en DAF y, por tanto, carecen de antígenos Cromer. El gen Cromer o *CD55* forma parte del *cluster* de genes reguladores de la activación del complemento y se localiza en el cromosoma 1q32.

Los anticuerpos anti-Cromer no suelen ser clínicamente significativos.¹⁻⁸

Sistema Knops

Los nueve antígenos Knops se localizan en una glicoproteína reguladora de complemento, el receptor-1 (CR1 o CD35), miembro de la superfamilia de proteínas reguladoras del complemento. El gen *CR1* también forma parte del *cluster* de genes que regulan la activación del complemento y se localiza en el cromosoma 1q.32.

Los anticuerpos anti-Knops no son clínicamente significativos.^{1-8,27}

Sistema Indian

Está formado por un antígeno de baja frecuencia, In^a (IN1) (Arg46), y su antitético In^b (IN2) (Pro46), más dos antígenos de alta incidencia, INFI (IN3) y INJA (IN4), respectivamente. Estos antígenos se localizan en la proteína CD44, la cual es capaz de desempeñar múltiples funciones y se une al ácido hialurónico de la matriz extracelular.

Los anticuerpos anti-Indian, por lo general no se consideran clínicamente significativos.¹⁻⁸

Sistema I

El antígeno I es el único antígeno incluido en este sistema. El producto del gen *I* (*GCNT2*) es una enzima (β 1,6-N-acetilglucosaminil-transferasa) que cataliza la unión de N-acetilactosamina y forma cadenas de polilactosaminas. Las cadenas lineales no ramificadas expresan antígeno i. Los hematíes de los

recién nacidos son I negativo y expresan intensamente antígeno i. La unión de las nuevas cadenas comporta el debilitamiento del antígeno i y un incremento de la expresión de I que alcanza su máxima expresión entre los seis y los dieciocho meses de vida. Algunos individuos, muy poco comunes, homocigotos para diversas mutaciones inactivadoras del gen *GCNT2*, nunca convierten i en I y muestran un fenotipo i que suele conducir a la producción de un aloanti-I.¹⁻⁸

Los correspondientes anticuerpos suelen ser de clase IgM y no acostumbran reaccionar a 37 °C.

En el este asiático el fenotipo i suele asociarse a cataratas congénitas, pero no es el caso de los caucásicos. Esto se debe a que las mutaciones de *GCNT2* en los individuos de fenotipo i se producen en transcritos de mRNA que expresan los tejidos hematopoyéticos y epiteliales responsables del correcto funcionamiento del cristalino, mientras que en los caucásicos las mutaciones sólo se dan en los transcritos del tejido hematopoyético.

Algunos autoanticuerpos anti-I muy potentes pueden resultar hemolíticos y causar el síndrome de aglutininas frías. Los anticuerpos con especificidad anti-i acostumbran a ser autoanticuerpos que a menudo se detectan en pacientes con mononucleosis infecciosa.¹¹

Anti-i es el único antígeno de una de las colecciones de grupos sanguíneos (Colección 207). No es parte del sistema I porque su biosíntesis no está regulada por el gen *GCNT2* y no ha sido definido por un aloanticuerpo.

Sistema Ok

Está constituido por tres antígenos, Oka (OK1), OK2 y OK3, y todos ellos son de alta incidencia. Son polimorfismos de una proteína perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas, CD147, y codificada por el gen *BSG*. Esta proteína es receptor de *Plasmodium falciparum*.

Sistema Raph

Está constituido por un solo antígeno, MER2 (RAPH1), localizado en la proteína CD151. El fenotipo MER2-nulo es raro y se asocia a insuficiencia renal, ampollas bullosas en piel y sordera neurosensorial, probablemente como resultado de la falta de interacción entre CD151 y las integrinas de las membranas basales.

Sistema JMH

Está constituido por seis antígenos (Tabla 1), localizados en la proteína llamada Semaforina 7A (CD108). El fenotipo nulo (JMH:-1) es habitualmente un fenotipo adquirido, detectado en personas por encima de los 50 años. Se han descrito variantes en individuos portadores del antígeno JMH1 que carecen de los antígenos JMH2 a JMH6.

Los anticuerpos anti-JMH no se consideran clínicamente significativos.

Sistema Gill

Está constituido por un solo antígeno, GIL1, un antígeno de alta incidencia localizado en la molécula aquaporina-3 (AQP3) que actúa como un canal para el agua y el glicerol. El fenotipo Gill

nulo se produce por homocigosidad de una mutación en un lugar de *splicing* de la AQP3.

Sistemas Junior y Langereis

Los antígenos Jr^a (JR1) y Lan (LAN1) son antígenos de alta incidencia en todas las poblaciones estudiadas, y constituyen los dos únicos elementos de sus respectivos sistemas, Junior y Langereis. Se localizan en proteínas transportadoras codificadas por los genes *ABCG2* y *ABCB6*. Los fenotipos Jr(a-) y Lan- resultan de diferentes tipos de mutaciones en sus respectivos genes.

En la península ibérica se han detectado un número importante de ejemplos de anti-Jr^a en mujeres de raza gitana portadoras de un fenotipo Jr(a-).

Anti-Jra se ha relacionado con reacciones hemolíticas inmediatas y retardadas y con EHFERN grave. Anti-Lan se ha relacionado con reacciones hemolíticas inmediatas.

Otros antígenos eritrocitarios no incluidos en sistemas

Se trata de un grupo de antígenos de alta o baja incidencia que no han podido adscribirse a ninguno de los treinta y tres sistemas de grupo sanguíneo bien definidos.¹⁻⁸

Entre los anticuerpos dirigidos contra antígenos de alta incidencia cabe señalar a anti-Vel y anti-Wj por haber causado EHRN grave. Anti-Vel resulta especialmente peligroso por tratarse de anticuerpos de clase IgM, fijadores de complemento, que pueden ocasionar reacciones transfusionales hemolíticas inmediatas de carácter muy grave.

Anti-MAM puede producir también EHRN grave.

La mayoría de anticuerpos dirigidos contra antígenos de baja frecuencia no suelen ser clínicamente significativos, con la excepción de anti-JFV, -Kg, -JONES, -HJK y -REIT que han producido EHRN.

El término Bg se emplea para referirnos a los antígenos HLA de clase I expresados en los hematíes. Bg^a corresponde a HLA-B7; Bg^b, a HLA-B17, y Bg^c, a HLA-A28 (con reacción cruzada con A2). No obstante, algunos individuos no expresan antígenos Bg en sus hematíes aunque revelen sobre linfocitos los correspondientes antígenos HLA. Su papel en las reacciones hemolíticas transfusionales, a pesar de algunas publicaciones que lo apoyan, continúa siendo incierto. El mayor problema reside en que su presencia en las muestras a estudio puede confundir en la interpretación de los resultados al obtenerse reacciones inesperadas en los paneles de identificación de anticuerpos.

Función biológica de los grupos sanguíneos

Cuando hablamos de la función biológica de los grupos sanguíneos, en realidad nos referimos a la función desempeñada por las estructuras de

membrana donde se localizan los diferentes grupos sanguíneos eritrocitarios.²⁸⁻³⁰ Los grupos sanguíneos, en realidad, no son más que polimorfismos de estas estructuras, y por el momento, la presencia de uno u otro antígeno no parece incidir directamente, salvo excepciones, en la función desarrollada por la proteína que lo alberga. Cada función no es patrimonio de una sola proteína y éstas pueden desempeñar múltiples funciones. Entre las funciones que se les atribuyen se encuentran: transportar moléculas biológicamente importantes a través de la membrana; receptor de estímulos externos y de células de adhesión; ser reguladores autólogos del complemento para evitar la destrucción de los hematíes; anclar la membrana con el citoesqueleto; y contribuir a la matriz extracelular de carbohidratos que protegen al hematíe de las lesiones mecánicas y del ataque de microorganismos. En la Tabla 7 se muestra una relación de algunas de las funciones mencionadas por diversas proteínas eritrocitarias.

A pesar del gran avance en nuestros conocimientos en torno a la función biológica de los grupos sanguíneos, todavía nos queda por conocer la razón de la aparición de los diferentes polimorfismos eritrocitarios en el curso de la evolución y su posible relación con diversas enfermedades.

Tabla 7. Funciones putativas asignadas a algunas de las proteínas de membrana donde se expresan los grupos sanguíneos eritrocitarios

Tipo de función	Grupo sanguíneo	Estructura (Producto génico)	Función concreta
Transporte/Canal	Kidd	Proteína múltiples pasos (PMP)	Transporte de urea
	Colton	PMP (CHIP-1)	Transporte de agua
	Drego	PMP (Banda 3)	Intercambio de aniones
Receptores	Duffy	PMP (DARC)	Receptor de quimiocinas/ P.Vivax
	Indian	Proteína paso único (PUP)	(CD44) Receptor de Ac. Hialurónico
Complemento	Chido/Rodgers	C4	Componente del complemento
	Cromer	GPI (DAF)	Regulador del complemento
	Knops	PUP (CD35 o CR1)	Regulador del complemento
Adhesión	LW	PUP, superfamilia de las Igs	Se liga a las integrinas, CD11/CD18
	Lutheran	PUP, superfamilia de las Igs	Puede unirse a la laminina
Enzimas	Yt	GPI (acetilcolinesterasa)	Desconocida en los hematíes
	Kell	PUP (endopeptidasa)	¿Metaloproteínasa?
Estructurales	Gerbich	PUP (Glicoforinas C y D)	Anclaje al citoesqueleto

Referencias

- Issitt, P. D., Anstee, D. J. Applied blood group serology. 4th ed. Durhan NC. Montgomery Scientific publications, 1998.
- Reid, M., Lomas-Francis, C., Olsson, M. The Blood Group Antigen Facts Book. Third ed. Facts Book Series. Elsevier. Academic Press 2012.
- Roback, J. D., Grossman, B. J., Harris, T., Hillyer, C. D. Technical Manual. 17th ed. AABB, 2011.
- Daniels, G. Human Blood Groups. 2nd ed. Blackwell Science, 2002.
- Muñiz-Díaz, E., Martín-Vega, C. Grupos sanguíneos e inmunohematología. En: Ferreras, P., Rozman, C. Medicina Interna. 16 ed. Elsevier, 2009: 1819-1827.
- ISBT Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Working Party. Disponible en: <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>
- Daniels, G., Fletcher. A., Garratty, G., Henry, S., Jorgensen, J., Judd, W. J. et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. Vox Sang, 2004; 87:304-316.
- Storry, J. R., Castilho, L., Daniel, G., Flegel, W. A., Garratty, G., Francis, C. L. et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics

- and Blood group terminology: Berlin report. *Vox Sang*, 2011; 101: 77-82.
9. Lee, S., Russo, D., Redman, C. Functional and structural aspects of the Kell blood group system. *Transfus Med Rev.*, 2000; 14(2):93-103.
 10. Lee, S., Wu, X., Reid, M., Zelinski, T., Redman, C. Molecular basis of the Kell (K1) phenotype. *Blood*, 1995; 85 (4): 912-916.
 11. Klein, H., Anstee, D. J. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 11th ed. Oxford, Blackwell Science, 2005.
 12. Tournamille, C., Le Van Kim, C., Gane, P, Cartron, J. P., Colin, Y. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/Fyb blood group polymorphism. *Hum Genet*, 1995; 95: 407-410.
 13. Muñoz-Díaz, E., Arilla, M., Martínez, C., Manteiga, R., Domeque, M., Español, M. y col. Tipificación molecular de los tres alelos mayores del sistema Duffy con una técnica de PCR-ASPA. X Congreso de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS). Madrid, 1999; 34.
 14. Meny, G. M. The Duffy blood group system: a review. *Immunohematology*, 2010; 26(2): 51-56.
 15. Langhi, D. M., Bordin, J. O. Duffy blood group and malaria. *Hematology*, 2006; 11: 389-398.
 16. Irshaid, N. M., Eicher, N. I., Hustinx, H., Poole, J., Olsson, M. L. Novel alleles at the JK blood group locus explain the absence of the erythrocyte urea transporter in European families. *Br J Haematol*, 2002; 116: 445-53.
 17. Irshaid, N. M., Henry, S. M., Olsson, M. L. Genomic characterization of the kidd blood group gene: different molecular basis of the Jk(a-b-) phenotype in Polynesians and Finns. *Transfusion*, 2000, Jan; 40(1): 69-74.
 18. Reid, M. E. MNS blood group system: a review. *Immunohematology*, 2009; 25(3): 95-101.
 19. Daniels, G. Lutheran. *Immunohematology*, 2009; 25(4): 152-159.
 20. Flesch, B., Just, B., Deitenbeck, R., Reil, A., Bux, J., Nogués, N., Muñoz-Díaz, E. The *AQP1* mutation *c.601delG* causes the Co-negative phenotype in four patients belonging to the Romani (Gypsy) ethnic group. *Blood Transfusion*, 2013 (en prensa).
 21. Thuresson, B., Westman, J. S, Olsson, M. L. Identification of a novel A4GALT exon reveals the genetic basis of the P1/P2 blood groups. *Blood*, 2010; 117(2):678-687
 22. Poole, J. The Diego blood group system. An update. *Immunohematology*
 23. Johnson, N. C. XG: the forgotten blood group system. *Immunohematology*, 2011; 27(2): 68-71.
 24. Lewis, M., Kaita, H., Chown, B. Scianna blood group system. *Vox Sanguinis*, 2009; 27(3): 261-264.
 25. Grandstaff Moulds, M. K. The LW blood group system: a review. *Immunohematology*, 2011; 27(4) 136-142.
 26. Mougey, R. A review of the Chido/Rodgers blood group. *Immunohematology*, 2010; 26(1):30-38.
 27. Moulds, J. M. The Knops blood group system: a review. *Immunohematology*, 2010; 26(1): 2-7.
 28. Cartron, J. P. Groupes sanguins et relation structure-fonction. En: *Bases moléculaires des antigènes des groupes sanguins*. Cartron JP, Rouger Ph, eds. Masson (Paris), 1998: 473-509.
 29. Daniels, G. Functional aspects of red cell antigens. *Blood Rev*, 1999; 13: 14-35.
 30. Reid, M., Mohandas, N. Red Blood cell Blood group antigens: structure and function. *Seminars Hematol*, 2004; 41(2): 93-117.

Anticuerpos eritrocitarios y su significado clínico

MARCELA CONTRERAS*

Anticuerpos eritrocitarios en general y sus propiedades biológicas

Los anticuerpos se denominan dependiendo del estímulo original: (i) anticuerpos de ocurrencia natural, producidos en ausencia de un estímulo reconocido; (ii) aloanticuerpos, producidos por un individuo contra epítopos de antígenos presentes en otro individuo de la misma especie; (iii) autoanticuerpos, reaccionan con determinantes antigénicos propios del individuo; y (iv) xenoanticuerpos (o heteroanticuerpos), contra determinantes antigénicos presentes en una especie diferente. Los primeros tres tipos los encontramos de rutina en el laboratorio de inmunohe-

* MD, FRCPath, FRCP, FMedSci, DBE. Chairman of Blood Transfusion International. Londres, Reino Unido. prof.mcontreras@gmail.com

matología en las pruebas pretransfusionales, y pueden causar destrucción inmune de eritrocitos. Xenoanticuerpos producidos en animales contra antígenos humanos se pueden usar como sueros antiglobulina o reactivos tipificadores.

Los anticuerpos importantes clínicamente, con especificidad para antígenos de grupos sanguíneos, se encuentran sólo en las clases IgG e IgM. Los aloanticuerpos IgA son raros y juegan un rol menor, ya que siempre se acompañan de IgG y/o IgM.

La Figura 6 del Capítulo 1 muestra la estructura básica de las inmunoglobulinas, consistente en cuatro cadenas polipeptídicas: dos livianas (L) y dos pesadas (H). Las moléculas IgG e IgA séricas son monómeros de esta estructura básica; las moléculas IgM son pentámeros.

La papaína disocia la molécula básica de Ig en tres fragmentos (Figura 6, Capítulo 1). Un fragmento contiene los terminales C de las cadenas pesadas y se denomina Fc; los otros fragmentos, denominados Fab, son iguales entre sí y consisten en los terminales N de las cadenas pesadas y en la cadena liviana completa; contienen el sitio de unión al antígeno.

Las inmunoglobulinas son esencialmente multifuncionales; a la vez de unirse específicamente al antígeno correspondiente, poseen otras funciones dependiendo de su clase (Tabla 1). La mayoría de estas funciones adicionales reside en el fragmento Fc y las más importantes son: (a) fijación del complemento (IgM > IgG3 > IgG1 > IgG2); la IgA no fija complemento de modo clásico; (b) unión a los receptores Fc de las células mononucleares fagocíticas (sólo IgG;

IgG3 > IgG1); y (c) pasaje transplacentario: propiedad exclusiva de las IgG; la IgG1 posee transporte activo preferencial respecto a las otras subclases.

Las funciones biológicas son adscritas a determinados dominios de las moléculas de Ig. Por ejemplo, C_H2 o C_H2/C_H3 para unión al Clq del complemento, una vez que el anticuerpo se ha unido a su antígeno; la región de bisagra (*hinge*) de las IgG se une activamente a los receptores Fc de macrófagos y monocitos (Figura 1), siendo esta unión independiente de la unión de la IgG al antígeno; C_H2 + C_H3 de las IgG se unen a los receptores Fc del sincitiotrofoblasto placentario. Estas funciones contribuyen al significado clínico de los anticuerpos eritrocitarios. En la mayoría de los casos, la unión antígeno-anticuerpo no causa en sí la destrucción de los eritrocitos; la hemólisis es generalmente una consecuencia de estas funciones efectoras secundarias. Como únicamente la IgG puede cruzar la barrera placentaria, sólo los anticuerpos IgG pueden causar enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (EHFRN) y, como ya se dijo, sólo las IgG1 e IgG3 median la destrucción significativa de eritrocitos.

Anticuerpos de grupos sanguíneos

Varios términos han sido usados para describir los diferentes tipos de anticuerpos contra grupos sanguíneos. Estos son: (i) de ocurrencia natural e inmunes; (ii) calientes y fríos; (iii) completos, o de reacción en salino, (IgM) e incompletos (IgG).

Los anticuerpos “de ocurrencia natural” se producen sin ningún estímulo

Tabla 1. Funciones efectoras de las inmunoglobulinas

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM
Fijación del complemento: vía clásica	+	(+)	++	-	++++
Pasaje transplacentario	++	+	+	+	-
Unión a los receptores FcR de monocitos/ macrófagos	++	-	+++	-	-
Unión a la proteína A del <i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	+	-

Moléculas de IgG fijan complemento sólo hasta C3.

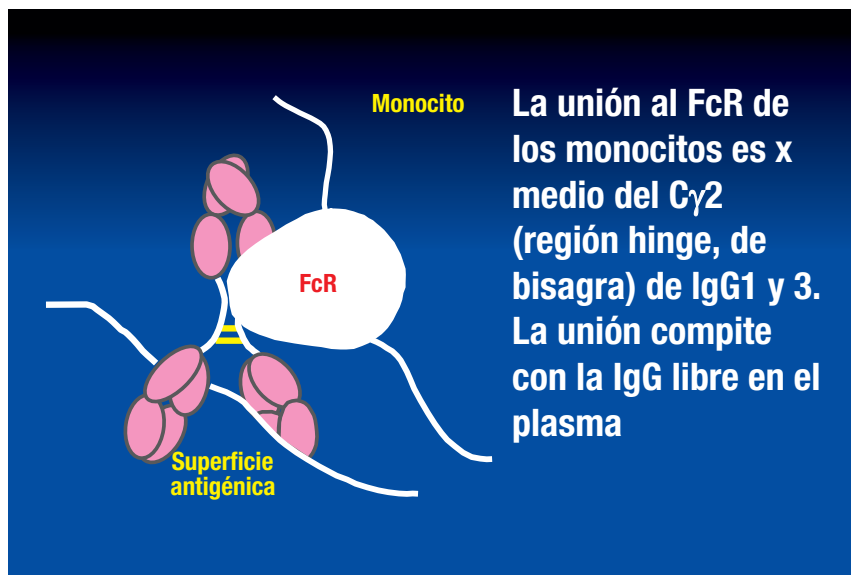


Figura 1. Unión de eritrocito recubierto de IgG1 y/o IgG3 a los receptores Fc de células fagocíticas mononucleares. Esta unión compite con la abundante IgG libre en el plasma.

lo inmunizante evidente, tales como transfusión, embarazo, trasplante o inyección de sangre; no están presentes al nacer y, en el caso de anti-A y anti-B, empiezan a aparecer a los 3-6 meses de edad, probablemente en respuesta a antígenos de bacterias, virus y otras sustancias inhaladas o ingeridas. Los anticuerpos “inmunes” o aloanticuerpos se producen solamente después de transfusión, embarazo, trasplantes o inyección de sangre o sustancias de grupos sanguíneos.

Los anticuerpos fríos dan títulos de aglutinación más altos a bajas tempera-

turas (0 °C - 4 °C) y muchos no aglutinan los eritrocitos a 37°C. La mayoría de los anticuerpos de ocurrencia natural son fríos e IgM, aunque algunos, como anti-A, anti-B y especialmente anti-A,B, tienen rango térmico amplio y reaccionan también a 37 °C, pudiendo activar el complemento hasta C9 y causar hemólisis. Los anticuerpos fríos que no reaccionan sobre 30 °C no tienen ningún significado clínico y deben ser ignorados en la práctica transfusional. La temperatura óptima de reacción de los anticuerpos calientes es 37 °C, lo que implica que los títulos más altos se obtienen a dicha

temperatura. Los anticuerpos inmunes son en su mayor parte IgG y reaccionan en caliente. Cualquier anticuerpo que reacciona sobre 30 °C debe ser considerado como “potencialmente” capaz de destruir eritrocitos *in vivo*.

Fijación del complemento por anticuerpos eritrocitarios

En la activación del complemento (Figuras 17-21, Capítulo 1) hay dos etapas: la primera es la generación de la forma activa de C3, que lleva al recubrimiento u opsonización del eritrocito con una gran cantidad de la proteína C3b y liberación de la anafilatoxina C3a. Normalmente, hay grandes cantidades de C3 en el plasma y el C3b puede ser generado tanto por la vía clásica como la alternativa, con una vida de sólo minutos, siendo prontamente inactivado por los factores H e I. La segunda etapa es la lítica, con la activación de C5, seguida de las proteínas del complejo de ataque de membrana, se forman poros que permiten el paso de iones y agua al interior del eritrocito, causando hemólisis intravascular. La activación de C5, con formación de C5b, libera la potente anafilatoxina C5a. Los anticuerpos IgG que fijan complemento, al no ser activadores tan potentes, sólo lo hacen hasta C3b; en cambio, los IgM, al tener 10 Fab por molécula, pueden fijar a través de sus fragmentos Fc muchas moléculas de complemento en proximidad y por consiguiente, gran cantidad de C3b, activando la cascada completa, hasta C9. La liberación de C3a y C5a, como también de citocinas (interleukinas IL-1, IL8 y el factor de necrosis tumoral), causan la mayoría de los signos y

síntomas de las reacciones hemolíticas transfusionales. Estas moléculas causan contracción de la musculatura lisa, agregación plaquetaria, aumento de la permeabilidad capilar y liberación de aminas vasoactivas (histamina, serotonina, etc.) e hidrolasas de los mastocitos y granulocitos, respectivamente. Además, la hemólisis intravascular libera sustancias tromboplásticas que activan la coagulación, llevando a la CID (Figura 2). La liberación de abundantes mediadores explica el porqué de la intensidad de la sintomatología en la hemólisis intravascular, comparada con la hemólisis extravascular, en la que solo se liberan C3a, citocinas y sustancias vasoactivas estimuladas por el C3a y por la unión de los eritrocitos recubiertos con IgG+/- C3b a las células fagocíticas mononucleares.

Cuando C3b está intacto, los glóbulos rojos opsonizados se adhieren a los receptores CR de complemento en monocitos y macrófagos, causando su destrucción por fagocitosis o citotoxicidad. C3b tiene una vida muy corta y no hay C3b libre en el plasma. Por lo tanto, la opsonización con C3b de eritrocitos recubiertos de IgG, neutraliza el efecto inhibidor de la IgG libre en el plasma sobre la adherencia inmune de los eritrocitos recubiertos de IgG al sistema fagocítico mononuclear y amplifica la hemólisis extravascular por lo menos cien veces. En consecuencia, los eritrocitos recubiertos con IgG y C3b son destruidos principalmente en el hígado donde hay abundantes células fagocíticas (células de Kupfer) con receptores para IgG y C3b. Por el contrario, células recubiertas con sólo IgG1 y/o IgG3 son destruidas en la pulpa roja del bazo,

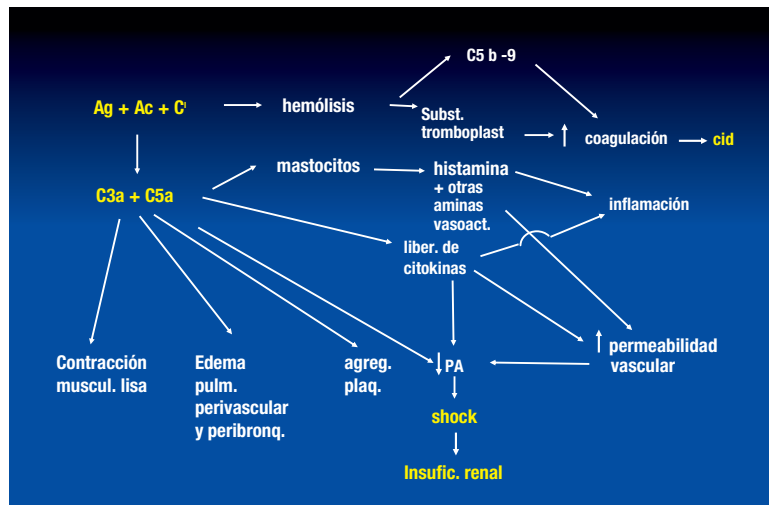


Figura 2. Hemólisis extravascular por unión de anticuerpos IgM a antígenos eritrocitarios con fijación de complemento hasta C9 y liberación de mediadores responsables de los signos y síntomas.

donde, debido a la hemoconcentración, hay menos posibilidades de competencia con la IgG libre del plasma, por los receptores Fc.

No se sabe por qué ciertos anticuerpos fijan complemento y otros no, pero varios factores parecen ser importantes:

1. *La clase y subclase de inmunoglobulina.* Después de la unión al antígeno, por lo menos dos sitios de unión a C1q, próximos y bien alineados son necesarios para fijar complemento. Una molécula de IgM unida a la superficie antigénica, puede exponer cinco sitios próximos, en los fragmentos Fc, de unión para C1q. En cambio, una molécula de IgG expone sólo un sitio al unirse al antígeno, y por lo tanto va a requerir como mínimo otra molécula de IgG a su lado, como dupla, para poder fijar C1q. En consecuencia, para que IgG fije complemento debe haber muchas más moléculas unidas a la super-

ficie antigénica que en el caso de IgM, en el que basta con una sola.

2. *La especificidad del anticuerpo IgG.* La mayoría de los anticuerpos de los sistemas Jk, Fy y Kell fijan complemento hasta C3. Los del sistema Rh no fijan complemento.
3. *La densidad de sitios antigénicos en la superficie del eritrocito* (Tabla 2). Si la densidad es baja o moderada, puede dificultarse el proceso de alineamiento de dos moléculas de IgG, independientemente de la cantidad de anticuerpo presente. Esto explica en parte el hecho de que las IgG no fijen tanto C3b como las IgM anti-A,B, y no puedan generar el complejo de ataque de membrana.

Tabla 2. Sitios antigénicos / eritrocito

ABO	=	0,5 - 1 x 10 ⁶
Rh	=	1 - 3 x 10 ⁴
Kell	=	0,2 - 0,6 x 10 ⁴
Fy	=	0,7 - 1,7 x 10 ⁴
Jk	=	1,4 x 10 ⁴
MNSs	=	2,5 x 10 ⁵ (glicof B) 1 x 10 ⁶ (glicof A)

4. La flexibilidad de la región de bisagra (Figura 3); mientras más amplio es el ángulo en la unión Y, mayor es la habilidad de la molécula IgG para fijar complemento.

En la destrucción de eritrocitos causada por anticuerpos líticos fijadores de complemento, el número de eritrocitos que puede ser hemolizado rápidamente está limitado sólo por la cantidad de anticuerpos y complemento disponibles. En las transfusiones ABO incompatibles puede que no quede ningún eritrocito incompatible circulante al cabo de una hora de la transfusión. Para los anticuerpos IgG capaces de fijar complemento parcialmente, la hemólisis será extravascular y más lenta.

Factores que inciden en el significado clínico de los anticuerpos eritrocitarios

Anticuerpos clínicamente significativos son aquellos capaces de destruir glóbulos rojos *in vivo*, causando reacciones transfusionales hemolíticas o

enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido (EHFRN). La importancia clínica de estos anticuerpos depende en parte de su capacidad destructiva y en parte de su frecuencia. Por ejemplo, anti-PP1P^K (anti-T^{j^a}) es una hemolisina IgM fijadora de complemento muy potente, pero tiene una importancia mínima en la práctica transfusional debido a su rareza. Por el contrario, los anticuerpos ABO y D son lejos los anticuerpos de mayor significado clínico, debido a su prevalencia y su capacidad destructora de células incompatibles.

Varios factores influyen la destrucción inmune de los eritrocitos *in vivo* (Tabla 3). Ellos abarcan:

Tabla 3. Factores que influyen la destrucción inmune de glóbulos rojos

- Conc. plasmática y avidéz del Ac
- Rango térmico del Ac
- Clase y subclase de la inmunoglobulina
- Especificidad del Ac
- Densidad del Ag. en la membrana
- Volumen de eritrocitos transfundidos
- Presencia de Ag en el plasma
- Actividad del sistema fagocitario mononuclear
- Sensibilidad de eritrocitos al Complemento
- Grado de activación del Complemento

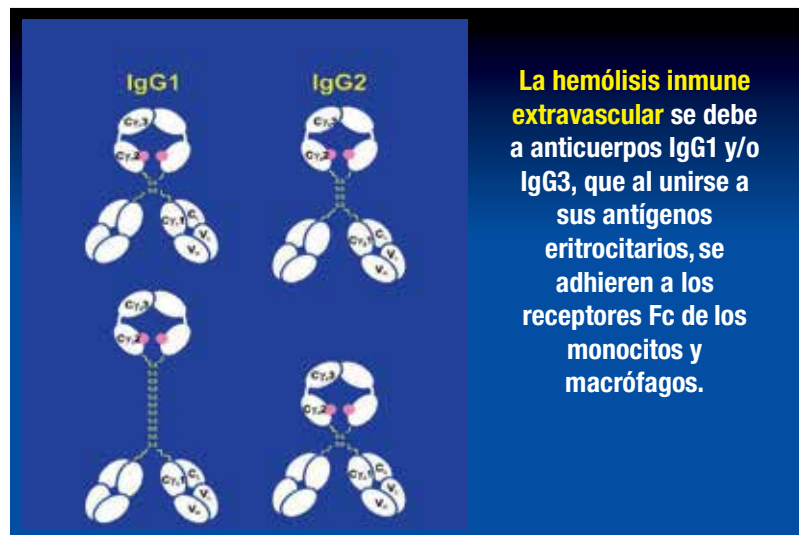


Figura 3. Estructura de las cuatro subclases de IgG.

1. *La concentración plasmática y avididad del anticuerpo.* Los anticuerpos anti-A,B, -A, -B de los adultos grupo O son ávidos y están presentes en alta concentración por lo que pueden causar hemólisis grave en transfusiones ABO incompatibles. Los individuos grupo A o B tienen anticuerpos anti-B y anti-A mucho menos potentes, por lo que al ser transfundidos erróneamente con sangre ABO incompatible, sufrirán reacciones hemolíticas menos graves. Más aun, los recién nacidos y niños menores, tanto como los ancianos, tienen anticuerpos ABO inexistentes o más débiles que los adultos jóvenes del mismo grupo. En el caso de anticuerpos IgG, como anti-D o anti-K, los anticuerpos débiles no causarán gran hemólisis inmediata de células incompatibles, pero éstas serán destruidas gradualmente, a medida que la potencia del anticuerpo aumenta.
2. *El rango térmico del anticuerpo.* Como ya se dijo, los anticuerpos que no reaccionan sobre 30 °C pueden ser ignorados en la práctica transfusional. Aun cuando, en la circulación extracorpórea el paciente es enfriado a temperaturas bajo 30 °C, los anticuerpos fríos no podrán causar hemólisis porque el complemento solo se fija a 37 °C y también la fagocitosis y citotoxicidad ocurren a esta temperatura.
3. *La clase y subclase de inmunoglobulina.* La capacidad de los anticuerpos IgM de amplio rango térmico de fijar complemento hasta C9, produciendo el complejo de ataque

de membrana, les da su alto significado clínico, ya que pueden causar serias reacciones hemolíticas transfusionales intravasculares inmediatas. La mayoría de estas reacciones son prevenibles, se deben a errores de sangre incorrecta transfundida que llevan a la incompatibilidad ABO. Las reacciones más graves ocurren en la incompatibilidad mayor, cuando un paciente grupo O, con alto título de anti-A,B, es transfundido con eritrocitos grupo A, B o AB. La hemólisis intravascular puede ocurrir raramente cuando el plasma de grupo O es transfundido a pacientes grupo A, B o AB. Por este motivo, idealmente, la sangre y plaquetas de grupo O deben ser transfundidas sólo a pacientes de grupo O. De no ser evitable, el plasma de la sangre o plaquetas de grupo O debe ser examinado para detectar la presencia de anti-A,B de alto título antes de ser transfundido a receptores no O, o debe ser eliminado del componente respectivo.

De las subclases IgG, IgG1 e IgG3 tienen importancia clínica debido a la capacidad de algunas de fijar complemento hasta C3b y sobre todo, por su avididad por los receptores Fc de macrófagos y monocitos, las células efectoras de la hemólisis inmune extravascular. Los anticuerpos IgG de mayor significado clínico son los anti-D, debido a la alta inmunogenicidad del antígeno D, comparada con la de otros antígenos eritrocitarios (Tabla 4).

4. *Especificidad del anticuerpo.* Varios anticuerpos que reaccionan

Tabla 4. Inmunogenicidad relativa de los aloantígenos eritrocitarios

Antígeno	Antigenicidad %
D	50,0
K	5,0
c	3,0
E	1,7
k	1,5
e	0,6
Fy ^a	0,2
C	0,1
JK ^a	0,07

en caliente son incapaces de causar la destrucción de glóbulos rojos *in vivo* (ej. anti-Ch, -Rg, -Cs^a, -Kn^a, -Xg^a y la mayoría de los anti-Yt^a). La especificidad está ligada, en cierto grado, a la subclase de IgG (Tabla 5), lo que explica en parte, pero no totalmente, por qué ciertos anticuerpos IgG no tienen significado clínico. Es de notar que el componente IgG del anti- A,B, anti-A y anti-B es predominantemente IgG2, lo que contribuye parcialmente a que la EHFRN por ABO no sea tan grave como la debida a anticuerpos Rh y Kell.

Tabla 5. Subclase IgG de aloanticuerpos eritrocitarios

IgG1 y 3	-Rh
Predomin. IgG1:	-K, -k -Fy ^a , -Fy ^b -Wr ^a , -G ^e
Predomin. IgG2:	-A,B, -A, -B
Predomin. IgG3:	-Kk ^a , Jk ^b , -s
Predomin. IgG4:	-Lu ^a , -Yt ^a , -JMh

5. *Densidad antigénica en la membrana eritrocitaria* (Tabla 2). La posibilidad y grado de sensibilización del glóbulo rojo con anticuerpo y

complemento aumenta con el número de sitios antigénicos en la superficie. Por ejemplo, eritrocitos de grupo A₁ son destruidos más rápidamente por anti-AB que eritrocitos A₂, y eritrocitos cDE/cDE son destruidos más rápidamente por anti-D que los de grupo CDe/cde. Esto no aplica estrictamente al comparar anticuerpos de diferentes sistemas de grupos sanguíneos, ya que la densidad antigénica de algunos antígenos puede ser muy baja y la capacidad lítica de los anticuerpos respectivos muy alta, como es el caso de los anticuerpos Jk.

6. *Volumen de eritrocitos incompatibles transfundidos.* Un volumen pequeño de eritrocitos incompatibles será destruido más rápidamente que un volumen grande del mismo donante. Grandes volúmenes de eritrocitos incompatibles pueden agotar el anticuerpo circulante disponible y saturar el sistema fagocítico mononuclear, sobre todo si el anticuerpo no es muy potente.
7. *Presencia del antígeno incompatible en el plasma del donante.* Los antígenos Lewis (Le^a y Le^b) y los antígenos Chido y Rogers son primariamente del plasma y sólo se adsorben en forma secundaria a los eritrocitos. El antígeno libre en el plasma puede reaccionar con el anticuerpo del receptor e inhibir su unión al antígeno en la superficie del eritrocito. Si se transfunden eritrocitos portadores de Le^a o Le^b a pacientes Le(a-b-) con anti-Le^a y/o -Le^b, parte del anticuerpo será neutralizado por el antígeno libre en el plasma y, dependiendo de la poten-

cia del anticuerpo y de si reacciona *in vitro* con los eritrocitos transfundidos, los eritrocitos incompatibles serán destruidos en mayor o menor grado. Pero el antígeno Lewis se desprenderá de la superficie y los glóbulos rojos transfundidos y se convertirán en Le(a-b-), por lo que la hemólisis es limitada y, además, no puede haber una reacción hemolítica retardada. Por otra parte, como la cantidad de antígeno Lewis depende del grupo ABO, los pacientes grupo A o B tendrán menos Lewis que los O del mismo genotipo. Como el tamizaje de anticuerpos se hace con eritrocitos grupo O, es probable que los anticuerpos Lewis encontrados en el laboratorio, en un receptor de grupo A, B o AB no reaccionen ni *in vitro* ni *in vivo* con eritrocitos del mismo grupo. Por estas razones, a diferencia de lo recomendado para pacientes con otros anticuerpos de grupos sanguíneos, los eritrocitos compatibles en las pruebas cruzadas, no tipificados para Lewis, pueden ser transfundidos tranquilamente a pacientes con anticuerpos Lewis. Esto no significa que los anticuerpos Lewis se pueden ignorar en transfusión; si se transfunden eritrocitos Le(a+) y/o Le(b+) incompatibles en las pruebas cruzadas con los anticuerpos Lewis del receptor, puede desencadenarse una hemólisis intravascular grave, sobre todo al inicio de la transfusión, antes que los eritrocitos se desprendan del antígeno adsorbido.

8. *Actividad de las células del sistema fagocítico mononuclear.* La ha-

bilidad de los macrófagos para remover células sensibilizadas varía entre distintos individuos. La esplenectomía, los corticosteroides y otras drogas inmunosupresoras disminuyen la remoción de eritrocitos recubiertos de anticuerpos IgG.

9. *Susceptibilidad de los eritrocitos al complemento.* Los pacientes con hemoglobinuria paroxística nocturna tienen eritrocitos altamente sensibles a hemólisis por activación del complemento, como resultado de la ausencia de reguladores del complemento.
10. *Grado de activación del complemento.* Algunos anticuerpos fijan complemento regularmente y otros lo hacen raramente o nunca. Los IgM (ej. anti-AB, -A, -B, -PP1P^K) activan la cascada del complemento hasta C9, sin embargo, para los anticuerpos IgG que fijan complemento (ej. anti-Fy^a, -Jk^a, -K) la cascada se interrumpe a nivel de C3. Los eritrocitos recubiertos con IgG y C3b son destruidos en el espacio extravascular en el hígado.

Mecanismos de destrucción inmune de los eritrocitos

Esto significa la destrucción prematura de eritrocitos transfundidos por anticuerpos de ocurrencia natural (ABO) o por aloanticuerpos. La hemólisis puede ser *inmediata*, durante y/o después de la transfusión, o *retardada*, una a tres semanas después de la transfusión, como respuesta anamnésica en individuos previamente inmunizados, pero que no presentan los anticuerpos culpables en su plasma en las pruebas

pretransfusionales. Las reacciones retardadas no son predecibles ni prevenibles. Al reaparecer los anticuerpos y adquirir potencia, estos reaccionan con las células portadoras del antígeno inmunizante produciendo hemólisis. La hemólisis puede ser intra o extravascular (Figuras 4 y 5). La hemólisis intravascular es siempre inmediata; en cambio la extravascular puede ser inmediata o retardada, dependiendo de la presencia o ausencia de los aloanticuerpos culpables en las pruebas pretransfusionales.

La hemólisis intravascular (Figuras 4, 5 y 2) es la más peligrosa. Se debe a la activación del complemento hasta C9 por anticuerpos IgM de amplio rango térmico. Se asocia, prácticamente siempre, a transfusiones ABO incompatibles administradas por error generalmente a individuos grupo O. Los síntomas pueden ser dramáticos y graves; la mayoría se debe a la liberación de las anafilatoxinas C3a y C5a. Los pacientes pueden tener signos y síntomas leves, moderados o graves, como hemoglobinemia, hemoglobinuria, CID, shock, edema pulmonar e insuficiencia renal aguda.

La hemólisis extravascular (Figuras 4, 5 y 6) es mediada por anticuerpos IgG (Figura 3), los que al recubrir las células incompatibles se adhieren a los receptores Fc de monocitos y macrófagos (Figura 1), llevando a su destrucción por fagocitosis o citotoxicidad. La IgG libre en el plasma inhibe la unión a los receptores Fc, por lo

que los eritrocitos recubiertos con sólo IgG son removidos esencialmente en la pulpa roja del bazo, donde hay gran exclusión de plasma. Si los anticuerpos IgG fijan complemento hasta C3b, se anula el efecto inhibitor de la IgG libre y los eritrocitos opsonizados son removidos esencialmente en el hígado, donde hay abundantes macrófagos y el flujo sanguíneo es generoso. Si los anticuerpos IgG son débiles, especialmente si no fijan C3b, la remoción es predominantemente por fagocitosis. Si los anticuerpos IgG son potentes y, especialmente si fijan C3b, el mecanismo de remoción es por citotoxicidad con liberación de lisozimas (Figura 7). La citotoxicidad dependiente de anticuerpos es extravascular y extracelular, con liberación de hemoglobina al espacio extracelular, la que puede manifestarse en hemoglobinemia y hemoglobinuria. Esto puede ocurrir con anticuerpos potentes anti-Jk, en su gran mayoría fijadores de complemento hasta C3b, con anticuerpos Kell y Fy, e incluso con anti-Ds muy potentes, a pesar de que no fijan C3b.

Las características clínicas de una reacción hemolítica transfusional inmediata dependen de varios factores: si la hemólisis es intra o extravascular; la potencia y avidéz del anticuerpo; la clase y subclase del anticuerpo; la naturaleza del antígeno y el número de sitios antigénicos por eritrocito; el volumen de eritrocitos incompatibles transfundidos; y el estado clínico y tratamiento del paciente.



Figura 4. Mecanismos de destrucción inmune *in vivo* de eritrocitos.

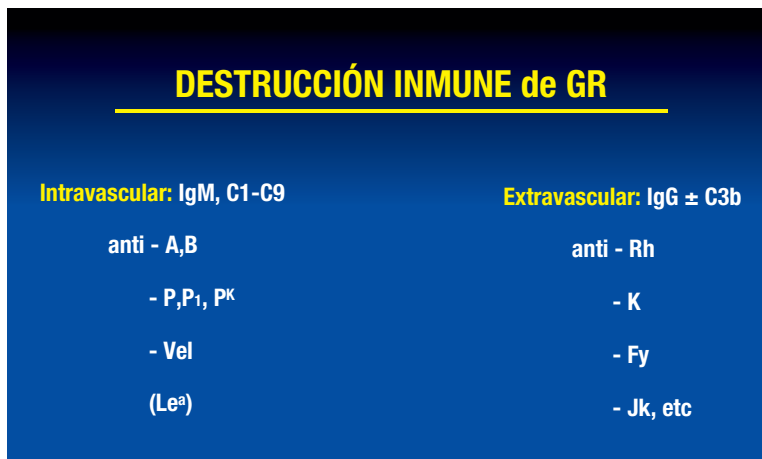


Figura 5. Destrucción inmune de eritrocitos por anticuerpos IgM e IgG.

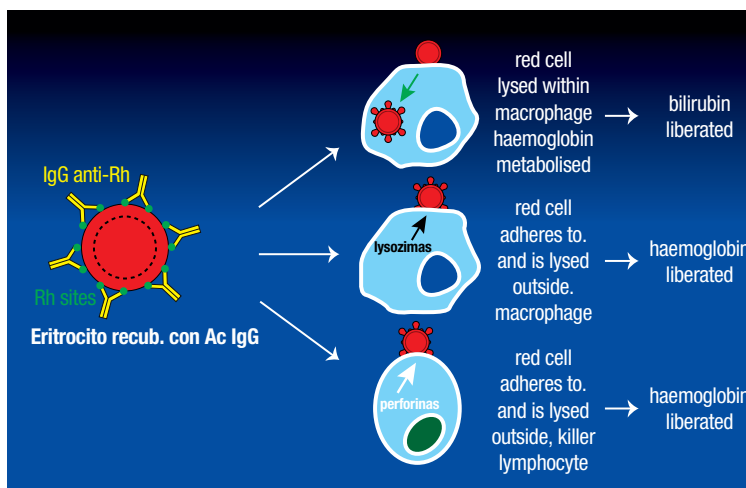


Figura 6. Mecanismos de destrucción extravascular de eritrocitos recubiertos por anticuerpos IgG1 y/o IgG3. En la sección superior, la destrucción es por fagocitosis y en las secciones media e inferior, la destrucción es por citotoxicidad.

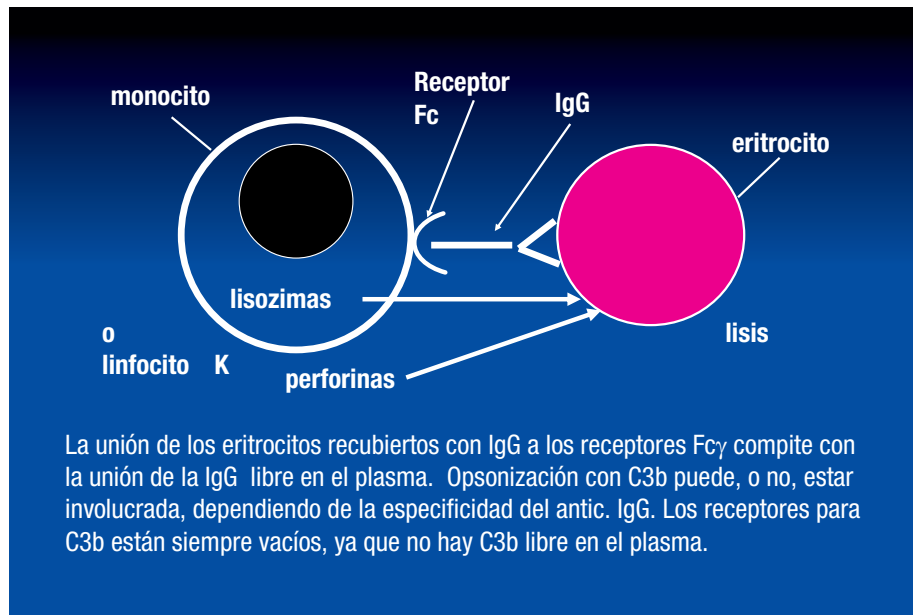


Figura 7. Hemólisis extravascular por citotoxicidad.

Anticuerpos clínicamente significativos en la práctica transfusional

Los anticuerpos de mayor relevancia clínica en transfusión son los del sistema ABO (especialmente el anti-A,B de los receptores grupo O) y el anti-D, debido a su frecuencia y capacidad destructora de eritrocitos. De ahí la importancia de tipificar correctamente a donantes y pacientes, ya que si se transfunden componentes sanguíneos compatibles para ABO y D, se evitarán problemas en más del 98% de las transfusiones. Si el anti-AB es una hemolisina potente, puede causar hemólisis de los eritrocitos del receptor cuando el plasma de donantes grupo O, ya sea como sangre total, PFC o sobrenadante de plaquetas, se transfunde a pacientes grupo A, B o AB. Obviamente, el anti-D no tendrá tanta relevancia en aquellos países o regiones en los que la frecuen-

cia de personas Rh D – negativas es mínima.

El resto de los anticuerpos clínicamente significativos se encuentra en solo 1%-1,5% de los pacientes y en un mínimo porcentaje de donantes. Entre los IgM fijadores de complemento están algunos casos de anti- Le^a y - Le^b y escasos ejemplos de anti- P_1 y anti- A_1 , si reaccionan a 37 °C en las pruebas de compatibilidad; anticuerpos raros, pero extremadamente líticos como los anti- PP_1P^k (anti- T_j^a), anti-H y anti-Vel. Cualquier anticuerpo IgG que reaccione con eritrocitos a 37 °C en la prueba de antiglobulina indirecta, deberá ser considerado como clínicamente significativo potencialmente. De los clínicamente significativos, los que se encuentran con más frecuencia, después del anti-D, son los anti-c, -K y anti-E. Pero el anti-E es a menudo de ocurrencia natural, reacciona solo con enzimas y no tiene significado clínico; infortunada-

mente no se puede ignorar y hay que proveer sangre E-negativa para los pacientes con anti-E, ya que si es inmune causará destrucción de glóbulos rojos incompatibles. Hay especificidades de anticuerpos IgG que, a pesar de reaccionar a 37 °C, no causan destrucción evidente de glóbulos rojos, tales como anti-Lu^a, Xg^a, Yk^a, Cs^a, McC^a, Kn^a y JMH. Anticuerpos IgG que raramente causan destrucción de eritrocitos incompatibles *in vivo* son los anti-Yt^a, anti - LW y anti- HLA en eritrocitos (anti-Bg). La capacidad destructora de estos anticuerpos se debe en algunos casos a la subclase de la IgG, pero no siempre; la mayoría de los anti-Xg^a son IgG1 y no son hemolíticos.

En el Reino Unido y Europa occidental, sólo una pequeña proporción (1%-1,5%) de los pacientes potenciales receptores de sangre tiene aloanticuerpos clínicamente significativos, diferentes de anti-D. Las pruebas pretransfusionales de rutina, permitirán la identificación de aquellos pacientes que necesitan ser investigados detalladamente, con bastante antelación a cualquier transfusión planificada. Más del 75% de los anticuerpos IgG encontrados en las pruebas pretransfusionales tiene especificidad anti-D, anti-K o anti-c. Como la mayoría de los casos de EHFRN grave son debidos a estos anticuerpos, idealmente las niñas y mujeres fértiles, negativas para los antígenos D, c o K, deben ser transfundidas con sangre negativa para los antígenos correspondientes. Esto también se aplica a pacientes con anemia drepanocítica y a pacientes dependientes de transfusiones, que ya han formado cualquier aloanticuerpo, se sabe que la inmuni-

zación a un antígeno de grupo sanguíneo aumenta la inmunogenicidad del resto de los antígenos eritrocitarios en transfusiones futuras. Por otra parte, varones D-negativos no inmunizados pueden ser transfundidos con sangre D-positiva sin problemas, sobre todo si requieren una transfusión masiva y hay escasez de sangre Rh D negativa. Si producen anti-D tres a seis meses después y requieren una transfusión en el futuro, se les proveerá sangre Rh D- negativa.

Anticuerpos causantes de EHFRN

Los anticuerpos que causan EHFRN son IgG1 y/o IgG3, ya que son capaces de cruzar activamente la placenta y destruir los eritrocitos del feto. Los que causan EHFRN con mayor frecuencia pertenecen a los sistemas Rh y ABO. La morbilidad de la EHFRN por Rh se debe a la alta inmunogenicidad del antígeno D; la EHFRN por anti-c es también importante y su incidencia es la segunda entre los casos de enfermedad grave, seguida de cerca por anti- K, que es más inhibidor de la eritropoyesis del feto que hemolítico. Los anticuerpos Rh son en general una mezcla de IgG1 e IgG3, y los anti-K son predominantemente IgG1 fijadores de complemento. El componente IgG de los anti-A,B, anti-A y anti-B es fundamentalmente IgG2 (Tabla 5); los antígenos ABO son débiles en el feto y recién nacido, además de estar distribuidos en los tejidos y fluidos, fuera de los eritrocitos, por lo que el anti- A,B en el feto no se concentra solo en los glóbulos rojos, causando una EHFRN mucho menos grave. Anticuerpos en la mayoría

de los sistemas de grupos sanguíneos (ej. Fy, Jk, Kell) y también en los grupos de antígenos “públicos” y “privados” han sido responsables de EHFRN. Los IgM no pueden cruzar la placenta y, a pesar de que anti-Lewis y anti-P₁ ocurren frecuentemente en el embarazo, no causan EHFRN. Más aun, los antígenos Le no están totalmente desarrollados al nacer.

De lo anterior se desprende que los únicos anticuerpos que deben ser monitoreados regularmente en el embarazo, si se identifican en el primer control de la gestación, son el anti-D, -c y -K, ya que el resto de los anticuerpos IgG no causa hemólisis de tal grado en el feto que necesite intervención obstétrica *in utero*.

Valoración en el laboratorio del significado clínico de los anticuerpos

Si se desconoce el significado clínico de un anticuerpo encontrado en un paciente, las técnicas más precisas para predecir su capacidad destructora *in vivo* son obviamente técnicas *in vivo*, como la sobrevida de eritrocitos por aglutinación diferencial o de eritrocitos marcados con Cr⁵¹, biotina u otros. Pero estas técnicas son muy especializadas y se usan sólo en investigación clínica.

En la mayoría de los casos, las pruebas pretransfusionales de rutina logran determinar el significado clínico de los anticuerpos eritrocitarios. Cualquier anticuerpo que reaccione *in vitro* a 37 °C, causando ya sea hemólisis o aglutinación directa o por la prueba de antiglobulina, es potencialmente capaz de destruir eritrocitos *in vivo*. Por lo tanto, es importante tener

conocimientos acabados de inmunohematología para saber cuáles son las características y especificidades de anticuerpos que pueden causar problemas en transfusión o en el feto o recién nacido.

El suero del paciente debe ser examinado para detectar la presencia de aloanticuerpos, usando la técnica de antiglobulina indirecta, con dos o tres células individuales (no en *pool*) grupo O que expresen entre ellas todos los antígenos comunes que pueden reaccionar con anticuerpos clínicamente significativos. Si el resultado es positivo, el suero debe ser investigado con un panel de identificación de ocho a diez células. Mezclas de anticuerpos requerirán más de un panel para su elucidación. Si el paciente con aloanticuerpos requiere una transfusión en el futuro, su suero debe ser investigado con un panel de células negativas para el anticuerpo pertinente, permitiendo la identificación de posibles anticuerpos adicionales, ya que pacientes inmunizados contra un antígeno tienen mayor tendencia a formar anticuerpos adicionales que aquellos no inmunizados.

Fuera de la temperatura de reacción y la especificidad, el título o cuantificación del anticuerpo es importante. Excepto en transfusiones de fetos, recién nacidos y niños pequeños, los anticuerpos débiles en donantes no tienen importancia clínica, ya que serán diluidos en la circulación del receptor. En el RU, tamizaje para anticuerpos ABO de alto título, en donantes grupo O, se hace de rutina y las bolsas con alto título son etiquetadas para ser usadas solo en pacientes grupo O. En los receptores, fuera de los anticuerpos ABO, los IgG de alto

título de especificidad reconocida pueden causar hemólisis inmediata grave en casos de transfusión incompatible; si son débiles, su título aumentará a los pocos días de la transfusión, destruyendo las células transfundidas en forma progresiva. En el seguimiento de la embarazada inmunizada con anti-D o anti-c, la cuantificación del anticuerpo es importante para ayudar al obstetra, junto con otros parámetros clínicos, en la predicción de la gravedad de la EHFRN. La cuantificación por AutoAnalizador o citometría de flujo da resultados más confiables y predictivos que el título manual, aunque la titulación bien controlada por la técnica de gel en columna da resultados comparables al AutoAnalizador.

La capacidad del anticuerpo de fijar complemento es importante. Para su determinación, la reacción debe efectuarse a 37 °C para detectar hemólisis o fijación de complemento en la prueba de antiglobulina, la que debe ser con suero que contenga anti-C3.

La definición de subclase de IgG es sólo de valor académico y no para determinar el significado clínico en la rutina. Los reactivos subclasificadores son escasos, caros y poco confiables. A veces, los laboratorios de referencia pueden recurrir a determinar la subclase de anticuerpos raros o nuevos para ayudar a dilucidar su significado clínico, sobre todo en casos de anticuerpos contra antígenos públicos en los que es imposible encontrar sangre compatible.

Los bioensayos celulares, usando eritrocitos recubiertos de anticuerpo, en la adherencia a macrófagos, fagocitosis, citotoxicidad mediada por anticuerpos o quimioluminiscencia, pueden correlacionarse bien con la destrucción de eritrocitos por anticuerpos IgG *in vivo*, ya sea en transfusiones o en la EHFRN. Pero estas pruebas son laboriosas, caras y demoradas. Solo se usan en laboratorios de referencia muy especializados. En general no aportan mucha ayuda adicional a la proporcionada por las pruebas pretransfusionales de rutina y al conocimiento acabado del personal de laboratorio y los especialistas en Medicina Transfusional.

Bibliografía recomendada

1. Delves, P., Martin, S., Burton, D., Roitt, I. M. *Roitt's Essential Immunology*, 11th ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2006.
2. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories The British Committee for Standards in Haematology: BCSH, 2012. Disponible en: www.bcshguidelines.com
3. Guideline on the investigation and management of acute transfusion reactions. The British Committee for Standards in Haematology: BCSH. (2012). Disponible en: www.bcshguidelines.com
4. Klein, H. G., Anstee, D. J. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 11th ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005.
5. Poole, J., Daniels, G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev* 2007; 21: 58-71.

Pruebas pretransfusionales

GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ*

Introducción

Las pruebas pretransfusionales (PPT) se realizan para prevenir la transfusión de sangre incompatible que pudiera generar una reacción hemolítica transfusional.¹ Una transfusión de eritrocitos ABO incompatible es fatal en el 10% de los casos,² y aunque en los países que llevan un completo programa de hemovigilancia se ha logrado reducir de forma significativa, aún constituye una de las causas más frecuentes de mortalidad postransfusión.³

El desarrollo de estándares efectivos y satisfactorios para la realización de las PPT, requiere un enfoque estructurado en la adopción de un sistema de manejo de la calidad. Los errores técni-

* *Médico especialista en Hematología. Jefe del Banco de Sangre del Instituto Diagnóstico, Caracas. Médico consultivo del Banco Municipal de Sangre del DC, Caracas, Venezuela. gracieleon@gmail.com*

cos, administrativos (cléricos), el uso de técnicas no validadas y de equipos no acordes con los procesos establecidos, pueden generar incompatibilidades no detectadas y reacciones hemolíticas inmediatas o tardías. El laboratorio debe identificar todos los puntos de control crítico en las PPT y elaborar instructivos de seguridad para ellos.⁴

Las PPT comprenden el tipeaje ABO, Rh (D) y la detección de anticuerpos irregulares (DAI) en el receptor, la verificación del tipeaje en la donación y la prueba cruzada (PC) entre el suero o plasma del receptor y los eritrocitos del donante.^{1,4} En algunos países se incluye la prueba de antiglobulina humana (AGH) directa en el receptor. La reiterada insistencia en la correcta identificación del paciente y en los adecuados procedimientos de etiquetado, debe ser asimilada por todos los involucrados en el proceso transfusional.

El proceso transfusional comienza con la solicitud de la transfusión, seguido por la toma de la muestra, ejecución de las PPT, etiquetado del componente y liberación de la transfusión. El propósito de este capítulo es hacer una revisión del proceso desde la solicitud hasta la selección y compatibilización de la transfusión, considerando diversas circunstancias particulares desde el punto de vista inmunohematológico.

Solicitud de transfusión y toma de muestras

Datos de la solicitud

La solicitud de transfusión es el requisito fundamental para que el banco de sangre proceda a preparar una transfu-

sión. Para la segura identificación del paciente se debe colocar, al menos, dos identificadores independientes, los cuales usualmente son el nombre completo y un número único de identificación, como por ejemplo, el número de identidad del paciente o el número de registro hospitalario; ambos identificadores deberán colocarse igualmente en la etiqueta de la muestra.^{1,5} Existen otros identificadores que pueden utilizarse, dependiendo de los recursos y normativas del centro hospitalario. Además, la solicitud debe recoger otras informaciones como fecha y hora de la misma, número de historia, fecha y lugar de nacimiento, edad, género, grupo sanguíneo (si lo conoce), diagnóstico, medicamentos que recibe, antecedentes transfusionales, de embarazos y de reacciones adversas a la transfusión, ubicación en el centro hospitalario, así como datos relacionados al tipo y cantidad del componente solicitado, requerimientos especiales, carácter de la transfusión (tratamiento, prequirúrgico, urgente o de extrema urgencia), la justificación de la solicitud y la identificación completa del médico solicitante y de la persona que tomó la muestra. Una solicitud incompleta, imprecisa o ilegible no debe ser aceptada.

Identificación del paciente y de la muestra

La identificación positiva del paciente previo a la toma de la muestra es crítica para la seguridad transfusional. La mayoría de los hospitales utilizan brazaletes o bandas de identificación colocadas en la muñeca del paciente. Algunas tienen un espacio para escri-

bir los identificadores así como etiquetas despegables numeradas, legibles a simple vista para las muestras. Otras, mucho más seguras, se generan de forma automatizada, y muestran la identificación legible visualmente y en formato de código de barra. Las etiquetas para las muestras con el mismo código de barra, pueden desprenderse del brazalete o generarse después de la toma de la muestra cuando el lector portátil reconoce el código del paciente en su brazalete. Existen otros mecanismos de identificación más sofisticados y costosos.⁶ Pero sea cual fuere la modalidad de identificación, debe estar integrado a un sistema que sea capaz de identificar de forma vinculante e inequívoca al paciente, la solicitud y la muestra, y posteriormente al componente preparado.

La persona que tome la muestra debe verificar los datos de la solicitud con los del brazalete, corroborándolos con el propio paciente para descartar errores de identificación en ellos. Murphy y col., encontraron que menos del 20% de los pacientes no fueron verificados en su identidad, previo a la extracción.⁷ En caso de discrepancia, ésta debe resolverse antes de tomar la muestra o al menos antes de transfundir.

Debe haber un mecanismo para la identificación de muestras tomadas antes de la admisión, como en el caso de los pacientes prequirúrgicos, quienes deben tener el tipeaje y la DAI con anticipación a la cirugía, tengan o no orden de transfusión. También se requiere un mecanismo que garantice la correcta identificación del paciente en quirófano en caso de que por alguna eventualidad el brazalete sea retirado.^{1,8}

Los centros hospitalarios deben tener un sistema que permita la identificación de pacientes que no posean documentos de identidad. Usualmente se registra el género, se le da un número o un nombre temporal y se le asocia el número de historia.⁴ Igualmente, debe existir un mecanismo para la aceptación de solicitudes telefónicas en caso de extrema urgencia según las normas institucionales.

Toma de la muestra

Errores en la identificación del paciente y en el etiquetado de la muestra pueden conducir a una transfusión ABO incompatible.^{2,9-11} Cuando el etiquetado de la muestra no se realiza en la habitación del paciente de forma inmediata a la extracción, existe la posibilidad de cometer error. Un extenso estudio multicéntrico¹² lo estimó en 1:1986 muestras colectadas.

Es mucho más seguro etiquetar el tubo después de verter la muestra, que utilizando tubos premarcados.⁸ Dzik y col., estimaron el mal etiquetado en una frecuencia de 1:165.¹² El etiquetado incorrecto no solo puede causar reacción transfusional por incompatibilidad ABO, sino retardo en la transfusión por requerirse la toma de una nueva muestra, lo cual puede ir en perjuicio del paciente.⁹

Además de los dos identificadores independientes, la etiqueta debe tener la fecha de extracción y la identificación de quien tomó la muestra. Se debe utilizar tinta indeleble, escritura clara y sin enmiendas. La identificación de la persona que tomó la muestra debe constar también en el sistema automa-

tizado (o manual) de registro del servicio de transfusión (ST).^{5,13} Muestras mal identificadas no se deben aceptar. Tampoco deben hacerse correcciones sobre un etiquetado incorrecto.

Las PPT pueden realizarse con suero o plasma, dependiendo de las técnicas utilizadas. El plasma es más apropiado para sistemas automatizados (columnas de gel), y el suero para el sistema manual (tubo).¹³ Cuando se utiliza plasma, los anticuerpos (acs) débiles que fijan complemento pueden pasar desapercibidos. Al utilizar suero, la hemólisis puede indicar una reacción positiva en el tipeaje ABO inverso o con algunos acs irregulares a 37 °C. Muestras incompletamente coaguladas pueden generar pequeños coágulos de fibrina que atrapan eritrocitos y pueden causar reacciones falsas positivas. Igualmente sucede en muestras de pacientes anticoagulados, para lo cual debe añadirse trombina o sulfato de protamina y de esta manera corregir el problema. Con el fin de evitar interferencias cuando la muestra se toma de una línea venosa, se debe lavar con solución salina, descartar 5 mL de la línea y luego hacer la extracción. Especímenes lipémicos o hemolizados pueden crear dificultades en la evaluación de los resultados de las pruebas. Las muestras hemolizadas pueden dificultar la interpretación de hemólisis inmune *in vitro*. Cada institución debe tener normas para el uso y limitaciones de este tipo de muestras. Se ha demostrado que muestras que carecen de criterios de aceptabilidad fueron cuarenta veces más susceptibles de generar discrepancias de grupo.¹⁴

Tiempo para la toma de la muestra y almacenamiento

En caso de que el paciente haya sido transfundido o haya tenido un embarazo en los últimos tres meses, la muestra debe tomarse durante los tres días antes de la transfusión para conocer su estatus inmunohematológico en ese momento.¹⁵ Las transfusiones o embarazos recientes pueden estimular la producción de acs inesperados. Las mismas consideraciones se toman en caso de que no se conozcan los antecedentes. Si la muestra tiene un día de tomada, la sangre preparada se transfundirá en los dos días siguientes.⁴ Si se tiene la seguridad de que no ha habido transfusiones o embarazos en los últimos tres meses, no hay limitación en el tiempo para la extracción,^{1,5} aunque cada laboratorio debe establecer sus límites según sus posibilidades de almacenamiento. Las muestras de sangre total almacenadas sufren deterioro con el tiempo, por lo que se recomienda conservarlas hasta por siete días en refrigeración. Los acs pueden mantenerse estables en congelación, pero el almacenamiento separado puede conllevar riesgos de identificación incorrecta al momento de usarla para una PC. Se sugiere que el suero o plasma no se almacene por más de tres meses.⁴

La muestra pretransfusional y el segmento de la donación deben guardarse en refrigeración durante un mínimo de tres días postransfusión, con el fin de verificar el grupo ABO en caso de reacción hemolítica transfusional (RHT) aguda. El Comité Británico de Estandarización Hematológica recomienda que el suero o plasma del receptor se guar-

de por siete a catorce días, con el propósito de hacer las evaluaciones pertinentes en caso de reacción RHT tardía.⁴ El Manual Técnico y los Estándares de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB) recomiendan el almacenamiento por siete días después de la transfusión o hasta diez días después de la PC si la muestra se tomó tres días antes.^{1,13}

Pruebas serológicas

Cuando la muestra y la solicitud llegan al ST, el técnico deberá revisar las identificaciones y asegurar que la información es consistente y completa. Errores que parecen pequeños o insignificantes pueden asociarse a alto riesgo en la mala identificación del receptor.¹⁴

Si todo está correcto se procederá a realizar las PPT para asegurar la compatibilidad entre el donante y el receptor.

Pruebas en el receptor

Los registros de las pruebas realizadas con anterioridad deben conservarse para ser comparados con los resultados actuales, sea cual fuere el método disponible (en papel o automatizado). En caso de discrepancias, deben ser resueltas antes de transfundir.

Tipificación ABO y Rh (D): El tipeaje ABO es la prueba que determinará cuáles antígenos (ags) de este sistema están presentes en la membrana eritrocitaria. Consta de dos fases: la celular o directa, en la cual se utilizan reactivos monoclonales comerciales para detectar la presencia de los antígenos A y/o B. Y la fase sérica o inversa, en la cual el plasma o suero del paciente reacciona con células comerciales A₁ y B,

aunque también pueden prepararse en el laboratorio utilizando la lectina anti-A₁ para la selección de las células A₁. Ambas partes son complementarias y la reactividad se expresa por aglutinación. Por ejemplo, un paciente de grupo "O" que no tiene ags A ni B, tiene en su suero anti-A y anti-B (Ley de Landsteiner).¹⁶ Existen circunstancias en las que la prueba celular no coincide con la prueba inversa; a esto se le llama discrepancia de grupo. Siempre hay que descartar errores técnicos o humanos. En caso de discrepancias, deben ser resueltas antes de la transfusión. Si no es posible, se seleccionarán eritrocitos "O".

El tipeaje completo debe realizarse en todo paciente que vaya a ser transfundido por primera vez. En caso de transfusiones sucesivas, el tipeaje puede abreviarse solamente con la prueba directa. Para ello se requiere que los procesos sean automatizados y que los registros anteriores (últimos doce meses) estén disponibles. Se debe garantizar que se realizó el tipeaje completo previamente y que además se hizo la verificación del grupo con una segunda muestra, a manera de minimizar la posibilidad de error con la primera muestra, que se ha estimado en 1:2.000.^{8,17}

En cuanto al Rh (D), debe realizarse con reactivo anti-D monoclonal IgM, el cual no debe detectar variantes D^{VI}. En ausencia de automatización se recomienda hacer la prueba por duplicado con el mismo reactivo o con dos diferentes. Debe utilizarse un control para evitar interpretaciones falsas positivas. Si surgen problemas en la tipificación, se deberán utilizar eritrocitos Rh (D) negativo. La detección del D débil, no

debe realizarse en los receptores,^{13,18} ya que se considerarán como Rh (D) negativo y recibirán eritrocitos negativos para evitar inmunización. Hay centros que prefieren determinar el D débil en los pacientes con el fin de evitar consumir eritrocitos negativos sin necesidad.⁵ Con esta medida se corre el riesgo de que el receptor sea D parcial y se sensibilice, o que aun siendo D débil ocurra lo mismo.⁴ Para la determinación del D débil hay que utilizar reactivo anti-D bioclonal (IgG más IgM). Si el resultado es positivo, se debe realizar la prueba de AGH directa, y de resultar también positiva se invalida el D débil. Existen consideraciones particulares para el ahorro de sangre Rh negativo.⁴

La determinación de los ags C, c, E y e del sistema Rh junto al ag K del sistema Kell deberá realizarse en pacientes que serán politransfundidos (fundamentalmente los que sufren de anemias hemolíticas congénitas), con el fin de utilizar sangre negativa para estos ags y evitar alosensibilización.¹⁹

Para la transfusión de plaquetas, plasma o crioprecipitado, se puede utilizar la información histórica del tipeaje del paciente en caso de que exista, pero se recomienda que este se haya realizado al menos con dos muestras diferentes.

Se utilizarán controles negativos y positivos según lo disponga el laboratorio. Por lo general, se deben realizar cuando se cambia de lote o al iniciar el trabajo en el analizador automatizado. Si se trabaja manual, con tubo o microplato, se deben incluir en cada tanda de pruebas. Cuando se usan equipos automatizados, los controles se evalúan de la misma manera que una muestra

de paciente, una vez cada doce horas mientras esté funcionando. Se usa control del diluyente cuando el fabricante lo recomienda, si hay evidencia de un fuerte ac frío o cuando existe autoaglutinación. En este caso, hay que lavar con salina caliente para disminuir la interferencia y mejorar las reacciones.

Detección e identificación de anticuerpos irregulares. El objetivo de la DAI es demostrar la existencia de la mayoría de los acs con significación clínica (ASC). Lo ideal es que detecte poco los acs clínicamente insignificantes y que el procedimiento se realice en el menor tiempo posible.

Existen acs que ocurren naturalmente, como los anti-A y anti-B del sistema ABO y otros que se denominan acs irregulares o inesperados. Estos pueden ser llamados aloanticuerpos (aloacs) cuando se producen contra un ag que el individuo no posee, o autoanticuerpos (autoacs) cuando reaccionan contra sus propios ags.

Los ASC son aloacs de tipo inmune ocasionados mayormente por transfusiones o embarazos previos. La significancia clínica se establece con base en la posibilidad de ocasionar RHT, notable reducción de la sobrevivencia de los eritrocitos transfundidos y enfermedad hemolítica del feto y recién nacido. La mayoría reacciona a 37 °C y por AGH.¹

Para la DAI, el suero o plasma del paciente reacciona contra dos (o tres) células comerciales de grupo "O", cuyos fenotipos o perfiles antigénicos han sido muy bien seleccionados. Una célula será R₁R₁ y la otra R₂R₂. La idea es que al menos dieciocho ags se encuentren representados en ellas: D, C, E, c, e, M, N, S, s, P, Le^a, Le^b, K, k, Fy^a, Fy^b,

Jk^a, y Jk^b.²⁰ Hay acs (contra los sistemas Rh, Duffy, Kidd, etc) que demuestran el llamado efecto de dosis, que consiste en que reaccionan más fuerte con células homocigotas (doble dosis) que con heterocigotas. En el Reino Unido se recomienda que las células detectoras de acs deben ser homocigotas para los ags Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S y s.⁴ En los EUA no hay requerimiento para esta recomendación.²¹

Para disponer de homocigosidad en la mayoría de los antígenos se requieren tres o cuatro células. En caso de que no se disponga de esta alternativa, el técnico debe tenerlo en cuenta al momento de hacer las interpretaciones, sobre todo cuando el suero contiene acs en bajo título. La presencia de ags de baja prevalencia en las células rastreadoras permite la detección de acs que usualmente no son detectados al realizar la PC. La detección de acs previa a la PC permite reconocer e identificar la presencia de ASC, y de esta manera, seleccionar los glóbulos rojos apropiados para transfundir. Pero en la práctica muchas veces se realizan ambas pruebas en forma simultánea por limitaciones de tiempo.²¹ Si la DAI es negativa existe 99% de probabilidades de que la prueba de compatibilidad también lo sea.²² Pero si es positiva, dependiendo de la(s) especificidad(es)

puede dificultarse la consecución de sangre compatible.

El riesgo de no detectar ASC que pudieran ser detectados por la PC en fase de AGH es muy pequeño. Las limitaciones de la detección de acs son: a) que el anticuerpo esté en bajo título y demuestre efecto de dosis; b) que el ag no esté presente en dichas células (ag de baja prevalencia) aunque la presencia de estos acs también es muy poco frecuente;²³ c) que existan acs contra ags no expresados en las células rastreadoras (el ag f no está presente en los eritrocitos R₁R₁ ni R₂R₂ sino en rr); d) que los acs sean anti-A o anti-B; e) que los ags se hayan deteriorado en el almacenamiento y reaccionen mejor con los eritrocitos frescos en la PC. Existen estudios en la literatura²⁴ en los que se ha cuantificado el riesgo de no detectar ASC y seleccionar una sangre incompatible, al no realizar la PC hasta la fase de AGH (Tabla 1). El riesgo de RHT realizando la PC solo a centrifugación inmediata se ha calculado en 1:260.000.²¹

Evaluando las especificidades de los acs contra ags de baja prevalencia que pueden dejar de detectarse usando dos células rastreadoras (anti-Wr^a, -Lu^a, -Co^b, etc), se ha podido inferir que aun utilizando tres células el riesgo es prácticamente igual.^{21,24} Diferentes estudios han demostrado que el riesgo de

Tabla 1. Frecuencia de anticuerpos de significación clínica no detectados por el rastreo de anticuerpos y detectados por la prueba cruzada

Nº de muestras	Nº de pruebas cruzadas	Acs no detectados en el rastreo	Riesgo de no detectar anticuerpos	
			Por muestra	Por prueba cruzada
318.675	551.990	75	1:5494*	1:10.615*

*Se tomaron en cuenta solo los anticuerpos de significación clínica. Datos tomados de Garratty G²⁰

que un paciente reciba sangre incompatible porque el laboratorio no detecte un ac de baja prevalencia que potencialmente sea un ASC y que además el paciente reciba eritrocitos positivos para dicho ag, es extraordinariamente pequeño (1:500.000 a 1:1.000.000 transfusiones).^{21, 25}

Los ASC pueden hacerse indetectables con el tiempo. Entre el 30% y 35% de los acs se hacen indetectables al año y cerca del 50% después de los diez años,¹ de allí la importancia de revisar los registros previos.

Las células rastreadoras de acs también deben ser controladas. Usualmente se utilizan antisueros de bajo título para evaluar los ags D, c y Fy^a.⁴ El autocontrol y la prueba de AGH directa no son requeridos en las PPT, aunque pueden ser de utilidad en pacientes recién transfundidos para la detección temprana de acs emergentes.

En cuanto a los métodos y técnicas se tiene:

Métodos en tubo

- *Técnica en salina*: Es la más simple y económica. Se mezclan dos gotas del plasma o suero y una gota de suspensión globular al 3%-5%, se centrifuga y se lee. Luego se incuba a 37 °C por 30 a 60 minutos, se centrifuga y se lee. Por último se lava con solución salina y se lee por AGH indirecta. Dado el largo tiempo de incubación, está en desuso.
- *Albúmina*: La albúmina bovina al 22% se usa como potenciador antes de incubar a 37 °C. Esto aumenta la sensibilidad de la reacción ag-ac y reduce el tiempo de incubación a

30 minutos. Se lee por AGH indirecta.

- *Baja fuerza iónica (LISS)*: Es la más utilizada. Acorta la incubación a 10 minutos. Las células pueden suspenderse en LISS o utilizarlo como un aditivo a la mezcla suero-células antes de la incubación a 37 °C. Es muy importante seguir las instrucciones del fabricante y respetar los volúmenes. Se lee por AGH. Las células suspendidas en LISS tienen una duración de un día porque algunos ags como el Fy^a se deterioran rápidamente en este medio.²⁶
- *Enzimas*: No son utilizadas en la DAI porque destruyen o debilitan ciertos ags como el M, N, S, s, Fy^a, Fy^b, etc, por lo que un suero con acs de esas especificidades no reaccionaría. Aumentan la sensibilidad para los acs del sistema Rh, Kidd, P, I y Lewis.
- *Polietilenglicol (PEG)*: Promueve la detección de ASC y decrece la posibilidad de detección de los acs insignificantes. Se debe evitar centrifugar antes del lavado porque se produce agregación celular, lo cual impide que se dispersen y que se pueda interpretar correctamente la reacción. Después de la incubación con PEG debe lavarse inmediatamente con salina y leer por AGH.

Siempre que se agregue el reactivo de AGH (poliespecífico o anti-IgG) y la reacción resulte negativa, se deberá validar agregando células sensibilizadas (células control de Coombs) que luego de centrifugar resultará una reacción positiva en campo mixto.

Métodos sin tubos

- *Pruebas de adherencia de eritrocitos a fase sólida:* con esta metodología, los ags de los eritrocitos o los acs son inmovilizados en pocillos de microplaca para detectar interacciones ag-ac. Después de la incubación del suero con las células inmovilizadas se lava y luego se le agregan eritrocitos cubiertos con anti-IgG; se centrifuga y se lee. Será positivo si las células se adhieren difusamente sobre la pared del pocillo, y negativo si resulta un *pellet* o botón en el fondo del pocillo.
- *Tecnología de columnas de aglutinación:* utiliza gel o perlas de vidrio para atrapar las células aglutinadas. Las presentaciones comerciales utilizan tarjetas con varios microtubos que permiten la realización de varias pruebas simultáneas. Los eritrocitos interactúan con los acs en cámaras dispuestas en la parte superior de cada columna. El medio de la columna separa las células aglutinadas que se mantienen en la parte superior de las no aglutinadas que se van al fondo. No se requiere lavado.
- *Plataformas automáticas:* realizan múltiples pruebas utilizando diferentes tecnologías (fase sólida, columnas de aglutinación, etc). Toda la ejecución de la prueba desde el pipeteo de la muestra hasta la interpretación, la hace la máquina utilizando un sistema de identificación de código de barra. Estos sistemas pueden interconectarse con el sistema de información del laboratorio para el reporte de resultados.

Identificación de anticuerpos. Es el próximo paso a seguir después de que se ha detectado un ac irregular. Existe una serie de circunstancias en las que la PC puede ser positiva, haya o no DAI positiva y viceversa (Tabla 2). Se utilizan las mismas técnicas que en la DAI, es decir, pruebas de aglutinación estándar y AGH indirecta. Se realizarán evaluaciones más complejas, según los hallazgos que se vayan obteniendo en el estudio (Tabla 3). En esta fase evaluativa, siempre es importante considerar los datos de la historia clínica del paciente.

Para la identificación de la especificidad del o de los acs se requiere un panel de células (de ocho a catorce células) cada una con un perfil antigénico diferente y conocido para los grupos mayores. Usualmente son comerciales y de grupo "O". La selección de estas células se hace de tal manera que permite distinguir, conforme las reacciones sean positivas o negativas, la especificidad de los aloacs más comunes. Para cada ag debe haber al menos dos células que lo expresen y dos que no lo expresen. Debe evitarse el solapamiento de especificidades frecuentes e incluirse células homocigotas para los acs comunes que demuestran efecto de dosis. Siempre debe correrse en paralelo un autocontrol. Estos paneles, al igual que las células rastreadoras, vienen con unos papeles o antigramas en los que se refleja la constitución fenotípica de cada célula (Figura 1). Según los estándares del Comité Británico⁴ debe haber al menos una célula de fenotipo R_1R_1 y $R_1^W R_1$. Esas células deben expresar los ags K, k, Fy^b , Jk^a , Jk^b , S y s. Debe haber al menos una célula

Tabla 2. Causas de pruebas pretransfusionales positivas

<p>DAI negativa, PC inmediata incompatible: Incompatibilidad ABO Poliaglutinación en los eritrocitos del donante Anti-A₁ en el suero de individuo A₂ o A₂B Aloanticuerpos reactivos a TA Formación de rouleaux Autoanticuerpos fríos Anti-A o anti-B adquiridos pasivamente</p>
<p>DAI negativa y PC incompatible por AGH: AGH directa positiva en las células del donante Anticuerpos que reaccionan con células con expresión fuerte de un ag particular (efecto de dosis) o variación en la fuerza antigénica (P₁) Anticuerpo contra antígeno de baja prevalencia Anti-A o anti-B adquiridos pasivamente</p>
<p>DAI positiva y PC compatible: Auto anti-IH (-H) o anti Le^{bH} en unidades no grupo "O" Anticuerpos contra el diluyente del reactivo Anticuerpos que demuestran efecto de dosis y las células del donante son heterocigotas Unidad carente del antígeno correspondiente</p>
<p>DAI positivo, PC incompatible, autocontrol negativo: Aloanticuerpos</p>
<p>DAI positivo, PC incompatible, autocontrol positivo y AGHD negativa: Anticuerpos contra algún componente del medio potenciador Formación de rouleaux</p>
<p>DAI positivo, PC incompatible, autocontrol positivo y AGHD positiva: Aloanticuerpo causando reacción hemolítica tardía o reacción serológica tardía Autoanticuerpos adquiridos pasivamente (Ig IV) Autoanticuerpos fríos o calientes Formación de rouleaux</p>

Tomado del Technical Manual 16th editions AABB¹

Tabla 3. Identificación de anticuerpos con autocontrol negativo

Patrón de reactividad	Posibilidad o sospecha	Conducta a seguir
Algunas células reactivas en la misma fase y con similar intensidad	Anticuerpo único	<ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar panel para análisis de exclusión 2. Realizar fenotipaje dirigido en las células del paciente 3. Realizar panel dirigido
Algunas o todas las células reactivas en diferentes fases y con diferente intensidad	Múltiples anticuerpos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar fenotipaje extendido de las células del paciente 2. Considerar efecto de dosis 3. Cruzar la muestra con células de fenotipo ampliado similar al del paciente. Si es negativo, seleccionar células para panel dirigido
Todas las células reactivas en la misma fase y con la misma intensidad	Anticuerpo contra antígeno de alta prevalencia o múltiples anticuerpos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar fenotipaje extendido de las células del paciente 2. Considerar efecto de dosis 3. Cruzar la muestra con células de fenotipo ampliado similar al del paciente. En caso de incompatibilidad se presume que sea un Ac contra ag de alta prevalencia. Enviar a laboratorio de referencia
Algunas reacciones débilmente reactivas que no coinciden con anticuerpos comunes	Anticuerpos débilmente reactivos o anticuerpos demostrar efecto de dosis	<ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar fenotipaje extendido de las células del paciente 2. Hacer panel dirigido con células homocigotas para antígenos que el paciente carece 3. Uso de técnicas que incrementen la reacción ag-ac
Solo una célula reactiva	Anticuerpo contra antígeno de baja prevalencia o contra el sistema HLA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Utilizar células que posean antígenos de baja prevalencia o con reactividad fuerte para antígenos HLA conocidos 2. Enviar a laboratorio de referencia

Figura 1. Panel para identificación de anticuerpos

	Células	Rh-hr								MNSs					Kell				P	Lewis		Duffy		Kidd		Resultados		
		D	C	E	c	e	f	C ^w	V	M	N	S	s	K	K	Kp ^a	Js ^a	P1	Le ^a	Le ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	TA	LISS 37°C	AGH (Anti-IgG)	
1	R1R1	+	+	0	0	+	0	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+				
2	R1R1 ^w Sc:2	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	+	0				
3	R2R2	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	+				
4	r´r	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0				
5	r´´r	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+				
6	rr	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	0	+				
7	Rr	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+				
8	R ₀ r	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+				
9	rr	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	0	+	+				
10	r´r Yt(b+)	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	0	+	+	+				
11	R1R1	+	+	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+				
AC																												

+: presencia del ag, 0: ausencia del ag, AC: autocontrol, AGH: anti-globulina humana.

R₂ R₂, r´r y r´´r y tres células de fenotipo rr, que incluya al menos una K+, y en conjunto que haya expresión homocigota de k, Jk^a, Jk^b, S, s, Fy^a y Fy^b. Las células pueden tener información adicional, según la presencia de ags de baja prevalencia. En la parte inferior al conjunto de células fenotipadas existe una línea para colocar el fenotipo del paciente. La última columna se utiliza para colocar los resultados, y la última línea de dicha columna, para el reporte del autocontrol.

Un solo panel puede ser insuficiente para la identificación de combinaciones de acs comunes. Para ello es recomendable el uso de dos paneles, con lo cual se aumenta la probabilidad de identificación y de exclusión de ASC.

En una mezcla de acs, el uso de panel tratado con enzimas aumenta la posibilidad de una correcta identificación, si al menos uno de ellos está dirigido contra un ag destruido o afectado por enzimas.²⁷

Si el paciente tiene acs identificados con anterioridad, estos pueden afectar la selección del panel. Si por ejemplo, un paciente tiene un anti-e no es de mucha ayuda utilizar un panel ordinario donde nueve de diez células son e + (positivo). Para ello es recomendable hacer un panel con células seleccionadas e – (negativo). El fenotipaje del paciente es otro procedimiento que ayuda a seleccionar las células del panel que faciliten la exclusión o confirmen las especificidades.

Las metodologías más empleadas son la tradicional en tubo y las columnas de gel.

Interpretación de los resultados. Inicialmente se deben revisar los resultados obtenidos y observar cuántas células reaccionan y la fase en la que los acs aglutinan (a centrifugación inmediata, si se incrementa o aparece la reactividad al añadir un medio potenciador, o si se detecta solo por AGH), la fuerza de la reacción y la reactividad del autocontrol. Estas apreciaciones iniciales ayudan a discernir si se trata de uno o varios acs, si pudiera haber alo y/o autoacs y orientan hacia las posibles especificidades según el patrón de reactividad. La realización del panel desde centrifugación inmediata permite la detección de acs que reaccionan a temperatura ambiente (como anti-M, -N, -P1, -I, -Le^a y -Le^b), los cuales pueden aumentar su reactividad con medios potenciadores y detectarse en las fases subsiguientes. Hay quienes omiten esa fase, ya que los acs que reaccionan a bajas temperaturas tienen poca o ninguna significancia clínica. Hay acs como el Jk^a y Le^a que pueden detectarse por lisis *in vitro* a 37 °C, si se utiliza suero.

Cuando existe un único ac es sencillo establecer la especificidad según las células que resulten positivas o negativas en el panel. Pero cuando no es posible hacerlo, podríamos estar en presencia de múltiples acs, de ac con efecto de dosis o de variación en la expresión antigénica.

*Regla de exclusión.*²⁸ Una vez registrados los resultados en el antigrama, se evalúa el perfil antigénico de la primera célula que arroje resultados

negativos. Una forma práctica es colocar una hoja de papel por debajo de las reacciones de cada célula del panel que resulte negativa, comenzando por la primera, para ir marcando solamente los ags que resulten negativos y excluir tentativamente los positivos, ya que el suero no reaccionó contra ellos. Las posibilidades que queden serán evaluadas de la misma forma a través de la próxima célula negativa, lo cual permitirá excluir aquellas que inicialmente fueron consideradas porque la reacción fue negativa y luego en esa otra célula aparece reactividad. Así sucesivamente hasta evaluar todas las células negativas. Al final, se obtienen todas las especificidades posibles según los ags que no lograron excluirse y se compara la reactividad del suero problema con las del panel. En ocasiones el patrón coincide perfectamente con una especificidad determinada, pero en otras no. Este método de exclusión tiene la desventaja de que si el ac está en bajo título y las células para dicho ac están en forma heterocigota, puede no haber reactividad y dificultarse la identificación; por lo tanto, durante el proceso evaluativo solo se excluirá una especificidad si el ag de la célula correspondiente se encuentra en forma homocigota. Cuando se identifica la especificidad tentativa de un ac se espera que las células del paciente carezcan de dicho ag. Hay especificidades que no es posible excluir las porque las reacciones pueden estar solapadas, para lo cual se deben realizar pruebas adicionales con células seleccionadas.

Panel dirigido. Se diseña con células seleccionadas que permiten excluir las diferentes especificidades plantea-

das. Estas células deben ser en lo posible homocigotas para los correspondientes ags, y serán escogidas de tal manera que cada una tenga presencia antigénica solo de una de las especificidades posibles y ausencia de las otras para poder hacer la exclusión.

Acs contra ags de alta prevalencia. Se sospecha su presencia cuando la reactividad en el panel es de la misma intensidad con todas las células. Pueden presentarse junto a acs comunes, dificultándose su identificación. Para ello se suele hacer adsorción con células de igual fenotipo que las del paciente, pero incompatibles con su suero, con el fin de adsorber el ac contra ag de alta prevalencia y dejar libres los acs comunes fácilmente identificables con un panel. Dada la rareza de estos acs y de no contar usualmente con antisueros específicos, esos casos deben manejarse en laboratorios de referencia.

Autocontrol. Consiste en hacer reaccionar el suero con las propias células del paciente, de la misma forma que con el panel. Si resulta positivo por AGH indirecta se debe realizar la prueba de AGH directa. Si ésta resulta positiva hay que hacer consideraciones diagnósticas muy cuidadosas como la presencia de autoacs, acs contra droga, reacción serológica o RHT tardía. La historia clínica será de gran valor. El autocontrol es muy útil para diferenciar la presencia de panaglutininas calientes de acs contra ags de alta prevalencia.

Para establecer la probabilidad de la especificidad de un ac se requiere que tres células positivas resulten positivas y tres negativas resulten negativas (esto está basado en el método exacto de Fisher).²⁹ Existe un método más liberal

(Harris y Hochman)³⁰ que permite un valor de probabilidad (p) $\leq 0,05$ que se logra con dos células reactivas y tres no reactivas, o una reactiva y siete no reactivas; también dos reactivas y una no reactiva puede ser aceptable.³¹

Problemas complejos. No siempre resulta sencillo llegar a la especificidad del o de los acs. Cuando esto sucede se requiere utilizar procedimientos serológicos especiales. En los casos en que se detecta la prueba de AGH directa positiva, y se precisa hacer el diagnóstico específico, se debe realizar una serie de procedimientos que están descritos en sus capítulos correspondientes.

Fenotipaje autólogo. Cuando hay mezclas complejas de acs, el fenotipaje extendido es de gran ayuda como guía orientadora de las posibles especificidades. El problema se presenta cuando el paciente ha sido transfundido en los últimos tres meses y no se dispone de una muestra pretransfusional. Existen técnicas que permiten la separación de los eritrocitos propios de los transfundidos.

Centrifugación. Se basa en la diferencia en la densidad de los eritrocitos nuevos liberados a la circulación, comparada con la de los eritrocitos maduros transfundidos. Se puede realizar cuando han pasado tres o más días de la transfusión. Es inefectiva si el paciente no produce eritrocitos por falla medular o presenta anemia drepanocítica. En este último caso no resulta factible la separación, porque el drepanocito es una célula densa, pero también es una célula resistente a las soluciones hipotónicas. Por lo tanto, se emplea el lavado con soluciones hipotónicas para producir la lisis de los eritrocitos normales y mantener los drepanocitos.

Genotipaje molecular. Es otra alternativa cuando el paciente ha sido recientemente transfundido. Se realiza en el ADN de los leucocitos. Como estas células tienen una vida media corta, no hay interferencia con los leucocitos del paciente.³²

Técnicas que aumentan la reactividad. Se utilizan cuando la reactividad del ac es muy baja o cuando se sospecha la especificidad, pero no puede ser confirmada.

LISS y PEG: aumentan la reactividad y reducen el tiempo de incubación como ya se explicó.

Tratamiento químico: se refiere al uso de enzimas proteolíticas como la papaína y la ficina. Tienen la propiedad de eliminar la reactividad de los acs que reaccionan contra los ags que son destruidos o debilitados por ellas y a la vez de incrementar la reactividad de otros. Esta propiedad es útil para separar las mezclas de acs. La significancia clínica de los acs que solo reaccionan con células tratadas con enzimas es cuestionada.³³ También pueden utilizarse reactivos sulfidrilos como el ditionitrito (DTT) y el 2-mercaptoetanol (2-ME), que por una parte clivan los puentes disulfuros que mantienen juntas las subunidades de la IgM (pudiéndose eliminar la reactividad de este tipo de ac) y por otra destruyen ags del sistema Kell; o el reactivo ZZAP que contiene enzimas proteolíticas y DTT que destruyen ags del sistema Kell y otros sensibles a las enzimas. El tratamiento con EDTA/ HCl-Glicina destruye ags de los sistemas Bg y Kell y al ag Er^a. La cloroquina debilita la expresión de los ags HLA clase I y otros como los del sistema Rh.

Reducción de la temperatura: se utiliza para incrementar la expresión de acs fríos. Un autocontrol reactivo indica la presencia de autoacs fríos.

Panel precalentado: se usa para detectar e identificar acs que se unen al ag a 37 °C. Es útil cuando se evalúan sueros de pacientes con autoacs fríos que pueden enmascarar ASC. Se ha demostrado que esta técnica puede disminuir la reactividad de acs potencialmente significativos y acs débiles pueden pasar desapercibidos.³⁴

Incremento de la reacción suero/células: se utiliza para aumentar la reactividad de acs en baja concentración. La proporción puede llegar a ser hasta 10:1. No se debe utilizar con LISS o PEG. Al momento de los lavados post incubación a 37 °C, se debe descartar el exceso de suero para evitar que queden inmunoglobulinas remanentes que puedan inactivar al reactivo de AGH.

Incremento del tiempo de incubación: solo se puede incrementar hasta 60 minutos las incubaciones en salina o en albúmina.

Alteración del pH: la reducción del pH utilizando un volumen de HCL 0,1N en nueve volúmenes de suero, baja el pH a 6,5 lo cual es útil para incrementar la reactividad de los anti-M en bajo título que reaccionan muy débil o no reaccionan con células heterocigotas.

Técnicas de inhibición. Ciertas sustancias antigénicas solubles se utilizan para neutralizar anticuerpos que pueden causar dificultad en la identificación de la especificidad de otros acs no neutralizables. Entre ellas: sustancia Lewis, sustancia P1, sustancia Sd^a, sustancia Chido y Rogers. Cuando se

utilizan estas técnicas debe correrse en paralelo un control con salina.

Otras técnicas útiles para la separación y caracterización de mezclas de acs.

- *Adsorción*: consiste en remover un ac al ponerlo en contacto con células positivas para el correspondiente ag. Luego de ocurrida la adsorción, se separa el suero de las células; el suero es evaluado para detectar la especificidad del ac o los acs no adsorbidos. También es posible eluir los acs que se fijaron a la membrana celular y evaluar su especificidad. Cuando hay alguna especificidad conocida en una mezcla de acs, se prefiere utilizar células que los puedan adsorber para dejar libres a los no conocidos. Usualmente se utiliza un volumen de suero por volumen de células lavadas, pero para aumentar la posibilidad de captación de acs puede incrementarse la proporción celular. Es muy recomendable tener tipificado al personal del laboratorio o del servicio para contar con suficiente volumen celular para estos procedimientos.
- *Elución*: disocia los acs fijados a la membrana celular. Para ello se utilizan métodos físicos o químicos dependiendo del tipo de investigación; también hay estuches comerciales de elución. Una vez obtenido el eluido, se evaluará a través de un panel de células. Es frecuente utilizar la adsorción y elución como procedimientos combinados.
- *Titulación*: es útil en el seguimiento de las mujeres embarazadas sensibilizadas y para la identificación

de los acs llamados de alto título y baja avidéz. Estos acs se caracterizan por dar una reacción débil con el suero no diluido que se mantiene de igual forma aun en diluciones de 1:2048. Los resultados de la titulación pueden sugerir la presencia de múltiples acs al diferir según las células utilizadas.

Pruebas en el donante

Se debe confirmar siempre el grupo ABO; el Rh (D) solamente en los identificados como Rh (D) negativo, aunque no es necesario verificar el D débil.^{1,4-5} Las pruebas se realizarán con una muestra del segmento de la donación. La muestra del segmento (el segmento sellado con los eritrocitos sobrantes o un segmento completo tomado de la bolsa) debe quedar almacenada junto con la muestra pretransfusional. Puede colocarse dentro de un tubo con la identificación del receptor, la fecha en que se realizó la PC y el serial de la donación.

La transfusión debe ser, hasta donde sea posible, de igual grupo ABO y Rh (D) que el paciente. En caso de transfundirse sangre Rh (D) positivo a paciente negativo, se deberá considerar la administración de inmunoglobulina anti-D, si existe la posibilidad de un futuro embarazo y según el volumen de sangre administrado.³⁵ Si el componente a transfundir tiene más de 2 mL de eritrocitos, debe haber compatibilidad ABO. En pacientes que van a ser politransfundidos y que no están alosensibilizados, debe utilizarse eritrocitos no solo compatibles ABO y Rh (D), sino de igual fenotipo para los antígenos

nos mayores del sistema Rh y para el ag K.³⁶ En el caso de aloinmunización contra antígenos de otros sistemas, se deberá seleccionar eritrocitos negativos

para dichos anticuerpos. En la Tabla 4 se señala la selección de hemocomponentes cuando no hay disponibilidad isogrupo.¹

Tabla 4. Selección de hemocomponentes cuando no hay disponibilidad ABO idénticos

Hemocomponente	Selección
Sangre total	Idéntico al receptor
Eritrocitos	Compatible con el plasma del receptor
Granulocitos	Compatible con el plasma del receptor
Plaquetas	Se acepta cualquier grupo ABO. Aunque se prefieren las ABO compatibles, se recomiendan que sean compatibles con los eritrocitos del receptor
PFC	Compatible con los eritrocitos del receptor
Crioprecipitado	Todos los grupos se aceptan

Tomado del Technical Manual 16th editions AABB1

Prueba cruzada

Es la etapa final del proceso, la cual determina la compatibilidad entre el plasma o suero del receptor y los eritrocitos del donante. Se define la compatibilidad transfusional como la falta de reacción entre los acs del receptor y los ags del donante. La compatibilidad no indica identidad entre ambos, sino que en ese momento no habrá afectación del rendimiento de los eritrocitos transfundidos por causa inmune. La compatibilidad de la transfusión no impide la alosensibilización, ni la respuesta anamnésica en un individuo previamente aloinmunizado.¹ La PC puede ser serológica o electrónica.^{1,4-5}

Se debe realizar siempre antes de transfundir, excepto en situaciones

muy especiales de extrema urgencia. Cuando no se detectan ASC y no hay registros previos de su presencia, solo se requiere la PC inmediata para prevenir incompatibilidad ABO (en salina o electrónica).¹³ En algunos países existe el requisito de que sea rechequeada la compatibilidad ABO por el personal de enfermería en la cabecera del paciente, antes de transfundirse.⁸ En la actualidad, muchos países continúan haciendo la PC hasta la fase de AGH.

Para el uso de PC electrónica o computarizada, el sistema debe estar validado para tal fin, de manera que se asegure que solo sangre o eritrocitos ABO compatibles serán seleccionados para la transfusión.³⁷ El receptor debe tener dos determinaciones diferentes del tipeaje ABO. El sistema debe contener todos

los datos referentes al receptor y a la donación. Debe existir un método que verifique la correcta entrada de los datos antes de la liberación de los componentes y generar una alerta en caso de discrepancias.³⁸⁻³⁹ Estos sistemas reducen la sobrecarga de trabajo, el volumen de muestras requerido para las pruebas y la exposición del personal, y favorecen el mejor uso del inventario de sangre.⁴⁰

Cuando existen ASC, aunque sea por antecedente, la PC debe incluir incubación a 37 °C y fase de AGH.³⁷ La manera más práctica de conseguir sangre compatible en esos casos es cruzando las unidades con el suero o plasma del paciente y verificar la ausencia del ag a la que resulte negativa. Si los acs

detectados no son ASC, no se requiere conseguir sangre negativa para el antígeno, sino compatible a 37 °C y por AGH. Cuando no se puede conseguir sangre compatible, el médico del ST debe involucrarse en la decisión transfusional del paciente.

En cuanto al paciente quirúrgico, antes de que entre en la sala de operaciones, se debe confirmar que el tipeaje ABO/Rh (D) y la DAI están realizados, y si se le solicitó sangre para el acto quirúrgico, debe estar disponible o cruzada de acuerdo con la norma institucional y según el tipo de intervención.⁸⁻¹⁰ En la Figura 2 se muestra un esquema pretransfusional para los pacientes en cirugía programada.

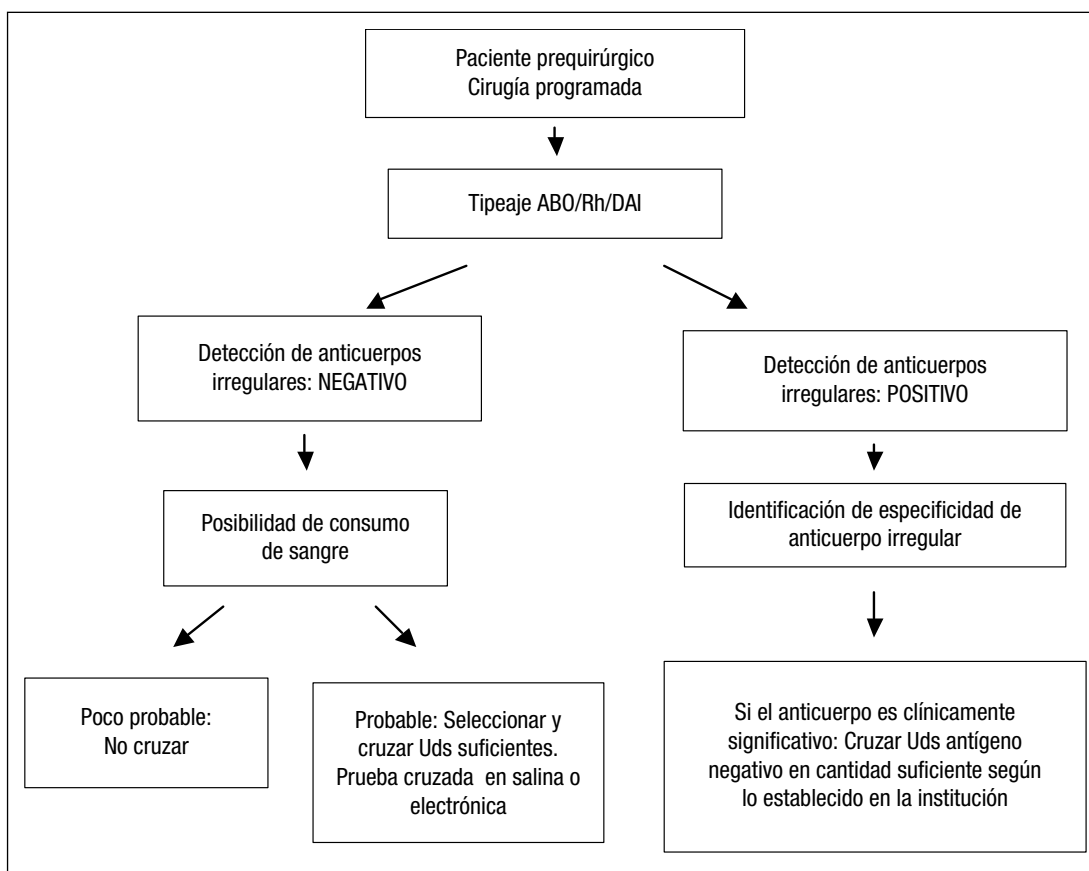


Figura 2. Pruebas pretransfusionales en Cirugía Programada

Pruebas pretransfusionales en neonatos menores de 4 meses^{1,13}

Se debe tomar una muestra para el tipeaje ABO y Rh (D). No se requiere la prueba inversa a menos que su grupo no sea O y vaya a recibir eritrocitos isogrupo que pudieran ser incompatibles con los anti-A y anti-B de tipo IgG adquiridos en forma pasiva de la madre de grupo O. En este caso, la determinación se realiza hasta la fase de AGH con células A₁ y B o con los eritrocitos de la donación. Si la reacción es positiva, el neonato deberá recibir eritrocitos O. Si el neonato solo recibe eritrocitos de grupo O, se pueden omitir las repeticiones de las pruebas durante el tiempo de su hospitalización o hasta que supere los 4 meses de edad.

El suero o plasma materno o del neonato serán utilizados para la DAI y para la PC. Si no hay ASC, no es necesaria la PC. Si existen ASC, se deberá transfundir eritrocitos negativos para el ag correspondiente, y compatibles por AGH humana con el suero o plasma materno o del neonato, hasta que dichos acs hayan desaparecido en el neonato.

Pruebas pretransfusionales en transfusión masiva

Cuando el paciente ha recibido un volumen de sangre equivalente a su volemia en 24 horas, la PC se limita a la forma abreviada en salina o electrónica. La justificación de esta práctica es que en esa situación, la sangre del receptor se ha diluido con la transfundida, y por ende, los acs capaces de causar RHT.

Hay algunos estándares que eliminan la PC; en esos casos el protocolo o procedimiento operativo debe estar escrito. Estos pacientes usualmente reciben productos que contienen plasma y sus aglutininas anti-A o anti-B, por lo que se recomienda hacer la prueba serológica para detectar esta eventualidad.

Pruebas pretransfusionales en pacientes trasplantados

En trasplantes de progenitores hematopoyéticos (PHP), tanto el donante como el receptor deben tener el tipeaje ABO/Rh (D) verificado, titulación de isoaglutininas (IgM/IgG) en caso de incompatibilidad ABO, la DAI y la identificación de los acs en caso de que la DAI resulte positiva. La incompatibilidad ABO es una limitante relativa, ya que los progenitores tempranos no expresan ags ABO. Puede haber incompatibilidad mayor (donante A y receptor O; donante K⁺ y receptor con anti-K), menor (donante O y receptor A) o mixto o bidireccional (donante A y receptor B o viceversa), que manejadas adecuadamente no interfieren con un satisfactorio injerto hematopoyético.⁴¹⁻⁴²

Los receptores de trasplantes de PHP presentan complejidades en la tipificación sanguínea dependiendo de si hay o no incompatibilidad.⁴ En la incompatibilidad mayor, al momento de la infusión del injerto hay que reducir la cantidad de eritrocitos si las aglutininas del receptor están en 1/16 o más. Por otra parte, el nuevo ag trasplantado puede causar hemólisis al reaccionar con las isoaglutininas del receptor que se continuarán produciendo durante los tres o cuatro meses

siguientes. Para reducir este efecto se suele realizar plasmaféresis. Esta hemólisis puede llegar a ser muy grave, y conduce a aplasia pura de serie roja hasta en un 50% de los casos.⁴³ En el período pretrasplante o fase I, las transfusiones serán isogrupo con el receptor. En el período del trasplante propiamente dicho o fase II, los receptores con incompatibilidad mayor o bidireccional deberán recibir eritrocitos O, hasta que las aglutininas sean indetectables por dos semanas consecutivas. Los receptores AB de donantes A o B pueden recibir eritrocitos del mismo grupo que el donante, y los receptores A o B de donantes AB pueden recibir eritrocitos del mismo ABO que el receptor. La transfusión de plaquetas o plasma será preferiblemente del grupo AB o compatibles con el donante y el receptor. Luego, en la fase III o postrasplante, el tipeaje será el del donante y se transfundirá con el grupo del donante.

En la incompatibilidad menor se depletará el plasma del injerto si las aglutininas del donante están en 1/128 o más. En estos casos un nuevo ac ABO aparece por el llamado síndrome del linfocito pasajero, en el cual las aglutininas sintetizadas por los linfocitos del donante destruyen en intensidad variable a los eritrocitos del receptor durante los siete a catorce días sucesivos. La gravedad dependerá del grado de inmunosupresión del receptor, del acondicionamiento, del tipo de trasplante y su procesamiento,⁴³ lo cual puede ocasionar la muerte. En estos casos puede requerirse la eritrocitaféresis con transfusión de eritrocitos compatibles con el donante.

Cuando el donante o el receptor sean Rh (D) negativo, deberán seleccionarse células Rh (D) negativo. Si ocurre rechazo del injerto, la selección de la transfusión debe ser compatible con donante y receptor.^{4,41,43}

En el trasplante de órgano sólido también se debe realizar el tipeaje ABO/Rh y la DAI en el donante y el receptor. Se debe verificar el tipeaje ABO en ambos para evitar errores que puedan llevar a la muerte al receptor. Solo es permitida la incompatibilidad menor (donante O y receptor A), aunque algunos grupos han incurrido en trasplantes incompatibles bajo protocolos especiales y para cierto tipo de órganos.⁴⁴⁻⁴⁵

Igualmente, en los trasplantes sólidos se puede presentar el síndrome del linfocito pasajero que dependerá del contenido linfoide del órgano trasplantado. Aunque es un fenómeno autolimitado, hay que hacerle seguimiento estricto. Para el manejo transfusional de estos pacientes se utilizarán eritrocitos del mismo ABO del receptor, ya que existe la posibilidad de cambiar al grupo del donante si hay incremento de las aglutininas por los linfocitos del trasplante, y la prueba de AGH directa se hace positiva; en ese caso deberán ser compatibles con el plasma del receptor. Los pacientes Rh (D) negativo deberán tener las mismas consideraciones transfusionales que cualquier receptor Rh (D) negativo. Se han detectado casos de linfocitos del donante que producen acs diferentes a los del sistema ABO, los cuales ocasionan hemólisis; se tomarán en cuenta para la selección de eritrocitos compatibles, durante el período en que sean

detectables. Si los acs irregulares los posee el receptor, deberá ser manejado como cualquier paciente sensibilizado.⁴⁶⁻⁴⁷

Conclusión

Las PPT constituyen un conjunto de pruebas insertadas en el proceso transfusional, realizadas con diversas metodologías y técnicas, las cuales deben estar protocolizadas y estructuradas mediante un sistema enfocado en la calidad. Su uso limita el riesgo transfusional en el receptor, al evitar las RHT que pueden llegar a desencadenar alta morbilidad y desenlaces fatales.

Referencias

- Downes, K., Shulman, I. Pretransfusion Testing. In: Roback J, Rae Combs M, Grossman B, Hillyer C. Technical Manual 16th editions AABB, p 437-463.
- Sazama, K. Reports of 355 transfusion-associated deaths: 1976 through 1985. *Transfusion*, 1990; 30:583-90.
- Linden, J. V., Paul, B., Dressler, K. P. A report of 104 transfusion errors in New York State. *Transfusion*, 1992; 32:583-90.
- Milkins, C., Berryman, J., Cantwell, C. et al. British Committee for Standard in Haematology. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedure in blood transfusion laboratories. *Transfusion Medicine*, 2013; 23:3-35.
- Lieb, M., Aldridge, L. Compatibility Testing In: Sally Rudmann. Testbook of Blood Banking and Transfusion Medicine Second Edition. Elsevier Saunders, 2005, pp. 281-317.
- Turner, C., Casbard, A., Murphy, M. Barcode technology: Its role in increasing the safety of blood transfusion. *Transfusion*, 2003; 43(9):1200-1209.
- Murphy, M. F., Casbard, A. C., Ballard, S., Shulman, I., Heddle, N., Aubuchon, J. et al. Prevention of bedside errors in transfusion medicine (PROBE-TM) study; A cluster-randomized, matched-paired clinical areas trial of a simple intervention to reduce errors in the pre-transfusion bedside check. *Transfusion* 2007; 47:771-80.
- Yazer, M. Pretransfusion Testing in: Waters JH, ed Blood Management: Options for better patient care. Bethesda MD: AABB Press, 2008, pp. 137-138.
- SHOT (1996-2010) Serious Hazards of Transfusion annual reports. Disponible en: <http://shotuk.org> (accesado en mayo 2013).
- Stainsby, D., Jones, H., Asher, D., Atterbury, C., Boncinelli, A., Brant, L., et al. Serious hazards of transfusion: a decade of hemovigilance in the UK. *Transfusion Medicine Reviews*, 2006; 20:273-282.
- Informe de Hemovigilancia. Año 2009. Unidad de Hemovigilancia. Área de Hemoterapia 2010. Gobierno de España. Ministerio de Sanidad y Política Social.
- Dzik, W. H., Murphy, M. F., Andreu, G. et al. An international study of the performance of sample collection from patients. *Vox Sang*, 2003; 85:40-7.
- Standards for Blood Banks and Transfusion Services. 27th editions AABB, 2011.
- Lumadue, J. A., Boyd, J. S., Ness, P. M. Adherence to a strict specimen-labeling policy decreases the incidence of erroneous blood grouping of blood bank specimens. *Transfusion*, 1997; 37; 1169-72.
- Shulman, I. When should antibody screening test be done for recently transfused patients? *Transfusion*, 1990; 30:39-41.
- Watkins, W. M. The ABO group system: Historical background. *Transfus Med*, 2001; 11:243-63.
- Murphy, M. F., Stearn, B. E., Dzik, W. H. Current performance of patient simple collection in the UK. *Transfusion Medicine*, 2004; 14:113-21.
- Estándares de la Sociedad Venezolana de Hematología. Elaborado por la comisión de estándares del Grupo Cooperativo de

- Medicina Transfusional de la SVH. Caracas, Venezuela, 2003.
19. Osby, M., Shulman, I. A. Phenotype matching of donor red blood cell units for nonalloimmunized sickle cell disease patients. *Arch Pathol Lab Med*, 2005; 129(2):190-193.
 20. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: The Code of Federal Regulations, 21 CFR 660.3-660.36, current edition. Washington, DC, US Government Printing Office.
 21. Garraty, G. Screening for RBC antibodies-what should we expect from antibody detection RBCs. *Immunohematology*, 2002; 18:71-77.
 22. Garraty, G. The role of compatibility test. *Transfusion*, 1982; 22:169-172.
 23. Maffei, L. M., Johnson, S. T., Shulman, I. A., Steiner, E. Survey on pretransfusion testing. *Transfusion*, 1998; 38:343-349.
 24. Judd, W. J., Commentary: testing for unexpected red cell antibodies – two or three red cell samples? *Immunohematology*, 1997; 13:90-93.
 25. Shulman, I. A. The risk of an overt hemolytic transfusion reaction following the use of an immediate spin cross-match. *Arch Pathol Lab med*, 1990; 114:412-414.
 26. Allan, J., Bruce, M., Mitchell, R. The preservation of red cell antigens at low ionic strength. *Transfusion*, 1990; 30:423-426.
 27. Knowles, S., Milkins, C., Chapman, J., Scot, M. The United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (blood transfusion laboratory practice), trends in proficiency and practice between 1985 and 2000. *Transfusion Medicine*, 2002; 12:11-23.
 28. Rodberg, K., Antibody identification. In: Sally Rudmann. *Testbook of Blood Banking and Transfusion Medicine Second Edition*. Elsevier Saunders, 2005, pp. 318-341.
 29. Fisher, R. A. *Statistical methods and scientific interference*. 2nd ed. Edinburgh, Scotland: Oliver and Boyd, 1959.
 30. Harris, R. E., Hochman, H. G. Revised p values in testing blood group antibodies: Fisher's exact test revisited. *Transfusion*, 1986; 26:494-499.
 31. Kanter, M. H., Poole, G., Garratty, G. Misinterpretation and misapplication of p values in antibody identification: The lack of value of a p value. *Transfusion*, 1997; 37:816-822.
 32. Vege, S., Westhoff, C. M. Molecular characterization of GYPB and RH in donors in the America Rare Donor Program. *Immunohematology*, 2006; 22:143-147.
 33. Issitt, P., Coombs, M., Bredehoeftm S., Campbell, M., Heimer, M., Joyner, L. et al. Lack of clinical significance of "enzyme-only" red cell alloantibodies. *Transfusion*, 1993; 33:284-293.
 34. Leger, R., Garratty, G. Weakening or loss of antibody reactivity after prewarn technique. *Transfusion*, 2003; 43:1611-14.
 35. Pollack, W., Ascari, W., Crispen, J., O'Connor, R., Ho, T. Studies on Rh prophylaxis II: Rh immune prophylaxis after transfusion with Rh-positive blood. *Transfusion*, 1971; 11:340-344.
 36. Osby, M., Shulman, I. Phenotype matching of donor red blood cell units for nonalloimmunized sickle cell disease patients: A survey of 1182 North American laboratories. *Arch Pathol Lab Med*, 2005; 129:190-193.
 37. Reesink, H., Davis, K., Wong, J., Schwartz, D., Mayr, W., Devine, D. et al. The use of the electronic (computer) cross-match- International Forum. *Vox Sang*, 2013; 104:350-364.
 38. Saxema, S., Nelson, J., Osby, M., Shah, M., Kempf, R., Shulman, I. Ensuring timely completion of type and screen testing and verification of ABO/Rh status for elective surgical patients. *Arch Pathol Lab Med*, 2007; 131:576-581.
 39. Engelfried, C., Reesint, H. The use of computer cross-match. *International forum. Vox Sang*, 2001; 8:184-192.
 40. Foley, C., Mould, T., Kennedy, J., Barton, D. A study of blood cross-matching requirements for surgery in gynecological oncology. Improved efficiency and cost saving. *Int J Gynecol cancer*, 2003; 13:889-893.
 41. Szczepioorkowski, Z. Transfusion Support for hematopoietic transplant recipients. In: Roback, J., Rae Combs, M., Grossman, B., Hillyer, C. *Technical Manual 16th editions AABB*, pp. 679-696.

42. Rowley, S., Liang, P. Ulz, L. Transplantation of ABO incompatible bone marrow and peripheral blood stem cell components. *Bone Marrow Transplantation*, 2000; 26:749-747.
43. Davis-Sproul, J., Haley, R., McMannis, J. Collecting and Processing marrow products for transplantation In: Roback, J., Rae Combs, M., Grossman, B., Hillyer, C. *Technical Manual 16th editions AABB*, pp. 765-786.
44. Gloor, J. M., Stegall, M. D. ABO incompatible kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2007; 16:529-534.
45. Warner, P., Nester, T. ABO-incompatible solid-organ transplantation. *Am J Clin Pathol*, 2006; 125(Suppl1):587-594.
46. Ramsey, G., Mintz, P. Transfusion practice in solid organ transplantation. In Mintz PD ed. *Transfusion Therapy Clinical Principles and Practice*, 3rd edition Bethesda, MD: AABB Press, 2011, pp. 339-353.
47. Eastlund, T. Tissue and organ transplantation and the hospital tissue transplantation service. In: Roback, J., Rae Combs, M., Grossman, B., Hillyer, C. *Technical Manual 16th editions AABB*, pp. 437-463.

Transfusión de sangre de fenotipo compatible. Indicaciones actuales

EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ*
ASUNCIÓN PINACHO OYARZÁBAL**
PILAR ORTIZ MURILLO***

Introducción

La transfusión de hematíes de fenotipo compatible, cuando se efectúa con el objetivo de impedir la aloinmunización eritrocitaria, exige una rigurosa selección de los pacientes candidatos. En cada unidad de hematíes existe un elevado número de antígenos eritrocitarios con una cierta capacidad inmunizante; sin embargo, en la práctica, el fenómeno de la aloinmunización resulta relativamente poco frecuente; se estima entre el 0,5% y el 1,5% de la población general. La incidencia entre los pacientes hospitalizados es más alta, aunque en muchos estudios se han

* *Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España.*
emuniz@bst.cat

** *Especialista en Hematología. Servicio de Transfusión Banc de Sang i Teixits Lleida. Barcelona, España.*
apinacho@bst.cat

*** *Directora técnica Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España.*
portiz@bst.cat

incluido anticuerpos clínicamente no significativos o naturales.^{1,2} En un estudio prospectivo realizado con pacientes que habían recibido una media de tres concentrados de hematíes se detectó una incidencia del 8,4%, mucho más alta de la esperada; no obstante, para el estudio se emplearon técnicas muy sensibles incluyendo el examen en fase enzimática o el polibrene, además de la técnica indirecta de la antiglobulina.³

La frecuencia de aloinmunización depende, entre otros factores, de la capacidad inmunogénica de cada antígeno, pero también de ciertas características genéticas presentes en el receptor, así como de su capacidad de respuesta en el momento de la transfusión. Todos estos elementos hacen aconsejable que la selección y la transfusión de hematíes fenotipados esté sujeta a criterios racionales y sostenibles, circunscritos a determinados pacientes que por su dependencia transfusional tienen una mayor probabilidad de inmunizarse. Por el contrario, el coste y las dificultades logísticas que supondría la transfusión indiscriminada de sangre fenotipada no justifican una estrategia basada en la transfusión de hematíes fenotipados para todos los pacientes.

Inmunogenicidad de los antígenos eritrocitarios

La capacidad inmunogénica difiere entre los distintos antígenos eritrocitarios. El ejemplo más estudiado corresponde al antígeno D con índices de sensibilización que oscilan entre el 22% y el 80% según los estudios.^{1,2} En este caso, el fenotipo D de receptor y donante son siempre conocidos; esto nos permite co-

nocer con cierta exactitud la inmunogenicidad del antígeno o, lo que es igual, el riesgo de aloinmunización D cuando un receptor D negativo recibe sangre D positivo. Por el contrario, en el caso de los restantes antígenos, carecemos, en general, de información en torno a su presencia o no en los receptores, ya que habitualmente no se efectúa, salvo excepciones, esta determinación. Para definir la incidencia de aloinmunización de los otros antígenos, se debe realizar un cálculo de probabilidad en el que se contemplan, por una parte, la incidencia del antígeno en una determinada población y la frecuencia estimada o probabilidad de que un receptor negativo para el antígeno en cuestión sea transfundido con sangre portadora del mismo, y por otra, la incidencia con la que el correspondiente anticuerpo es posteriormente identificado en los pacientes transfundidos de la misma población. Esta metodología, inicialmente diseñada por Giblett,⁴ permitió establecer un rango de inmunogenicidad, según el cual el antígeno Kell es el más inmunogénico después de D. Por ejemplo, siguiendo el procedimiento de cálculo anteriormente mencionado obtendríamos los siguientes resultados: la frecuencia del antígeno Kell en población caucásica es de un 8% (un 92% de individuos son Kell negativo), y, por tanto, la probabilidad de que un individuo Kell negativo sea transfundido con hematíes Kell positivo se estima baja; sin embargo, anti-Kell es identificado con una frecuencia muy superior a la esperada en los múltiples estudios realizados sobre aloinmunización, lo que indica que este antígeno es altamente inmunogénico. Por tanto, aunque poco

frecuente, en una situación de incompatibilidad Kell, la probabilidad de que el receptor se sensibilice es elevada. La inmunogenicidad de los restantes antígenos se expresa como una fracción de Kell. Recientemente, esta estimación ha sido ajustada teniendo en cuenta, por una parte, la evanescencia de algunos anticuerpos, y por otra, la presencia en algunos pacientes de anticuerpos naturales no relacionados con la transfusión.⁵ Una vez hechos los ajustes pertinentes se definió un “ranking” de inmunogenicidad que se muestra en la Tabla 1, según el cual el antígeno Kell, el primero de la lista, es hasta 250 veces más inmunogénico que Jk^b, situado en último lugar. En otras palabras, si los pacientes Kell y Jk^b negativo son

transfundidos con hematíes portadores de ambos antígenos, por cada paciente que desarrolle un anti-Jk^b, 250 desarrollarán un anti-Kell.

No se conocen totalmente los factores responsables que pueden influir en esta diversidad inmunogénica, y se postulan algunos mecanismos potenciales. En primer lugar, la magnitud de la diferencia entre el receptor y el donante, o lo “extraño” que el antígeno pueda llegar a resultar para el receptor. Por ejemplo, mientras que la mayoría de los antígenos de los diferentes sistemas son polipéptidos que difieren entre sí en un solo aminoácido como consecuencia de una mutación puntual en la secuencia ADN codificante, el antígeno D es un polipéptido producto de un gen ausente (deleción génica) en la inmensa mayoría de los individuos D negativo de raza caucásica (Tabla 2). A pesar de la homología existente entre los genes *RHD* y *RHCE*, así como entre los polipéptidos D y CE resultantes, el antígeno D resulta necesariamente más “extraño” para un receptor D negativo, ya que éste carece de todo el polipéptido D. En la misma situación se encuentran los receptores de fenotipo nulo para otros sistemas cuando son transfundidos. En estos casos, la probabilidad de que el receptor se sensibilice es potencialmente más elevada.

No obstante, aunque esta posibilidad es muy plausible, sorprende que antígenos que solo difieren entre sí en un aminoácido posean una capacidad inmunogénica tan distinta. Por ejemplo, Jk^a es hasta noventa veces más inmunogénico que Jk^b. Igualmente, Fy^a es unas trece veces más inmunogénico que Fy^b. Estas observaciones indican

Tabla 1. “Ranking” y “scores” de antigenicidad de los antígenos eritrocitarios

Antígeno	Score
K	1.000
Cw	0.700
Lu ^a	0.400
JK^a	0.370
E	0.350
V	0.210
Le ^a	0.160
P1	0.120
c	0.097
M	0.090
Le ^b	0.089
e	0.071
Fy^a	0.064
C	0.055
s	0.014
S	0.013
N	0.007
Fy^b	0.005
JK^b	0.004

Tabla 2. 2a. Polimorfismos de grupos sanguíneos debidos a mutaciones puntuales que concluyen en un cambio de aminoácido en el polipéptido resultante. **2b.** Ejemplo del sistema Kell en el que la mutación puntual T→C implica el cambio de Metionina por Treonina en el residuo 193 de la proteína Kell.

2a.

RH	C/c	E/e		
MNS	M/N	S/s		
Kell	K/k	Kp ^a /Kp ^b	Js ^a /Js ^b	

Duffy	Fy ^a /Fy ^b
Kidd	JK ^a /jK ^b
Lutheran	Lu ^a /Lu ^b

2b.

▶	Gen KEL - Exón 6					
GC	ATG	CAA	TAT	GCG	AAC	→ Kell (K)
	Metionina 193					
GC	ACG	CAA	TAT	GCG	AAC	→ Cellano (k)
	Treonina 193					

que más allá de las diferencias estructurales existen otros factores más influyentes en el grado de antigenicidad de cada antígeno. En este sentido, el complejo mayor de histocompatibilidad parece desempeñar un papel fundamental que puede explicar en parte estas diferencias. Las células presentadoras del antígeno (CPA) extraño del receptor coexpresan moléculas HLA de clase II, cuya especificidad en algunos casos puede suponer una sinergia favorecedora para la respuesta inmune (Figura 1). Estudios realizados en la población europea demuestran que la producción de anti-K es más co-

mún entre los pacientes portadores de una amplia variedad de moléculas HLA de clase II DRB1, concretamente la frecuencia de aloinmunización entre los portadores de un fenotipo DRB1*11 y DRB1*13 es superior respecto a la detectada con otros fenotipos DRB1⁶ (Tabla 3). La producción de anti-Jk^a tiene lugar fundamentalmente en receptores portadores de varias moléculas DRB*01,⁶ y la de anti-Fy^a es más restrictiva y se da con mayor frecuencia en pacientes portadores de DRB1*04⁷ (Tabla 4). Estas observaciones subrayan la importancia de esta asociación con las moléculas HLA de

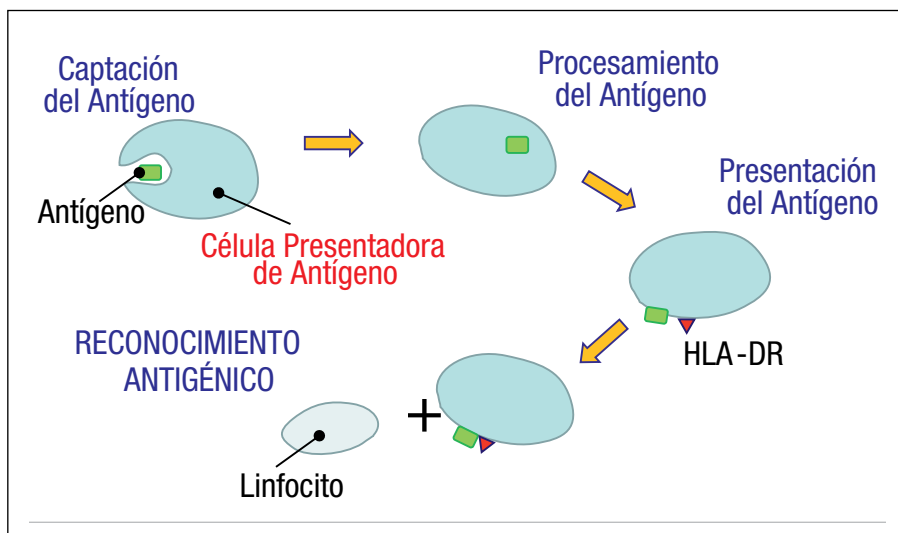


Figura 1. Aloinmunización eritrocitaria y HLA

Tabla 3. Relación entre la aloinmunización Kell y determinados fenotipos DRB*1

Genotipo HLA-DRB1	Pacientes K - con Acs N = 54 (%)	Población general N = 230 (%)	OR (95%CI)	P-valor	Pc
No HLA-DRB1*11 o 13	9(17)	95 (48)	0,2 (0,1-0,5)	<0,0001	<0,001
Si HLA-DRB1*11 o 13	45 (83)	105 (52)	4,5 (2,1-9,7)	<0,0001	<0,001

Datos de Chiaroni J. Br J Haematol 2005.

Tabla 4. Relación entre la aloinmunización Duffy y los alelos DRB1*04

DRB1*	Pacientes Anti-Fya N= 29 Frecuencia %	Controles N=384 Frecuencia %	OR	95% CI	Valor P	Pc
01	3	16,41	0,18	0,03 -1,04	NS	NS
02	3	24,48	0,12	0,02 -0,64	0,02	NS
04	100	19,01	12,9	8,01 -20,76	<0,0001	<0,0001
07	3	33,33	0,08	0,02 -0,4		NS
08	0	7,81	NC			
09	0	0,78	NC			
10	0	0,78	NC			
11	14	24,48	0,47	0,017 -1,30	NS	NS
12	3	2,86	1,21	0,15 -9,49	NS	NS
13	17	24,48	0,60	0,24 -1,53	NS	NS
14	0	7,29	NC2			
15	38	21,61	1,72	0,87 -3,41	NS	NS
16	0	4,17	NC			

Datos procedentes de Zimring JC et al. Transfusion 2007.

clase II que contribuiría a optimizar la presentación del antígeno extraño a las células T CD4+ y, en definitiva, a potenciar la respuesta inmune.

Estudios más recientes también se han hecho eco de otros polimorfismos llamados no exofaciales (PNEs) transmembrana o citoplasmáticos presentes en algunos antígenos eritrocitarios. Estos polimorfismos no parecen ser la diana de aloanticuerpos, pero asociados al antígeno extraño al receptor pueden proporcionar un grado de “extrañeza” superior que también puede favorecer o potenciar la respuesta inmune (Tabla 5).⁸ La frecuencia de los diferentes alelos HLA y, probablemente, la de estos PNEs difiere entre las diversas poblaciones y grupos étnicos, por lo que la inmunogenicidad de un antígeno puede manifestarse de modo distinto en una u otra población.

El paciente y su capacidad de respuesta frente a antígenos “extraños”

Cuando se habla de la capacidad de respuesta de los pacientes y de la producción de anticuerpos irregulares, históricamente se han distinguido dos tipos de individuos: los respondedores y los no respondedores. Aunque el escenario necesario para la producción de anticuerpos es el mismo en todos los pacientes (receptor negativo y donante positivo para un antígeno, y una molécula HLA de clase II asociada en el receptor capaz de presentar al antígeno extraño de forma óptima), es cierto que sólo algunos finalmente desarrollan el correspondiente anticuerpo. Este hecho aboga por la existencia de otros factores que también pueden incidir en la aloinmunización del paciente como

Tabla 5. Polimorfismos no exofaciales (PNEs) descritos asociados a diferentes antígenos eritrocitarios*

Analysis of NEPs in blood group molecules with SNPper database*			
Blood Group Molecule	Nep	Location	refSNP ID
Duffy	Met82Leu	First TMD	rs3027018
Duffy	Ala100Thr	Second TMD	rs13962
Duffy	Leu203Gin	Third IC Loop	rs3027020
Duffy	Thr275Lys	Sixth TMD	rs1801397
Duffy	Thr300Lys	Seventh TMD	rs1801397
Kidd	Glu44Lys	IC (N-terminus)	rs2298720
Kidd	Met167Val	2nd IC Loop	rs2298719
Kidd	Trp171Arg	2nd IC loop	rs9948825
Kell	Asp692Glu	IC	rs1126461
Kell	His698Asn	IC	rs1042015
Kell	Ser726Ala	IC	rs8176048
Glycophorin A	None	N/A	NA
Glycophorin B	None	N/A	NA

* Location in molecules is designated as transmembrane domain (TMD) or intracellular (IC). SNPs from the human genome were analyzed with the SNPper database on July 15, 2007, with the publicly available search engine at <http://snpper.chip.org/>. This database merges existing SNP data from the databases at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> and the draft human genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>).^{6,7}

Datos procedentes de Zimring, J.C. et al., Transfusion 2007.

factores genéticos independientes de las moléculas HLA de clase II, factores ligados a la unidad transfundida y factores externos presentes en el entorno del paciente.

En los pacientes afectos de drepanocitosis se conoce la existencia del polimorfismo rs660 en el gen Ro52 (también denominado SSA1 y TRIM21) que parece desempeñar un papel regulador de la respuesta inmune. Aunque la función del gen sólo ha sido parcialmente caracterizada, los datos disponibles sugieren una posible relación causal entre el citado polimorfismo y la más elevada tasa de aloinmunización en este tipo de pacientes.⁹ En la misma línea, ciertos polimorfismos presentes en citocinas reguladoras están más asociados con el riesgo de rechazo en el trasplante de órganos sólidos y, aunque todavía no se dispone de datos, cabe esperar un posible papel de los mismos en la transfusión sanguínea y en la aloinmunización eritrocitaria. De la misma forma, es muy posible que existan otros marcadores genéticos, los cuales todavía no nos han sido revelados, que puedan desempeñar un papel importante en la aloinmunización de un individuo. El conocimiento de estos marcadores nos permitiría en el futuro predecir el perfil de los pacientes con riesgo de aloinmunización y establecer estrategias de transfusión específicas dirigidas a disminuir este riesgo.

Es posible que las bacterias y virus (adenovirus, echovirus) residuales y sin capacidad infectiva presentes en los componentes sanguíneos activen el sistema inmune nativo del paciente. Esta situación también facilitaría la respuesta inmune frente a los antígenos

eritrocitarios extraños.¹⁰ Por otra parte, la sangre almacenada y no leucorreducida acumula una cantidad de citocinas provenientes de los leucocitos que junto a la lesión propia de almacenamiento inducen un estado “proinflamatorio” en el paciente, y también podrían contribuir a facilitar la aloinmunización.¹¹ No obstante, todavía nos movemos en el terreno especulativo y no sabemos la importancia real de estos factores potenciales, ni si su posible papel solo resulta de peso en los pacientes portadores de los marcadores genéticos necesarios predisponentes a la aloinmunización.^{12,13}

El estado clínico del paciente al realizar la transfusión, más allá del diagnóstico de base, también puede favorecer la aloinmunización. Concretamente, es posible que el estado inflamatorio del paciente actúe como uno de los factores facilitadores, y la fiebre como signo “inflamatorio” parece asociarse a un mayor riesgo de aloinmunización.¹⁴

Indicaciones justificadas de transfusión de hematíes fenotipados

Actualmente existe un cierto consenso sobre los pacientes en quienes deben concentrarse los esfuerzos para proporcionarles sangre fenotipada y evitar, en la medida de lo posible, la aloinmunización. Se trata de pacientes dependientes de la transfusión, es decir, aquellos que debido a su enfermedad van a necesitar transfusiones regulares en algún momento de su vida o a lo largo de la misma. En este grupo se incluyen,

habitualmente, a los pacientes afectados de: hemoglobinopatías estructurales (drepanocitosis, talasemias), anemia aplásica, síndromes mielodisplásicos (SMD) y anemias crónicas congénitas y adquiridas (Tabla 6). En opinión de los autores, la lista debe incluir también a la mujeres en edad fértil y a los pacientes afectados de anemia hemolítica autoinmune (AHAI). Por el contrario, en los pacientes diagnosticados de procesos neoplásicos o hematológicos (leucosis agudas o crónicas), la indicación es controvertida como se comentará posteriormente.

Los pacientes afectados de hemoglobinopatías estructurales son especialmente proclives a aloinmunizarse. Antes de la introducción de estrategias profilácticas se habían estimado índices de aloinmunización que oscilaban entre el 8% y el 36% en función del tipo de estudio y de la población diana, y en una revisión de doce publicaciones sobre el tema se estimó una incidencia media del 25%. Esta elevada tasa de aloinmunización es probablemente multifactorial, y un factor fundamental es la discordancia racial entre donantes y receptores, por ejemplo donantes de raza blanca y receptores de raza negra. Esta discordancia supone un cierto grado de disparidad en el

repertorio antigénico de ambos que va a tener una implicación directa en el riesgo de aloinmunización del paciente. Un estudio comparativo de la incidencia de aloinmunización en pacientes afectados de drepanocitosis residentes en el Reino Unido, respecto a los residentes en Jamaica,¹⁵ demostró una incidencia muy superior en el primer grupo (76%) en relación con el segundo (2,6%). La aparición de múltiples anticuerpos sólo se dio en los pacientes residentes en el Reino Unido (63%) y, sin embargo, el promedio de pacientes transfundidos no difería en ambos grupos. La causa de la alta incidencia en los pacientes del Reino Unido se atribuyó al mayor número de transfusiones recibidas por cada paciente y a la disparidad antigénica entre los donantes, mayoritariamente de raza blanca, y los pacientes, predominantemente de raza negra.¹⁶ No obstante, aun con identidad racial muchos pacientes se siguen inmunizando. En un estudio realizado en Uganda, un 6,1% se inmunizaron a pesar de seguir una estrategia transfusional restrictiva y de la igualdad racial de donantes y receptores.¹⁷ Otros factores que pueden incidir en la aloinmunización son: el número de transfusiones y la edad del paciente en la primera transfusión.^{18,19}

Tabla 6. Indicaciones consensuadas para la transfusión de hematíes fenotipados

Diagnósticos

1. Hemoglobinopatías estructurales: drepanocitosis y talasemias
2. Anemia aplásica
3. Síndromes mielodisplásicos
4. Anemias crónicas congénitas y adquiridas
5. Mujeres en edad fértil
6. Anemia hemolítica autoinmune (AHAI)

La estrategia a implementar en estos pacientes también es controvertida en lo que hace referencia al grado de identidad que vamos a exigir a las unidades seleccionadas para transfundir. Aunque es cierto que estos pacientes van a recibir un número mayor de transfusiones que aumenta el riesgo de aloinmunización, también es verdad que como todos los pacientes están sujetos a los factores genéticos de respuesta inmune que determinarán que sólo algunos de ellos lleguen a sensibilizarse. Por esta razón, los protocolos de selección de hematíes compatibles para los pacientes afectos de drepanocitosis son heterogéneos^{20,21,22} y se mueven entre los que optan por respetar exclusivamente la compatibilidad ABO y Rh(D), los que abogan por respetar el fenotipo ABO, Rh (D, C, c, E, e) y K y, finalmente, los que además incluyen la compatibilidad de los antígenos Fya, Fyb, Jka, Jkb y S.

Quienes abogan por respetar exclusivamente el fenotipo ABO y Rh(D) argumentan que solo algunos pacientes se inmunizarán y que en estos, tras la aparición de un primer anticuerpo, cabe la posibilidad de pasar a la selección de unidades con mayor grado de identidad antigénica. Con esta opción se preservan las unidades extensivamente fenotipadas para los pacientes sensibilizados que tienen una indicación absoluta de recibirlas, y se evita un gasto que *a priori* no parece justificado.

Los que optan por un protocolo que contemple el mayor grado de identidad antigénica posible entre donante y receptor comentan que esta estrategia puede contribuir a reducir el riesgo de reacciones transfusionales hemolíticas

(reacciones retardadas, síndrome hiperhemolítico), la aparición de autoanticuerpos acompañantes y, en definitiva, un grado de complejidad serológica en las pruebas pretransfusionales que puede demorar la transfusión del paciente en situaciones de urgencia. Sin embargo, esta estrategia no tiene en cuenta las dificultades que supone mantener un protocolo de estas características en un entorno con discordancia racial entre donantes y receptores, derivadas de la baja prevalencia de determinados fenotipos entre los donantes de raza blanca. El primer problema lo plantea el fenotipo Ro, presente hasta en un 53% de los pacientes de raza negra, mientras que entre los donantes de raza blanca sólo va a estar en un 3,2%. Esta situación obliga a escoger fenotipos Rh(D)- negativo (rr), que de por sí ya son escasos en nuestro medio, aproximadamente un 15% de nuestros donantes. Igualmente, un fenotipo S-, K-, Fy(a-b-), Jk(b-) es muy común en la raza negra y excepcional en la raza blanca.

En un trabajo publicado por Castro et al.,²³ sobre una serie de 351 pacientes afectos de drepanocitosis que fueron transfundidos con hematíes ABO y Rh(D) compatibles, se analizan hasta cinco posibles protocolos de selección de hematíes con un grado de compatibilidad creciente entre receptor y donante para valorar el número de anticuerpos que se habrían evitado empleando las distintas opciones y las dificultades que, en cada caso, conllevaría encontrar los fenotipos escogidos en la población de donantes según estos fueran de raza blanca o de raza negra. La primera observación de interés es que la transfusión de hematíes ex-

clusivamente ABO/Rh(D) compatible sólo supuso la aparición de anticuerpos en el 29% de pacientes de la serie. Posteriormente estiman que de haber empleado un protocolo que respetara la compatibilidad de los antígenos Rh mayores (C, c, E, e) y Kell, hubieran evitado la sensibilización del 53,3% de estos pacientes, y que un protocolo más amplio, incluyendo la compatibilidad de los antígenos Fya, Jk^b y S, la hubiera evitado hasta en un 70,8% de los pacientes aloinmunizados. Sin embargo, cuando examinan la prevalencia de ciertos fenotipos, según los donantes sean de raza blanca o negra, confirman la poca viabilidad del protocolo “óptimo” en situación de discordancia racial. La prevalencia de un fenotipo Ro (o, rr), K-negativo en donantes de raza blanca sería del 13,6%, y hasta del 41,2% entre los donantes de raza negra; si además exigimos el carácter negativo de los antígenos S, Fya y Jkb, la prevalencia se sitúa en el 0,6% y en el 14,6%, respectivamente. En esta situación, los autores consideran que un protocolo que contemple la compatibilidad Rh (D, C, c, E, e) y K es suficiente, e incluso argumentan la posibilidad de comenzar a aplicarlo después de la aparición de un primer anticuerpo en el paciente.

Por todo lo anterior, cada servicio de transfusión debe establecer su protocolo de selección de hematíes fenotipados para los pacientes afectados de hemoglobinopatías estructurales, teniendo en cuenta las cuestiones logísticas, de coste y de discordancia racial entre donantes y receptores. El protocolo óptimo difícilmente podrá aplicarse en todos los centros que atienden

este tipo de pacientes, y la heterogeneidad va ser inevitable en función de las variables mencionadas. Un aspecto que sí debe incluirse en todos los protocolos es la determinación del fenotipo extendido del paciente antes de la primera transfusión, y si éste ya hubiera sido transfundido en los tres meses anteriores, la determinación del genotipo eritrocitario. Aunque a menudo se cree que la intención es proporcionar al paciente hematíes de su mismo fenotipo, la razón fundamental es conocer de antemano los posibles aloanticuerpos que el paciente puede llegar a producir en el futuro, lo que puede resultar una ayuda extraordinaria cuando se dan situaciones serológicas complejas como las mezclas de aloanticuerpos o la presencia de autoanticuerpos acompañando a aloanticuerpos. También es recomendable seleccionar, si es posible, las unidades más frescas y de mayor volumen con la intención de ampliar al máximo el espacio de tiempo entre dos transfusiones sucesivas.

La inclusión de los pacientes afectados de SMD entre los candidatos a recibir sangre fenotipada también ha sido discutida; sin embargo, la información actualmente disponible demuestra que estos pacientes presentan un riesgo de aloinmunización elevado que justifica su inclusión. Además, suelen presentar diferentes tipos de anomalías, incluso gammapatías monoclonales, policlonales y autoanticuerpos. Sokol et al.²⁴ reportaron una serie de cuarenta y seis pacientes con SMD portadores de autoanticuerpos, de los cuales quince presentaban una anemia hemolítica debida a anticuerpos IgG, IgM o de tipo mixto. En un estudio reciente,²⁵ un 14% (42

de 272) de pacientes afectados de SMD o leucosis mielomonocítica crónica que recibieron dos o más concentrados de hematíes en el curso de un mes desarrollaron anticuerpos: 81 aloanticuerpos y 7 autoanticuerpos. La mayoría de aloanticuerpos estaban dirigidos contra antígenos del sistema Rh y K, de manera que un protocolo que contemple, exclusivamente, la identidad para estos antígenos sería suficiente en este tipo de pacientes.

Por el contrario, entre los pacientes candidatos suele omitirse a los pacientes afectados de anemia hemolítica autoinmune (AHAI) que también presentan un mayor riesgo de aloinmunización, y que merecen acogerse a un protocolo de estas características. Diferentes estudios reportan cifras entre el 12% y el 40% de pacientes afectados de AHAI por anticuerpos calientes (IgG) en los que se detectan aloanticuerpos ocultos por el autoanticuerpo. A menudo estos pacientes requieren transfusiones durante cierto tiempo y en cada uno de los episodios de su enfermedad, y las pruebas pretransfusionales pueden resultar, en algunos casos, muy complejas. Por este motivo, resulta razonable incluirlos en la lista de diagnósticos subsidiarios de la transfusión con hematíes compatibles.²⁶ El conocimiento del fenotipo o, en su defecto, del genotipo del paciente, también puede resultar útil.

Otro grupo que no debe ser olvidado es el de las mujeres en edad fértil, en las que existe una indicación absoluta de transfundir hematíes que contemplen la compatibilidad de los antígenos Rh (D, C, c, E, e) y K. Esta recomendación ha sido efectuada para prevenir la enfermedad hemolítica del

feto y del recién nacido (EHFRN) inducida por anticuerpos de especificidad anti-c y anti-K, los más frecuentes tras los de especificidad anti-D. Aunque es un aspecto discutible, entendemos por edad fértil la que transcurre entre el nacimiento o los primeros meses de vida (fértil en potencia) y los 50 años de edad. La prioridad de esta indicación subraya la necesidad de realizar un uso racional de la sangre fenotipada, para evitar su empleo en pacientes en los que no existe una indicación absoluta o en los que la indicación es discutible.

Los pacientes oncohematológicos (leucemias agudas o crónicas, mieloma múltiple, tumores sólidos) no son candidatos a recibir desde el inicio de su enfermedad hematíes fenotipados extensivamente. En la amplia serie de pacientes de Schonewille et al.,²⁷ sólo un 9% de los mismos desarrollaron aloanticuerpos (51 de 564), y la mayoría dirigidos contra antígenos de los sistemas Rh y Kell (70%), por lo que el estudio concluye que la selección de hematíes fenotipados para otros antígenos complementarios no está plenamente justificada. Por el contrario, un protocolo que contemple la compatibilidad para los antígenos del sistema Rh (D, C, c, E, e) y Kell puede ser aceptable.

Propuesta de protocolo de transfusión de hematíes de fenotipo compatible

El protocolo que se expone a continuación es el utilizado en el Centro de Transfusión donde trabajan los autores,²⁸ y está basado en las recomendaciones realizadas por expertos, de quie-

nes se incluyen algunas referencias en este capítulo y, en especial, en la guía *Provision of red cell transfusion support for transfusion dependent patients* elaborada por la sociedad británica de medicina transfusional.²⁹ La estrate-

gia en el caso de los pacientes afectos de hemoglobinopatías está diseñada de acuerdo con un entorno en el que existe discordancia racial entre los donantes y los receptores afectos de estas patologías.

Introducción

La determinación del fenotipo eritrocitario del enfermo, con el grado de extensión que corresponda según el diagnóstico del paciente, **siempre debe realizarse antes de la primera transfusión**. Si el paciente ha sido transfundido en los últimos tres meses habrá que valorar en cada caso la conveniencia de realizar un análisis del genotipo eritrocitario.

La disponibilidad del fenotipo del paciente es útil para la selección de los hematíes a transfundir, pero también puede ayudarnos a identificar la especificidad de los posibles aloAcs desarrollados, en el caso de que éste llegue a sensibilizarse.

Pacientes sin antecedentes de aloinmunización candidatos a recibir hematíes fenotipados de forma profiláctica.

1. Pacientes afectos de hemoglobinopatías estructurales (drepanocitosis, talasemia mayor), anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmune y síndromes mielodisplásicos (excepto, anemia refractaria simple).

En este grupo de pacientes resulta especialmente importante determinar el fenotipo eritrocitario extensivo ABO, Rh (D, C, E, c, e), Kell, Kidd, Duffy y Ss antes de la primera transfusión.

En los enfermos con **drepanocitosis, talasemia mayor y anemia aplásica**, puesto que son candidatos a múltiples transfusiones a lo largo de su vida y tienen mayor riesgo de aloinmunización (no inmunodeprimidos), si no es posible realizar el fenotipo porque el paciente ya ha sido transfundido en los últimos tres meses, cabe la posibilidad de realizar un análisis del genotipo eritrocitario.

Grado de compatibilidad a exigir en los hematíes a transfundir

- En general, es suficiente con respetar el fenotipo Rh (D, C, E, c, e) y Kell.
- Si el stock de sangre fenotipada lo permite, se respetará, además, la compatibilidad para los sistemas Kidd, Duffy y Ss.
- En el momento que aparezca un primer anticuerpo (paciente “respondedor”) habrá que intentar respetar sistemáticamente la compatibilidad para los sistemas ABO, Rh (D, C, E, c, e), Kell, Kidd, Duffy y Ss.

Observaciones

Cuando no se disponga de suficientes hematíes extensivamente fenotipados, se establecerá, si es posible, el siguiente orden de prioridad: RhD, Kell, Jka/RhE, Rhc, Rhe, Fya, RhC, S, s, Fyb, Jkb.

Situaciones urgentes

En estos casos hay que valorar muy rigurosamente si un retraso en la transfusión motivado por la búsqueda de hematíes de fenotipo compatible puede comprometer el estado del paciente, en cuyo caso es preferible transfundir lo antes posible con los hematíes disponibles en ese momento (ABO, RhD compatibles) con prueba cruzada negativa en fase de antiglobulina.

Diferentes razas y etnias

Debido a las diferencias antigénicas existentes entre las diferentes razas y etnias, la búsqueda de sangre isofenotipo en pacientes de raza negra puede resultar muy complicada, teniendo en cuenta que la mayoría de nuestros donantes son de raza caucásica. En estos casos se recomienda:

- Transfundir Rh y Kell compatible. El fenotipo Rh puede ser rr si el paciente es de fenotipo R0.
- Si el stock de sangre fenotipada lo permite, respetar asimismo los fenotipos: Kidd y Ss.
- El fenotipo Fy(a-b-) no se tendrá en cuenta mientras el paciente no haya producido algún aloAc contra los Ags de este sistema.

2. Pacientes afectados de otros procesos oncohematológicos (leucosis agudas o crónicas, mieloma múltiple)

En torno a un 9% de los pacientes oncohematológicos pueden aloinmunizarse y cuando lo hacen suelen desarrollar Acs de especificidad Rh y Kell.

Grado de compatibilidad a exigir en los hematíes a transfundir

Se respetará exclusivamente la compatibilidad para los Ags del sistema Rh (D, C, c, E, e) y el Ag Kell.

3. Pacientes de sexo femenino hasta los 50 años de edad

Aunque potencialmente cualquier anticuerpo puede producir enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), en la práctica clínica son muy pocos los que en realidad pueden inducir un episodio grave. Los Acs de especificidad anti-D, anti-c y anti-K continúan siendo los que más a menudo producen formas graves de esta enfermedad.

Se ha observado que un elevado porcentaje de las gestantes en las que se detectan las especificidades anti-c y anti-K presentan antecedentes transfusionales y, además, los fetos y/o recién nacidos de estas mujeres suelen presentar formas más graves de la enfermedad.

Ambas observaciones han llevado a establecer una estrategia transfusional para todas las mujeres hasta los 50 años de edad (período fértil).

Grado de compatibilidad a exigir en los hematíes a transfundir

- Respetar la compatibilidad para los Ags del sistema Rh (D, C, c, E, e) y el Ag Kell.

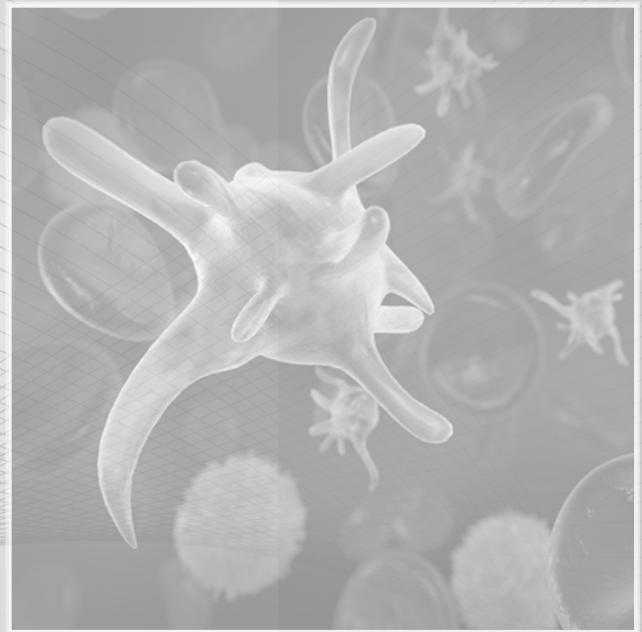
Referencias

- Heddle, N. M., Soutar, R. L., O'Hoski, P. L. et al. A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post-transfusion. *Br J Haematol*, 1995; 91: 1000-1005.
- Hoeltge, G. A., Domen, R. E., Rybicki, L. A., Schaffer, P. A. Multiple red cell transfusions and alloimmunization. Experience with 6996 antibodies detected in a total of 159,262 patients from 1985 to 1993. *Arch Pathol Lab Med*, 1995; 119: 42-45.
- Redman, M., Regan, F., Contreras, M. A prospective study of the incidence of red cell alloimmunization following transfusion. *Vox Sang*, 1996; 71: 216-220.
- Giblett, E. R. A critique of the theoretical hazard of inter vs. Inracial transfusion. *Transfusion* 1961; 1: 233-238.
- Tormey, C. A., Stack, G. Immunogenicity of blood group antigens: a mathematical model corrected for antibody evanescence with exclusion of naturally occurring and pregnancy-related antibodies. *Blood*, 2009; 114: 4279-4282.
- Reviron, D., Dettori, I., Ferrara, V. et al. HLA-DRB1 alleles and Jk(a) immunization. *Transfusion*, 2005; 45: 956-959.
- Noizat-Pirenne, F., Tournamille, C., Bierling, P. et al. Relative immunogenicity of Fya and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion*, 2006; 46: 328-333.
- Zimring, J. C., Spitalnik, S. L., Roback, J. D., Hyllier, C. D. Transfusion-induced autoantibodies and differential immunogenicity of blood group antigens: a novel hypothesis. *Transfusion*, 2007; 47: 2189-2196.
- Tatari-Calderone, Z., Minniti, C. P., Kratochvil, T. et al. Rs660 polymorphism in Ro52 (SSA1;TRIM21) is a marker for age-dependent tolerance induction and efficiency of alloimmunization in sickle cell disease. *Mol Immunol*, 2009; 47: 64-70.
- Janeway, C. A. Jr., Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol*, 2002; 20: 197-216.
- Hod, E. A., Zhang, N., Sokol, S. et al. Harmful effects of red blood cell transfusions: iron and inflammation (abstract). *Transfusion*, 2009; 49 (Suppl): 2A.
- Higgins, J. M., Sloan, S. R. Stochastic modeling of human RBC alloimmunization: evidence for a distinct population of immunologic responders. *Blood*, 2008; 112: 2546-2553.
- Hendrickson, J. E., Hod, E. A., Spitalnik, S. L. et al. Storage of murine red blood cells enhances alloantibody responses to an erythroid-specific model antigen. *Transfusion*, 2002; 50: 642-648.
- Yazer, M. H., Triulzi, D. J., Shaz, B. et al. Does a febrile reaction to platelets predispose recipients to red blood cell alloimmunization? *Transfusion*, 2009; 49: 1070-1075.
- Garratty, G. Severe reactions associated with transfusion of patients with sickle cell disease. *Transfusion*, 1997; 37: 357-361.
- Olujohungbe, A., Hambleton, I., Stephens, L. et al. Red cell antibodies in patients with homozygous sickle cell disease: A comparison of patients in Jamaica and the United Kingdom. *Br J Haematol*, 2001; 113: 216-220.
- Natukunda, B., Schonewille, H., Ndugwa, C., Brand, A. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease patients in Uganda. *Transfusion*, 2010; 50: 20-25.
- Rosse, W. F., Gallagher, D., Kinney, T. R., Castro, O., Dosik, H., Moehr, J. et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The cooperative study of sickle cell disease. *Blood*, 1990; 76: 1431-1437.
- Yazdanbakhsh, K., Ware, R. E. Noizat Pirenne, F. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood*, 2012; 120: 528-537.
- Osby, M., Shulman, I. A. Phenotype matching of donor red blood cell units for nonalloimmunized sickle cell disease patients. A survey of 11832 North American laboratories. *Arch pathol lab med*, 2005; 129: 190-193.
- Afeny-Annan, A., Willis, M. S., Konrad, T. R., Lottenberg, R. Blood bank management of sickle cell patients at comprehensive

- sickle cell centers. *Transfusion*, 2007; 47: 2089-2097.
22. Lasalle-Williams, M., Nuss, R., Le, T., Vole, L., Hassell, K., Murphy, J. R. et al. Extended red blood cell antigen matching for transfusion in sickle cell disease: a review of a 14-year experience from a single center. *Transfusion*, 2011; 51: 1732-1739.
 23. Castro, O., Sandler, S. G., Houston-Yu, P., Rana, S. Predicting the effect of transfusion only phenotype-matched RBDs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. *Transfusion*, 2002; 42: 684-690.
 24. Sokol, R. J., Hewitt, S., Booker, D. J. Erythrocyte autoantibodies, autoimmune haemolysis and myelodysplastic syndromes. *J Clin Pathol*, 1989; 42: 1088-1091.
 25. Sanz, C., Nomdedeu, M., Belkaid, M., Martínez, I., Nomdedeu, B., Pereira, A. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. *Transfusion*, 2013; 53: 710-715.
 26. Trembl, A., King, K. E. Red blood cell alloimmunization: lessons from sickle cell disease. *Transfusion*, 2013; 53: 692-695.
 27. Schonewille, H. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion*, 1999; 39:763.
 28. Muñoz Díaz, E., Pinacho, A., Serra, A., Masuet, L. L., Ortiz, P. Recomendaciones para la transfusión de hematíes de fenotipo compatible. *Protocolos BST*. Barcelona, 2012.
 29. Win, N. Provision of red cell transfusion support for transfusion dependent patients. *Clinical guidelines and policies from NHS-BT*. Information document 150/1.1. 2011.

Inmunohematología
básica y aplicada

SECCIÓN II



Inmunohematología
de plaquetas

Antígenos y anticuerpos de las plaquetas. Técnicas de estudio e importancia clínica

CARLOS DANIEL DE LA VEGA ELENA*
EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ**

Introducción

El interés por la inmunohematología plaquetaria ha aumentado de manera notable en los últimos años. La utilización, de forma combinada, de técnicas serológicas, inmunoquímicas y moleculares ha permitido el descubrimiento de nuevos antígenos, definir su localización glicoproteica y la secuencia de los genes que codifican para la mayoría de estos polimorfismos que constituyen los sistemas de grupos sanguíneos plaquetarios. El avance tecnológico acontecido durante este período ha permitido, además, mejorar el nivel del diagnóstico y del tratamiento de los procesos in-

* *PhD. Responsable del Laboratorio de Inmunohematología. Servicio de Hematología y Medicina Transfusional. Hospital Italiano Garibaldi (STEM SRL). Codirector de la Carrera de Especialización en Hematología. Instituto Universitario Italiano de Rosario. Rosario. Argentina. daniel.delavega@yahoo.com*

** *Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. emuniz@bst.cat*

munes relacionados con los antígenos que estas células expresan.

Estructuras blanco

En las trombocitopenias inmunes la destrucción de las plaquetas es mediada por anticuerpos. Dependiendo de la naturaleza de la reacción inmune, podemos clasificar las estructuras blanco de los anticuerpos como autoantígenos y aloantígenos.

Autoantígenos plaquetarios

La pérdida de la autotolerancia conduce a un proceso autoinmune. En la plaqueta, las estructuras blanco de los autoanticuerpos suelen ser porciones monomórficas de las glicoproteínas de membrana (GPs), especialmente del complejo GPIIb/IIIa presentes en el individuo respondedor y en, prácticamente, todos los individuos.

Aloantígenos plaquetarios.

Descripción, clasificación

Las plaquetas humanas, al igual que el resto de los elementos formes sanguíneos, presentan en la superficie externa de su membrana estructuras polimórficas e inmunogénicas. Estas estructuras genéticamente determinadas y localizadas en las proteínas y glicoproteínas, pueden causar aloinmunización durante el embarazo, la transfusión sanguínea o el trasplante.

El interés del estudio de los antígenos y anticuerpos antiplaquetarios radica en su importancia diagnóstica, pronóstica y terapéutica en los cuadros clínicos asociados a la aloinmunización. Estos son: la trombocitopenia

fetal/neonatal aloinmune (TFNA), la púrpura trombocitopénica postransfusional (PTP), la trombocitopenia pasiva postransfusional (TPP) y la refractariedad a la transfusión de plaquetas (RTP) (Figura 1).

Resulta útil diferenciar entre aquellos aloantígenos presentes en la plaqueta, pero expresados en muchas otras células, conocidos como “antígenos plaquetarios no específicos”, de aquellos con una expresión relativamente restringida a la membrana plaquetaria y a sus precursores, llamados “antígenos plaquetarios específicos”. Los primeros son responsables de la mayoría de los cuadros de refractariedad a la transfusión de plaquetas de causa inmunológica, y los últimos son responsables casi excluyentes del resto de los cuadros.

A. Aloantígenos plaquetarios no específicos

Entre los antígenos no específicos de la plaqueta se encuentran los glicoconjugados de los sistemas de grupo sanguíneo ABH, P, I, Lewis y HLA de clase I. A continuación se describen con cierto detalle los antígenos **ABH** y **HLA** por su importancia transfusional.

a. Antígenos ABH

Los antígenos del grupo sanguíneo ABH están presentes en prácticamente todas las células del organismo adulto. En las plaquetas forman parte de la porción glucídica de las glicoproteínas plaquetarias intrínsecas y, adsorbidos pasivamente, de la fracción glicolipídica del plasma. Estas proteínas intrínsecas son: GPIb, GPIIa, GPIIb, GPIV, GPV, molécula de adhesión endotelial PECAM-1 y el CD109. Se asume, por lo general, que la

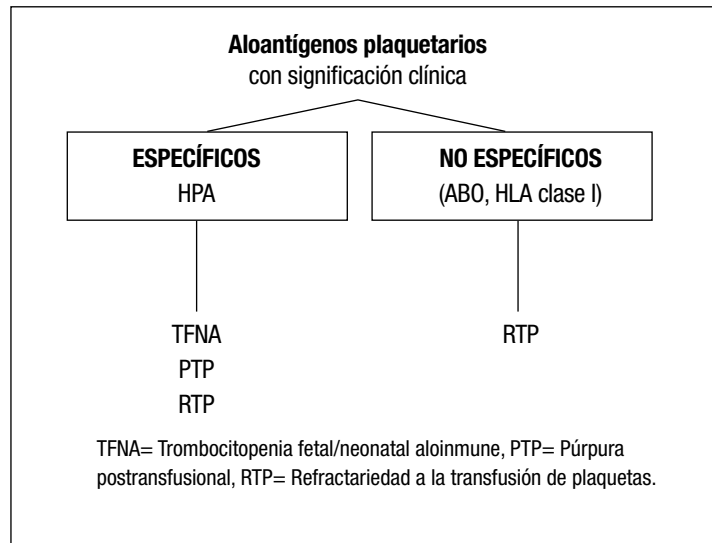


Figura 1. Aloantígenos plaquetarios y procesos clínicos en los que intervienen

expresión de los antígenos ABH en las plaquetas es insuficiente para que las isoaglutininas anti-A o anti-B puedan afectar significativamente la supervivencia de las plaquetas ABH incompatibles transfundidas. Sin embargo, se han descrito reacciones febriles e incrementos postransfusionales inversamente proporcionales al título de isoaglutininas¹⁻³ de hasta un 20% menor al esperado para pacientes que presentan títulos de tipo IgG mayores a 64.

b. Antígenos HLA de Clase I

Los antígenos descritos como HLA de clase I son glicoproteínas presentes en la superficie de las plaquetas y de la mayoría de las células nucleadas. Son determinados por genes localizados en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el brazo corto del cromosoma 6.

Los antígenos y anticuerpos del sistema HLA desempeñan un importante papel en varios acontecimientos relacionados con las transfusiones. Estos

comprenden: aloinmunización, refractoriedad a la transfusión de plaquetas, reacciones febriles no hemolíticas, lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (TRALI) y enfermedad injerto contra huésped postransfusional.

Estos antígenos son altamente polimórficos. En la membrana plaquetaria se encuentran coexpresados los antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-C. La expresión de los antígenos HLA-A y HLA-B es al menos diez veces mayor que los antígenos HLA-C^{4,5} lo cual hace innecesario el estudio de estos últimos en la búsqueda de plaquetas compatibles, salvo muy contadas excepciones.⁶ La expresión de estas moléculas de clase I sobre la membrana plaquetaria puede generar problemas en las técnicas de investigación de anticuerpos antiplaquetarios específicos, ya que una reacción positiva puede ser erróneamente atribuida a la presencia de anticuerpos antiplaquetarios específicos. El diagnóstico de certeza obliga a emplear estrategias técnicas alternativas como el

tratamiento de las plaquetas con cloroquina que consigue eluir a los antígenos HLA de clase I, o bien técnicas más específicas que comportan la solubilización de la membrana plaquetaria y su fragmentación en las diferentes proteínas que la conforman para asegurar la especificidad del resultado.⁷

B. Aloantígenos plaquetarios específicos (Sistemas HPA)

A pesar del gran número de glicoproteínas en la superficie plaquetaria, los aloantígenos plaquetarios específicos descritos se encuentran localizados principalmente en los complejos glicoproteicos GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V, GPIa/IIa y en la proteína CD109.⁸ Estos antígenos acompañan la herencia de estas glicoproteínas y lo hacen de manera autosómica codominante.

Actualmente se conocen treinta y tres aloantígenos plaquetarios específicos definidos por sus correspondientes anticuerpos humanos, de los cuales doce se hallan agrupados en seis sistemas compuestos por pares de antígenos, el tético y su correspondiente antitético. Para los veintiún antígenos restantes, se cuenta únicamente con los aloanticuerpos que los definen, pero no para su correspondiente antitético.⁹ Una razón por la que anticuerpos contra la estructura antitética aún no han sido descritos es que los antígenos descritos hasta el momento se presentan con tan baja frecuencia que los individuos homocigotos, y por lo tanto, susceptibles a inmunizarse, no existen o son extremadamente raros.

Pese a su denominación, muchos aloantígenos plaquetarios previamente considerados como específicos han

sido encontrados también en otras células y tejidos. Muchos de estos antígenos son portados por las integrinas, miembros de receptores de adhesión celular, moléculas conocidas por estar involucradas en las interacciones célula-célula o célula-matriz. Los aloantígenos localizados inicialmente en la subunidad $\beta 3$ (GPIIIa) plaquetaria han sido detectados en células endoteliales, células del músculo liso y en los fibroblastos.¹⁰ Los antígenos asociados con la subunidad $\alpha 2$ integrina (GPIa) han sido encontrados en linfocitos T activados y en células endoteliales.^{11,12} Aquellos antígenos asociados al CD109 se encuentran también en los linfocitos T activados, en células endoteliales y en varias líneas celulares tumorales. Contrariamente, los aloantígenos localizados en la subunidad αIIb y en la subunidad GPIb (miembros de la familia de GPs ricas en leucina), parecen ser específicos del linaje megacariocítico.

a. Nomenclatura HPA

Históricamente, los antígenos plaquetarios específicos fueron llamados con el nombre de los pacientes sensibilizados de quienes se obtuvieron los antisueros específicos que los definían.

Esta nomenclatura se tornó confusa debido al descubrimiento independiente de un mismo antígeno por diferentes grupos de investigadores, sumado a cierto grado de controversia con respecto a la prioridad en la asignación de los nombres.

Para solucionar este dilema, Von Dem Borne y Decary^{13,14} propusieron, en 1990, un sistema simplificado al que llamaron HPA, acrónimo del inglés Human Platelet Antigens (antíge-

nos plaquetarios humanos), el cual fue revisado en 1998 por Santoso y Kiefel¹⁵ y, recientemente, por Metcalfe et al.⁹ Según esta nomenclatura vigente, un antígeno plaquetario específico es considerado un antígeno humano plaquetario (HPA) cuando sus bases moleculares son conocidas. Los antígenos plaquetarios humanos son agrupados en sistemas basados en la existencia de aloanticuerpos que definen tanto al antígeno tético como al antitético. Los HPAs y sus sistemas son designados cronológicamente (HPA-1, HPA-2, HPA-3, etc.) siguiendo el orden de la fecha de su descubrimiento, y se ordenan alfabéticamente según su frecuencia (de alta a baja) en la población estudiada, designando al de mayor frecuencia como “a” y al de baja frecuencia como “b”. Una designación “w” es agregada después del nombre del antígeno si aún no se conoce un aloanticuerpo contra el aloantígeno antitético.⁹

b. Bases moleculares de los antígenos HPA

Se conocen las bases moleculares de treinta y dos de los treinta y tres antígenos plaquetarios específicos definidos serológicamente (Tabla 1). A continuación se detallan agrupados en función del complejo glicoproteico portador:

Polimorfismos en el complejo glicoproteico IIb/IIIa. Esta integrina juega un papel muy importante en la agregación plaquetaria. Después de la activación, pasa por un cambio conformacional que le permite unirse al fibrinógeno y al factor de Von Willebrand (VWf). El fibrinógeno se une a la GPIIb/IIIa en dos plaquetas adyacentes, haciendo la vez de puente y mediando la agregación

plaquetaria. Por ser ésta una vía final, común y única, la deficiencia de este complejo tiene pronunciados efectos en la funcionalidad plaquetaria, como sucede en la Trombastenia de Glanzmann. Hay aproximadamente 50.000 a 80.000 copias de este complejo heterodimérico y requiere Ca^{2+} para su función. Éste consiste en la asociación no covalente de una subunidad α IIb y otra β 3. Los genes que codifican dichas subunidades se encuentran en el brazo largo del cromosoma 17 (q21-23) muy cerca entre sí. La GPIIIa (CD61, β 3) es una proteína glicosilada de 90 kDa que contiene tres dominios, uno grande extracelular con veintiocho puentes disulfuro, un dominio transmembrana y un segmento citoplasmático corto C-terminal. La GPIIb (CD41, α IIb) tiene una cadena extracelular pesada de 116 kDa asociada covalentemente por un puente disulfuro a una cadena liviana de transmembrana de 22 k-Da.

Sin duda este complejo porta el mayor número de antígenos y sistemas (Figura 2).

En la cadena β 3 se hallan los sistemas **HPA-1** (residuo 33), **HPA-4** (residuo 143), **HPA-6w** (residuo 489), **HPA-7w** (residuo 407), **HPA-8w** (residuo 636), **HPA-10w** (residuo 62), **HPA-11w** (residuo 633), **HPA-14w** (611del), **HPA-16w** (residuo 140), **HPA-17w** (residuo 195), **HPA-19w** (residuo 137), **HPA-21w** (residuo 628), **HPA-23bw** (residuo 622) y **HPA-26bw** (residuo 580).

En la cadena α IIb se encuentran los sistemas **HPA-3** (residuo 843), **HPA-9w** (residuo 837), **HPA-20w** (residuo 619), **HPA-22bw** (residuo 164), **HPA-24bw** (residuo 472) y **HPA-27bw** (residuo 841).

Tabla 1. Antígenos Plaquetarios Humanos (HPA)

Sistema	Antígeno	Sinónimos	Glicoproteína	HGNC*	Cromosoma	CD*	Cambio de nucleótido	Proteína madura	Ref
HPA-1	HPA-1a	Zw ^a , Pj ^{A1}	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	T ¹⁷⁶	Leucina ³³	[16-18]
	HPA-1b	Zw ^b , Pj ^{A2}	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	C ¹⁷⁶	Prolina ³³	
HPA-2	HPA-2a	Ko ^b	GP1Ibα	GP1BA	17	CD42b	C ⁴⁸²	Treonina ¹⁴⁵	[19-21]
	HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a	GP1Ibα	GP1BA	17	CD41	T ⁴⁸²	Metionina ¹⁴⁵	
HPA-3	HPA-3a	Bak ^a , Lek ^a	GP1Ib	ITGA2B	17	CD41	T ²⁶²¹	Isoleucina ⁸⁴³	[22-24]
	HPA-3b	Bak ^b	GP1Ib	ITGA2B	17	CD41	G ²⁶²¹	Serina ⁸⁴³	
HPA-4	HPA-4a	Yuk ^b , Pen ^a	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	G ⁵⁰⁶	Arginina ¹⁴³	[25-27]
	HPA-4b	Yuk ^a , Pen ^b	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	A ⁵⁰⁶	Glutamina ¹⁴³	
HPA-5	HPA-5a	Br ^b , Zav ^b	GP1a	ITGA2	5	CD49b	G ¹⁶⁰⁰	Ác. Glutámico ⁵⁰⁵	[28-32]
	HPA-5b	Br ^a , Zav ^a , Hc ^a	GP1a	ITGA2	5	CD49b	A ¹⁶⁰⁰	Lisina ⁵⁰⁵	
HPA-6bw	HPA-6bw	Ca ^a , Tu ^a	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	G ¹⁵⁴⁴	Arginina ⁴⁸⁹	[33-35]
	HPA-6bw	Ca ^a , Tu ^a	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	A ¹⁵⁴⁴	Glutamina ⁴⁸⁹	
HPA-7bw	HPA-7bw	Mo ^a	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	C ¹²⁹⁷	Prolina ⁴⁰⁷	[36]R
	HPA-7bw	Mo ^a	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	G ¹²⁹⁷	Alanina ⁴⁰⁷	
HPA-8bw	HPA-8bw	Sr ^a	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	C ¹⁹⁸⁴	Arginina ⁶³⁶	[37, 38]
	HPA-8bw	Sr ^a	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	T ¹⁹⁸⁴	Cisteína ⁶³⁶	
HPA-9bw	HPA-9bw	Max ^a	GP1Ib	ITGA2B	17	CD41	G ²⁶⁰²	Valina ⁸³⁷	[39]
	HPA-9bw	Max ^a	GP1Ib	ITGA2B	17	CD41	A ²⁶⁰²	Metionina ⁸³⁷	
HPA-10bw	HPA-10bw	La ^a	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	G ²⁶³	Arginina ⁶²	[40, 41]
	HPA-10bw	La ^a	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	A ²⁶³	Glutamina ⁶²	
HPA-11bw	HPA-11bw	Gro ^a	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	G ¹⁹⁷⁶	Arginina ⁶³³	[42, 43]
	HPA-11bw	Gro ^a	GP1IIa	ITGB3	17	CD61	A ¹⁹⁷⁶	Histidina ⁶³³	
HPA-12bw	HPA-12bw	Iy ^a	GP1Ib β	GP1BB	22	CD42c	G ¹¹⁹	Glicina ¹⁵	[44, 45]
	HPA-12bw	Iy ^a	GP1Ib β	GP1BB	22	CD42c	A ¹¹⁹	Ác. glutámico ¹⁵	
HPA-13bw	HPA-13bw	Sit ^a	GP1a	ITGA2	5	CD49b	C ²⁴⁸³	Treonina ⁷⁹⁹	[46-48]
	HPA-13bw	Sit ^a	GP1a	ITGA2	5	CD49b	T ²⁴⁸³	Metionina ⁷⁹⁹	

*HGNC: El comité en nomenclatura génica de la organización genoma humano *CD: agrupación de diferenciación. Resaltados en gris los sistemas bialélicos.

Tabla 1 (Continuación)

Sistema	Antígeno	Sinónimos	Glicoproteína	HGNC*	Cromosoma	CD*	Cambio de nucleótido	Proteína madura	Ref
	HPA-14bw	Oe ^a	GP1IIa	<i>ITGB3</i>	17	CD61	AAG ¹⁹⁰⁹⁻¹¹	Lisina ⁶¹¹	[49]
HPA-15	HPA-15a	Gov ^b	CD109	<i>CD109</i>	6	CD109	delección	Δ Lisina ⁶¹¹	[50-52]
	HPA-15b	Gov ^a	CD109	<i>CD109</i>	6	CD109	C ²¹⁰⁸ A ²¹⁰⁸	Serina ⁷⁰³ Tirosina ⁷⁰³	
	HPA-16bw	Duv ^a	GP1IIa	<i>ITGB3</i>	17	CD61	C ⁴⁹⁷	Treonina ¹⁴⁰	[53]
	HPA-17bw	Val(a)	GP1IIa	<i>ITGB3</i>	17	CD61	T ⁴⁹⁷ C ⁶⁶² T ⁶⁶²	Isoleucina ¹⁴⁰ Treonina ¹⁹⁵ Metionina ¹⁹⁵	[54]
	HPA-18bw	Cab ^a	GP1a	<i>ITGA2</i>	5	CD49b	G ²²³⁵ T ²²³⁵	Glutamina ⁷¹⁶ Histidina ⁷¹⁶	[55]
	HPA-19bw	St ^a	GP1IIa	<i>ITGB3</i>	17	CD61	A ⁴⁸⁷	Lisina ¹³⁷	[56]
	HPA-20bw	Kno	GP1Ib	<i>ITGA2B</i>	17	CD41	C ⁴⁸⁷ C ¹⁹⁴⁹	Glutamina ¹³⁷ Treonina ⁶¹⁹	[56]
	HPA-21bw	Nos	GP1IIa	<i>ITGB3</i>	17	CD61	T ¹⁹⁴⁹ G ¹⁹⁶⁰ A ¹⁹⁶⁰	Metionina ⁶¹⁹ Ac-glutámico ⁶²⁸ Lisina ⁶²⁸	[56]
	HPA-22bw	Sey	GP1Ib	<i>ITGA2B</i>	17	CD41	A ⁵⁸⁴	Lisina ¹⁶⁴	[57]
	HPA-23bw	Hug	GP1IIa	<i>ITGB3</i>	17	CD61	C ⁵⁸⁴ C ¹⁹⁴² T ¹⁹⁴²	Treonina ¹⁶⁴ Arginina ⁶²² Triptófano ⁶²²	[57]
	HPA-24bw	Cab2 ^{a+}	GP1Ib	<i>ITGA2B</i>	17	CD41	G ¹⁵⁰⁸ A ¹⁵⁰⁸	Serina ⁴⁷² Asparagina ⁴⁷²	[58]
	HPA-25bw	Swi ^a	GP1a	<i>ITGA2</i>		CD49b	C ³³⁴⁷	Treonina ¹⁰⁸⁷	[59]
	HPA-26bw	Sec ^a	GP1IIa	<i>ITGB3</i>	17	CD61	T ³³⁴⁷ G ¹⁸¹⁸	Metionina ¹⁰⁸⁷ Lisina ⁵⁸⁰	[60]
	HPA-27bw	Cab3a+	GP1Ib	<i>ITGA2B</i>	17	CD41	T ¹⁸¹⁸ C ²⁶¹⁴ A ²⁶¹⁴	Asparagina ⁵⁸⁰ Leucina ⁸⁴¹ Metionina ⁸⁴¹	[61]

*HGNC: El comité en nomenclatura génica de la organización genoma humano *CD: agrupación de diferenciación. Resaltados en gris los sistemas bialélicos.

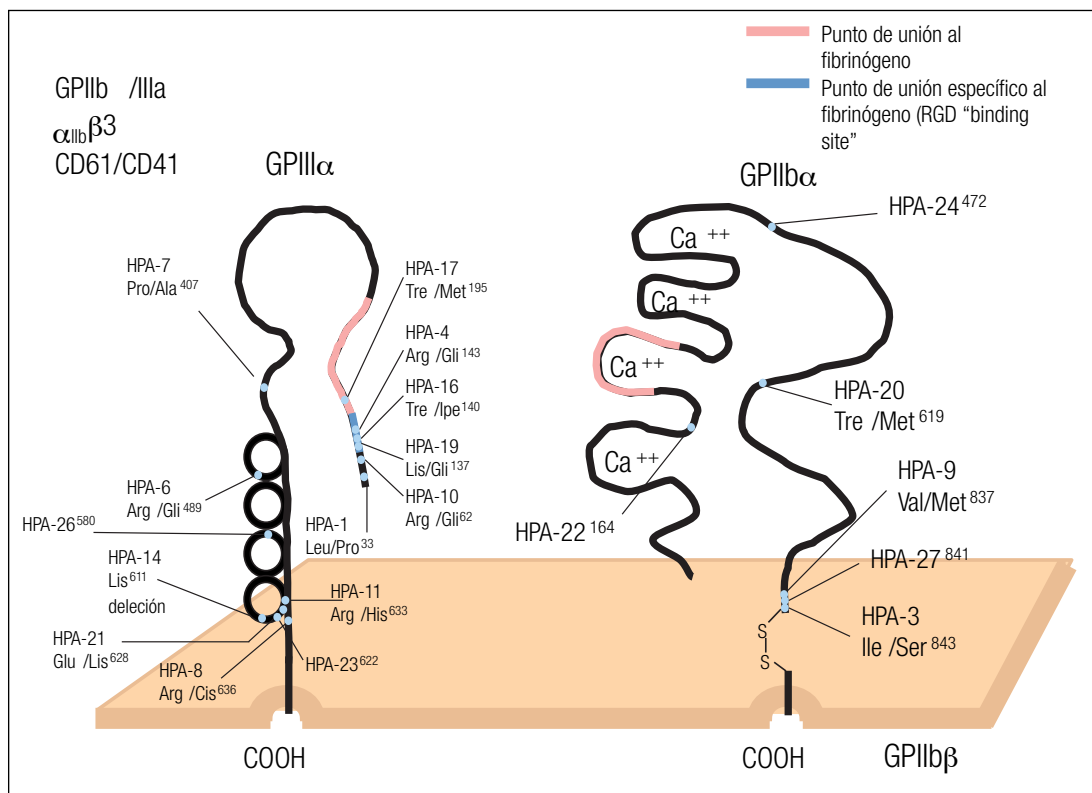


Figura 2. Polimorfismos plaquetarios en el complejo IIb-IIIa

Polimorfismos en el complejo glicoproteico Ib/IX/V. Este complejo glicoproteico está involucrado en las etapas iniciales de la adhesión plaquetaria a la matriz subendotelial de los vasos dañados a través del factor de Von Willebrand (VWf). El receptor del factor de Von Willebrand está constituido por cuatro componentes transmembranales, todos miembros de la familia de proteínas ricas en repeticiones de leucina: la GPIbα (CD42b, 143 kDa) está unida covalentemente a la GPIbβ (CD42c, 22 kDa) por un único puente disulfuro, y asociada no covalentemente con la GPIX (CD42a, 20 kDa) y GPV (CD42d, 83 kDa). Hay aproximadamente 25.000 copias del complejo GPIb/IX y 12.000 de la GPV por plaqueta, y el complejo está aso-

ciado funcionalmente al Receptor FcγRII (CD32).

El sitio primario de unión del complejo glicoproteico al factor de Von Willebrand está localizado en la cadena GPIbα, pero el resto del complejo es necesario para dicha unión. El gen que codifica para la GPIbα está en el cromosoma 17, el gen de la GPIbβ está en el cromosoma 22 y los genes que codifican para la GPIX y la GPV están en el cromosoma 3.

En este complejo glicoproteico se han descrito dos sistemas aloantigénicos hasta el momento (Figura 3): el polimorfismo **HPA-2**, situado en la GPIbα (residuo 142), y el **HPA-12w** (residuo 15) en la GPIbβ. Se han descritos varias mutaciones silenciosas de la GPIbα, pero sin capacidad para inducir una aloinmunización.

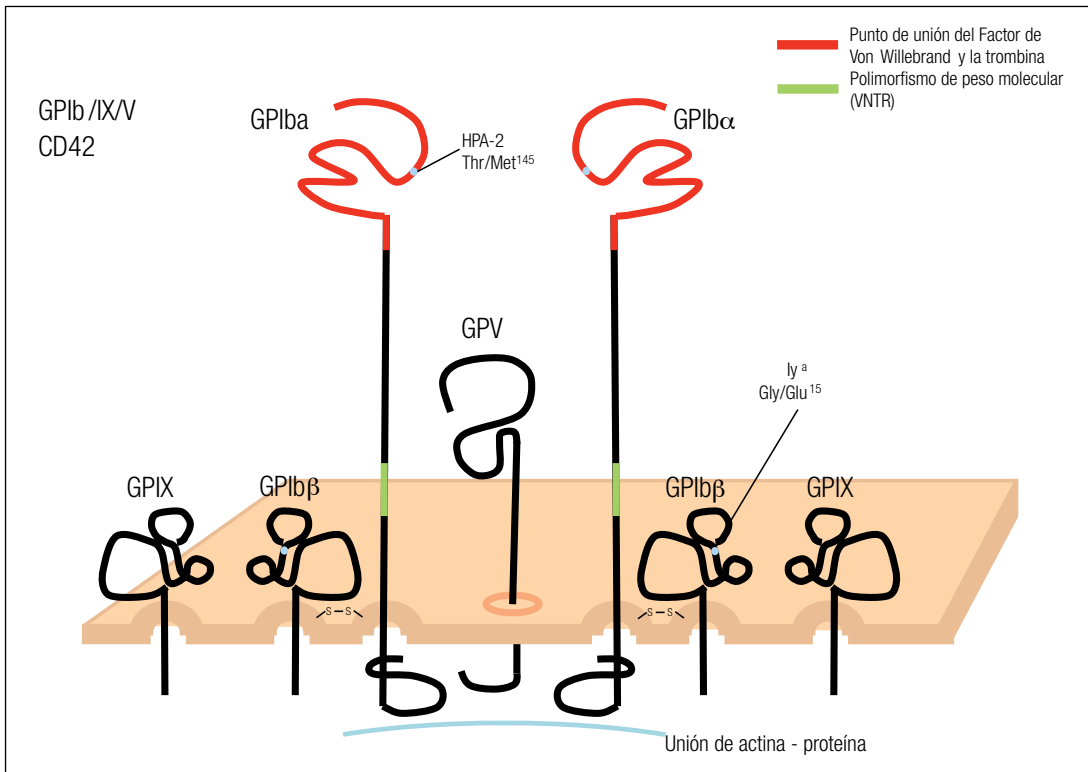


Figura 3. Polimorfismos plaquetarios en el complejo Ib/IX/V

Polimorfismos en el complejo glicoprotéico Ia/IIa. El complejo glicoprotéico GPIa/IIa (CD49/CD29) o VLA-2 (very late antigen 2) se trata de una integrina, constituida por la asociación no-covalente de una subunidad α 2 (165 kDa) y otra β 1 (145 kDa). Hay aproximadamente 800-2.800 copias del heterodímero por plaqueta. Su ligando principal es el colágeno subendotelial expuesto. Se conocen las bases genéticas para los cuatro sistemas aloantigénicos presentes en el complejo GPIa/IIa (Figura 4). Tanto el sistema **HPA-5** (residuo 505), **HPA-13w** (residuo 799), **HPA-18w** (residuo 716) y el **HPA-25bw** (residuo 1087) se hallan en la GPIa y son el resultado de la sustitución de un único nucleótido.

Polimorfismos en la molécula CD109. Se trata de una glicoproteína de 175 kDa anclada a la membrana plaquetaria por un grupo glicosil-fosfatidil-inositol. Está también presente en monocitos, granulocitos, células T estimuladas y células progenitoras mieloides CD34⁺. Aunque la función de la molécula CD109 no se conoce, se cree que puede estar involucrada en interacciones célula-célula. La base genética de los antígenos Gov (sistema **HPA-15**) en el CD109 también ha sido determinada demostrándose una mutación puntual de C por A en la posición 2108 de la secuencia codificante, lo que se traduce en el cambio del aminoácido serina por tirosina en el residuo 703 de la proteína.

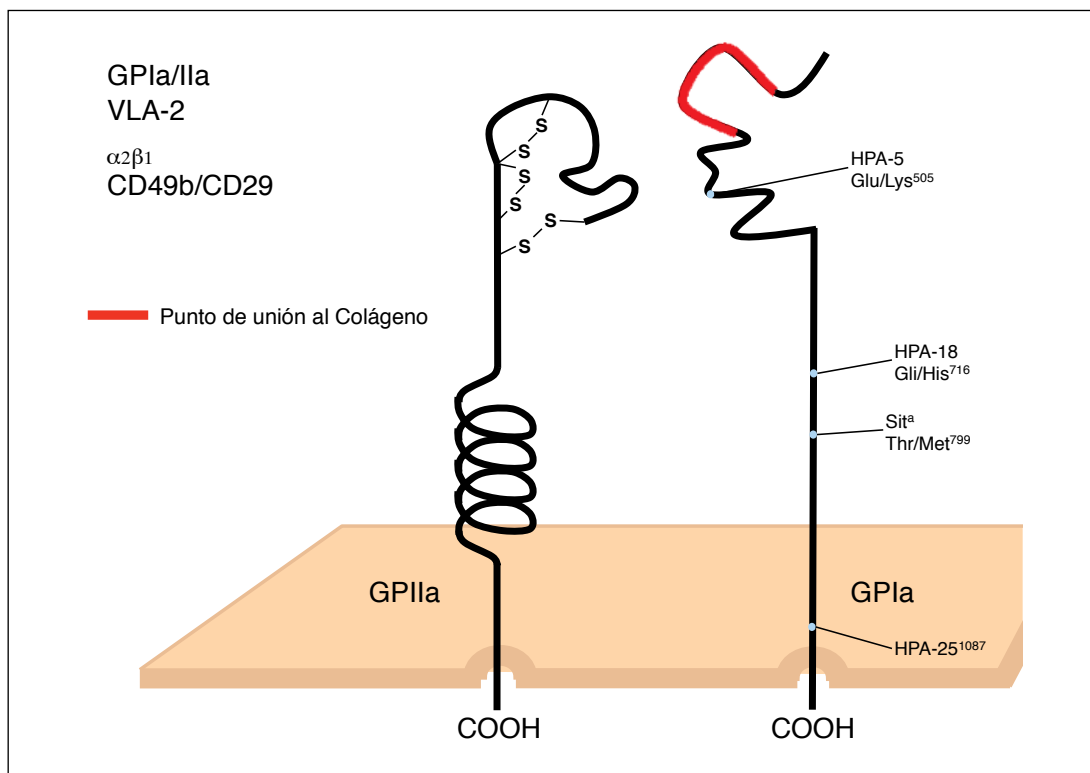


Figura 4. Polimorfismos plaquetarios en el complejo Ia/Ia

Antígenos plaquetarios específicos no-HPA. El antígeno plaquetario específico Mou^a no es considerado un antígeno HPA, debido a que su base molecular aún no ha sido dilucidada.

Otros polimorfismos. La glicoproteína GP IV (CD36, GPIIb) se encuentra en la membrana de las plaquetas y monocitos. Consiste en una cadena simple de aminoácidos. Existen alrededor de 12.000 a 14.000 copias, y tiene función de receptor para la trombospondina, que actúa en la estabilización del agregado plaquetario. Su deficiencia es muy frecuente en individuos de origen japonés, los cuales pueden desarrollar isoanticuerpos. La estructura blanco de los isoanticuerpos fue confundida inicialmente con un aloantígeno y recibió el nombre de Nak^a.

c. Tipificación HPA y detección de anticuerpos antiplaquetarios

Fenotipificación. El valor de la fenotipificación serológica de los antígenos plaquetarios específicos es limitado debido a que, a menudo, no es posible obtener suficientes plaquetas en pacientes trombocitopénicos y los reactivos para su determinación no resultan fiables, con excepción de anti-HPA-1a y de anti-HPA-5b.⁸⁸ Hasta hace poco, la fenotipificación HPA dependía de la disponibilidad de suero humano de individuos sensibilizados contra los aloantígenos plaquetarios específicos. Estos sueros anti-HPA contenían con frecuencia anticuerpos dirigidos contra los antígenos HLA de clase I, que interferían en el estudio y complicaban

la interpretación de los resultados. Por esta razón, su uso se limitaba a los análisis “glicoproteína-específicos”, tales como el MAIPA (Monoclonal Antibody Immobilization Platelet Antigens, en español Inmovilización de los Antígenos Plaquetarios usando Anticuerpos Monoclonales). Si bien los anticuerpos monoclonales (AcMo) se utilizan rutinariamente para fenotipar los glóbulos rojos, su uso en la tipificación plaquetaria ha quedado prácticamente restringido al empleo de anti-HPA-1a. Recientemente se han publicado varios métodos para la fenotipificación rápida usando anticuerpos policlonales anti-HPA-1a de origen recombinante.⁸⁹

Anticuerpos antiplaquetarios. Técnicas de estudio. La investigación ordinaria de aloanticuerpos antiplaquetarios puede efectuarse mediante diferentes métodos, aunque la técnica de inmunofluorescencia (Figura 5) y las técnicas en fase sólida basadas en el ensayo de inmunoenzima (ELISA) son las de uso más común, con resultados muy similares. La MAIPA (Figura 6) es una técnica de captura basada en el ensayo de inmunoenzima que por su mayor sensibilidad resulta especialmente útil para la investigación de aloanticuerpos frente a sistemas o antígenos escasamente representados sobre la membrana plaquetaria, como sucede con los sistemas HPA-5 y HPA-15, o para discriminar la presencia de aloanticuerpos plaquetarios específicos cuando estos coexisten en una mezcla con anticuerpos anti-HLA. En los últimos años se han comercializado técnicas de características similares que ofrecen resultados análogo-

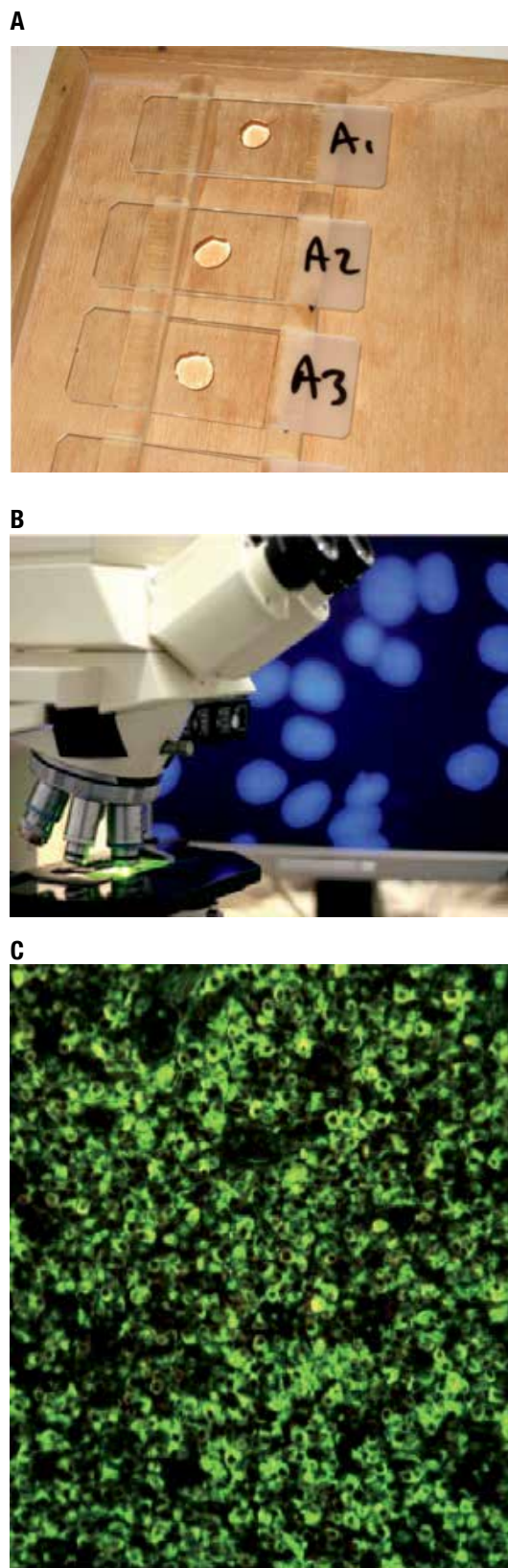


Figura 5. Técnica de Inmunofluorescencia indirecta

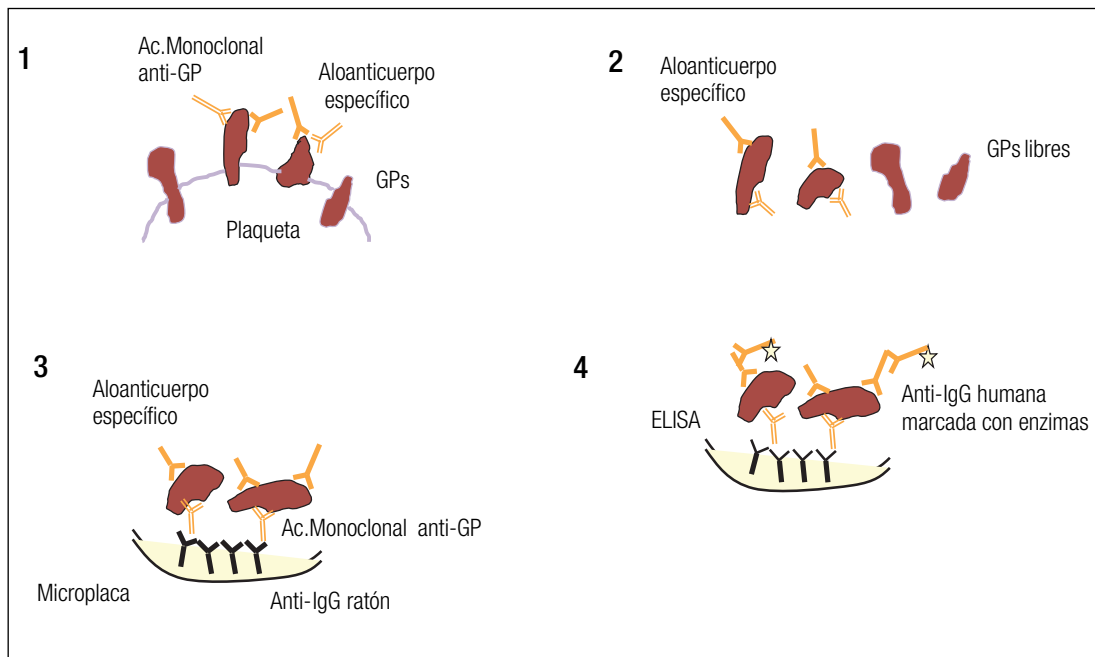


Figura 6. Técnica de MAIPA

gos al MAIPA (MACE), y que están al alcance de laboratorios que no disponen de infraestructura para el estudio sistemático de los procesos inmunes plaquetarios.⁸⁸⁻⁹¹

Genotipificación. La genotipificación HPA puede realizarse con ADN genómico obtenido de cualquier material celular, utilizando reactivos disponibles comercialmente (Figura 7). Esto es posible a partir de la caracterización molecular de estos antígenos. Muchas técnicas se han descrito para caracterizar los SNPs: Reacción en Cadena de la Polimerasa-cebador secuencia específica (PCR-SSP), Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN (SSCP), hibridación con oligonucleótidos secuencia específica (SSO), reacción en cadena de la ligasa (LCR), mini-secuenciación, etc. Muchas de ellas se han

aplicado a la genotipificación de los sistemas HPA, aunque solamente la técnica de PCR-SSP sola o combinada con RFLP se utiliza extensamente en los estudios poblacionales y en la práctica clínica especializada.⁹²

A pesar del importante avance que representan las técnicas de genotipificación, también muestran algunas limitaciones que deben tenerse en cuenta y que pueden ser la causa de ciertas discordancias entre el genotipo y el fenotipo. Por ejemplo, en casos excepcionales donde la presencia del SNP no implica necesariamente la presencia de su producto antigénico sobre la proteína.^{93,94} Es el caso de un tercer alelo de muy baja frecuencia descrito para el sistema HPA-1 que conlleva la pérdida de algunos de los epitopos del antígeno HPA-1a, y cuya caracterización a través del polimorfismo de un único nucleótido (SNP) podría inducir a error.⁹⁵ También

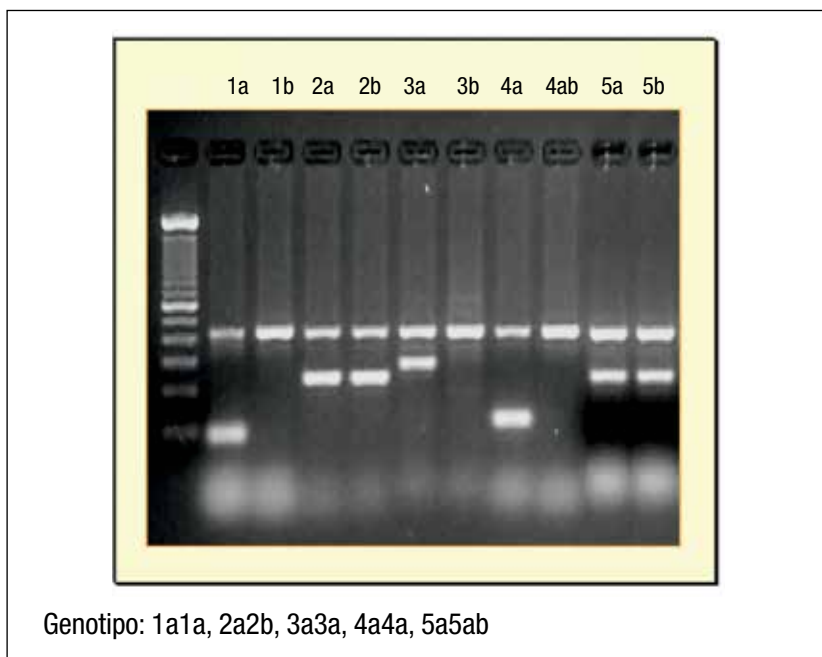


Figura 7. Genotipificación HPA mediante PCR-SSP

se han descrito alelos silentes para el HPA-1b y HPA-3a que pueden inducir resultados discordantes en individuos portadores de una Tromboastenia de Glanzmann.⁹³⁻⁹⁷ Una nueva mutación del gen *Ib α* capaz de inducir un error de genotipaje ha sido recientemente descrita.⁹⁸ En este caso, la mutación responsable impedía la amplificación del alelo HPA-2a, lo que se traduciría en un falso genotipo 2b2b con la técnica de PCR-SSP.

d. Implicaciones clínicas de los polimorfismos HPA

Asociadas a la aloinmunización. Las glicoproteínas plaquetarias humanas son el blanco frecuente del sistema inmune. Sus polimorfismos son reconocidos por linfocitos B y T alogénicos para despertar una respuesta efectora esencialmente humoral. Los anticuerpos generados se unen a sus correspon-

dientes antígenos en la superficie plaquetaria y conducen al secuestro de las plaquetas por los macrófagos, a través de la interacción con receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas.⁶² Este proceso ocurre generalmente en el bazo y resulta en trombocitopenia. Estos anticuerpos están usualmente dirigidos contra las moléculas HLA de clase I y contra los aloepitopos presentes en las glicoproteínas GPIIb/IIIa, GPIb/IX/V, GPIa/IIa y CD109.

Los aloantígenos plaquetarios desempeñan un papel crucial en la trombocitopenia fetal/neonatal aloinmune (TFNA) y en la púrpura postransfusional (PPT) y, menos relevante, en la refractariedad inmune a las transfusiones de plaquetas. En los capítulos 18 y 26 se explican con detalle estos síndromes aloinmunes plaquetarios. Aunque de forma poco habitual, también pueden participar en la patoge-

nia de las reacciones transfusionales de tipo febril. Finalmente, y de modo esporádico, se han reportado casos de trombocitopenia aloinmune pasiva y de trombocitopenia asociada al trasplante, a causa de aloanticuerpos plaquetarios.

Asociada a cambios en la funcionalidad. Debido al papel preponderante de las glicoproteínas (GP) plaquetarias en la funcionalidad de las plaquetas, no es extraño que polimorfismos que afectan la expresión o la actividad de éstas puedan influenciar el curso y el pronóstico de enfermedades que involucran la hemostasia.

Existen numerosos estudios epidemiológicos que han intentado relacionar, aunque con resultados muy controvertidos, varios polimorfismos en las GPs plaquetarias, entre ellos, algunos HPAs, con el riesgo aumentado de enfermedad coronaria arterial e infarto de miocardio en individuos jóvenes.

Si bien esta nueva área de la genómica humana debe ser evaluada con mucha cautela, la información disponible sugiere que el alelo HPA-1b, los alelos GPIb Met145 (VNTR A o B) y especialmente el alelo 807T de la integrina $\alpha 2$ pueden contribuir al riesgo de infarto agudo de miocardio en individuos jóvenes (< 60 años) y al desarrollo de la retinopatía diabética.⁶³

Una interesante observación preliminar que espera ser confirmada hace referencia al polimorfismo HPA-5 que podría actuar como un marcador perteneciente al Sistema Menor de Histo-compatibilidad y, como tal, incidir en el desarrollo y grado de gravedad de la en-

fermedad del injerto contra el huésped en los pacientes tratados con trasplante de progenitores hematopoyéticos a partir de un donante HLA compatible.⁶⁴

Es previsible que a lo largo de los próximos años se dilucide de forma inequívoca el papel que estos polimorfismos desempeñan en la enfermedad tromboembólica y tal vez en otras patologías, ya sea de forma directa o como coadyuvantes de otros múltiples factores genéticos y ambientales.

e. Frecuencias poblacionales de los polimorfismos HPA

La frecuencia de los aloantígenos plaquetarios y de los alelos que los codifican se han estudiado en diferentes poblaciones y se encontraron notables diferencias dependiendo de la población y del grupo étnico examinado (Tabla 2).

Hay consenso en que las poblaciones estudiadas pueden agruparse por similitudes en sus frecuencias alélicas HPA en dos grandes *clusters*. En uno de ellos se encuentran las poblaciones caucásicas, y en el otro, las orientales y amerindias.

El grupo caucásico se caracteriza por poseer frecuencias relativamente altas del alelo "b" de los sistemas HPA-1,-2,-3 y -5. En cambio, para los sistemas HPA-4 y HPA-6, la frecuencia del alelo "b" es muy baja o inexistente.

El grupo oriental presenta un patrón antigénico muy distinto, con frecuencias alélicas "b" significativamente menores que en caucásicos para los sistemas HPA-1,-3 y -5, y frecuencias significativamente mayores del alelo "b" para los sistemas HPA-4 y HPA-6.

Tabla 2. Frecuencias alélicas HPA en varias poblaciones

Población	HPA-1 alelos		HPA-2 alelos		HPA-3 alelos		HPA-4 alelos		HPA-5 alelos		HPA-6 alelos		HPA-15 alelos	
	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	15a	15b
Bereberes [65]	0,748	0,252	0,818	0,182	0,682	0,318	1,000	0,000	0,861	0,139	1,000	0,000	-	-
Tunequinos [66]	0,750	0,250	-	-	0,694	0,306	-	-	0,780	0,220	-	-	-	-
Eslovenos [67]	0,809	0,191	0,891	0,109	0,591	0,407	0,997	0,000	0,934	0,066	-	-	0,527	0,483
Españoles [68]	0,810	0,190	0,900	0,100	0,650	0,350	1,000	0,000	0,880	0,120	1,000	0,000	0,474	0,526
Daneses [69]	0,831	0,169	0,917	0,083	0,626	0,374	1,000	0,000	0,921	0,078	-	-	-	-
Alemanes [70]	0,839	0,161	0,91	0,09	0,586	0,414	-	-	0,917	0,083	-	-	-	-
Ingléses [71]	0,840	0,161	0,925	0,075	0,627	0,373	1,000	0,000	0,914	0,086	1,000	0,000	0,524	0,476
Holandeses [72]	0,846	0,154	0,934	0,066	0,555	0,445	1,000	0,000	0,902	0,098	-	-	-	-
Franceses [73]	0,848	0,152	0,920	0,080	0,620	0,380	-	-	0,874	0,126	-	-	-	-
Italianos [74]	0,850	0,150	0,890	0,110	0,610	0,390	1,000	0,000	0,900	0,100	1,000	0,000	-	-
Austriacos [75]	0,852	0,148	0,918	0,082	0,612	0,388	1,000	0,000	0,892	0,108	1,000	0,000	0,500	0,500
Finlandeses [76]	0,860	0,140	0,910	0,090	0,590	0,410	-	-	0,950	0,050	-	-	-	-
Polacos [77]	0,874	0,126	0,898	0,102	0,592	0,408	1,000	0,000	0,937	0,063	-	-	0,485	0,515
Argentinos [78]	0,878	0,122	0,875	0,125	0,612	0,388	1,000	0,000	0,927	0,073	1,000	0,000	0,510	0,490
Irlandeses [79]	0,882	0,118	0,934	0,066	0,624	0,376	1,000	0,000	0,912	0,088	1,000	0,000	0,542	0,458
Bantúes (Congo) [80]	0,904	0,096	0,776	0,224	0,596	0,404	1,000	0,000	0,732	0,268	1,000	0,000	0,701	0,299
Mexicanos [81]	0,951	0,049	0,841	0,159	0,604	0,396	0,990	0,010	0,938	0,062	1,000	0,000	-	-
Coreanos [82]	0,988	0,012	0,923	0,077	0,555	0,445	0,990	0,010	0,978	0,022	0,980	0,020	-	-
Taiwaneses [83]	0,997	0,003	0,960	0,040	0,575	0,425	0,998	0,002	0,985	0,015	0,963	0,037	0,538	0,462
Japoneses [84, 85]	0,998	0,002	0,900	0,100	0,718	0,282	0,989	0,011	0,973	0,027	0,973	0,027	-	-
Amerindios [86, 87]	1,000	0,000	0,821	0,179	0,757	0,243	1,000	0,000	1,000	0,000	-	-	0,780	0,220

Referencias

- Ogasawara, K. et al. Study on the expression of ABH antigens on platelets. *Blood*, 1993. 82(3): p. 993-9.
- Carr, R. et al. Transfusion of ABO-mismatched platelets leads to early platelet refractoriness. *Br J Haematol*, 1990. 75(3): p. 408-13.
- Heal, J. M. et al. The role of ABO matching in platelet transfusion. *Eur J Haematol*, 1993. 50(2): p. 110-7.
- Duquesnoy, R. J. et al. Role of HLA-C matching in histocompatible platelet transfusion therapy of alloimmunized thrombocytopenic patients. *Transplant Proc*, 1977. 9(4): p. 1827-8.
- Mueller-Eckhardt, G. et al. HLA-C antigens on platelets. *Tissue Antigens*, 1980. 16(1): p. 91-4.
- Saito, S. et al. Platelet transfusion refractoriness caused by a mismatch in HLA-C antigens. *Transfusion*, 2002. 42(3): p. 302-8.
- Nordhagen, R. and Flaathen, S. T. Chloroquine removal of HLA antigens from platelets for the platelet immunofluorescence test. *Vox Sang*, 1985. 48(3): p. 156-9.
- Halle, L. [Platelet alloantigenic systems]. *Transfus Clin Biol*, 1998. 5(5): p. 362-5.
- Metcalf, P. et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang*, 2003. 85(3): p. 240-5.
- Giltay, J. C. et al. Expression of the alloantigen Zwa (or P1A1) on human vascular smooth muscle cells and foreskin fibroblasts: a study on normal individuals and a patient with Glanzmann's thrombasthenia. *Blood*, 1989. 74(3): p. 965-70.
- Santoso, S., Kiefel, V. and Mueller-Eckhardt, C. Human platelet alloantigens Bra/Brb are expressed on the very late activation antigen 2 (VLA-2) of T lymphocytes. *Hum Immunol*, 1989. 25(4): p. 237-46.
- Giltay, J. C. et al. The platelet glycoprotein Ia-IIa-associated Br-alloantigen system is expressed by cultured endothelial cells. *Br J Haematol*, 1990. 75(4): p. 557-60.
- Von dem Borne, A. E. and Decary, F. ICSH/ISBT Working Party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Vox Sang*, 1990. 58(2): p. 176.
- Von dem Borne, A. E. and Decary, F. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Hum Immunol*, 1990. 29(1): p. 1-2.
- Santoso, S. and Kiefel, V. Human platelet-specific alloantigens: update. *Vox Sang*, 1998. 74 Suppl 2: p. 249-53.
- Shulman, N. R. et al. Immunoreactions Involving Platelets. V. Post-Transfusion Purpura Due to a Complement-Fixing Antibody against a Genetically Controlled Platelet Antigen. a Proposed Mechanism for Thrombocytopenia and Its Relevance in "Autoimmunity". *J Clin Invest*, 1961. 40(9): p. 1597-620.
- Van Der Weerd, C. M. et al. The Zw Blood Group System in Platelets. *Vox Sang*, 1963. 20: p. 513-30.
- Newman, P. J., Derbes, R. S. and Aster, R. H. The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest*, 1989. 83(5): p. 1778-81.
- Van Der Weerd, C. M. et al. A new platelet antigen. In: *Proceedings of the 8th congress of the European Society of Haematology*. Karger, Basel. 1962.
- Van Der Weerd, C. M. *Platelet Antigens and Iso-Immunization*, 1965, University of Amsterdam: Amsterdam.
- Kuijpers, R. W. et al. NH₂-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib alpha has a methionine 145/threonine145 amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens. *J Clin Invest*, 1992. 89(2): p. 381-4.
- Von dem Borne, A. E. et al. Baka, a new platelet-specific antigen involved in neonatal allo-immune thrombocytopenia. *Vox Sang*, 1980. 39(2): p. 113-20.
- Kickler, T. S. et al. Identification of Bakb, a new platelet-specific antigen associated with posttransfusion purpura. *Blood*, 1988. 71(4): p. 894-8.
- Lyman, S. et al. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Baka/Bakb alloantigen system. *Blood*, 1990. 75(12): p. 2343-8.

25. Shibata, Y. et al. Yuka, a new platelet antigen involved in two cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang*, 1986. 50(3): p. 177-80.
26. Shibata, Y. et al. A new platelet antigen system, Yuka/Yukb. *Vox Sang*, 1986. 51(4): p. 334-6.
27. Wang, R. et al. An amino acid polymorphism within the RGD binding domain of platelet membrane glycoprotein IIIa is responsible for the formation of the Pena/Penb alloantigen system. *J Clin Invest*, 1992. 90(5): p. 2038-43.
28. Kiefel, V. et al. A new platelet-specific alloantigen Bra. Report of 4 cases with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang*, 1988. 54(2): p. 101-6.
29. Santoso, S., Kiefel, V. and Mueller-Eckhardt, C. Immunochemical characterization of the new platelet alloantigen system Bra/Brb. *Br J Haematol*, 1989. 72(2): p. 191-8.
30. Santoso, S. et al. The human platelet alloantigens Br(a) and Brb are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (integrin subunit alpha 2). *J Clin Invest*, 1993. 92(5): p. 2427-32.
31. Kalb, R. et al. Localization of the Br polymorphism on a 144 bp exon of the GPIa gene and its application in platelet DNA typing. *Thromb Haemost*, 1994. 71(5): p. 651-4.
32. Simsek, S. et al. The human platelet alloantigens, HPA-5(a+, b-) and HPA-5(a-, b+), are associated with a Glu505/Lys505 polymorphism of glycoprotein Ia (the alpha 2 subunit of VLA-2). *Br J Haematol*, 1994. 86(3): p. 671-4.
33. Kekomaki, R. et al. A new platelet alloantigen, Tua, on glycoprotein IIIa associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia in two families. *Br J Haematol*, 1993. 83(2): p. 306-10.
34. McFarland, J. G. et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to a new platelet-specific alloantibody. *Blood*, 1993. 81(12): p. 3318-23.
35. Wang, R. et al. Amino acid 489 is encoded by a mutational "hot spot" on the beta 3 integrin chain: the CA/TU human platelet alloantigen system. *Blood*, 1993. 82(11): p. 3386-91.
36. Kuijpers, R. W. et al. Single point mutation in human glycoprotein IIIa is associated with a new platelet-specific alloantigen (Mo) involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 1993. 81(1): p. 70-6.
37. Kroll, H. et al. Sra, a private platelet antigen on glycoprotein IIIa associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 1990. 76(11): p. 2296-302.
38. Santoso, S. et al. A point mutation leads to an unpaired cysteine residue and a molecular weight polymorphism of a functional platelet beta 3 integrin subunit. The Sra alloantigen system of GPIIIa. *J Biol Chem*, 1994. 269(11): p. 8439-44.
39. Noris, P. et al. Max(a), a new low-frequency platelet-specific antigen localized on glycoprotein IIb, is associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 1995. 86(3): p. 1019-26.
40. Reviron, D. et al. Laa: A new platelet-specific alloantigen on glycoprotein IIIa, involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Platelets*, 1994. 280(5): p. (abstract).
41. Peyruchaud, O. et al. HPA-10w(b) (La(a)): genetic determination of a new platelet-specific alloantigen on glycoprotein IIIa and its expression in COS-7 cells. *Blood*, 1997. 89(7): p. 2422-8.
42. Simsek, S. et al. A new private platelet antigen, Groa, localized on glycoprotein IIIa, involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang*, 1994. 67(3): p. 302-6.
43. Simsek, S. et al. The Arg633His substitution responsible for the private platelet antigen Gro(a) unravelled by SSCP analysis and direct sequencing. *Br J Haematol*, 1997. 97(2): p. 330-5.
44. Kiefel, V. et al. Alloimmunization against Iy, a low-frequency antigen on platelet glycoprotein Ib/IX as a cause of severe neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura. *Vox Sang*, 1995. 69(3): p. 250-4.
45. Sachs, U. J. et al. Single amino acid substitution in human platelet glycoprotein Ibbeta is responsible for the formation of the platelet-specific alloantigen Iy(a). *Blood*, 2000. 95(5): p. 1849-55.

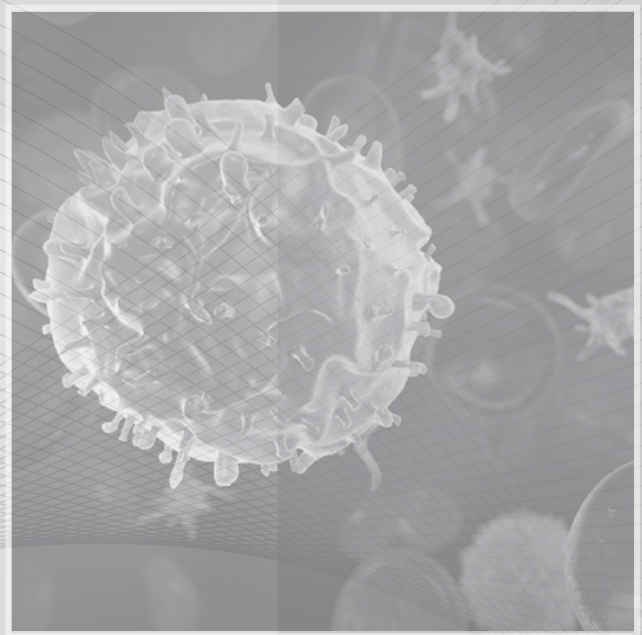
46. Santoso, S. et al. Single point mutation in glycoprotein Ia responsible for the formation of a new platelet alloantigen involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 1997. 90: p. 261a (abstract).
47. Santoso, S. et al. A point mutation Thr(799) Met on the alpha(2) integrin leads to the formation of new human platelet alloantigen Sit(a) and affects collagen-induced aggregation. *Blood*, 1999. 94(12): p. 4103-11.
48. Bux, J. et al. The use of allele-specific recombinant Fc gamma receptor IIIb antigens for the detection of granulocyte antibodies. *Blood*, 1999. 93(1): p. 357-62.
49. Santoso, S. et al. A functional platelet fibrinogen receptor with a deletion in the cysteine-rich repeat region of the beta(3) integrin: the Oe(a) alloantigen in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 2002. 99(4): p. 1205-14.
50. Kelton, J. G. et al. Gova/b alloantigen system on human platelets. *Blood*, 1990. 75(11): p. 2172-6.
51. Smith, J. W. et al. Characterization and localization of the Gova/b alloantigens to the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein CDw109 on human platelets. *Blood*, 1995. 86(7): p. 2807-14.
52. Schuh, A. C. et al. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood*, 2002. 99(5): p. 1692-8.
53. Jallu, V. et al. A new platelet polymorphism Duv(a+), localized within the RGD binding domain of glycoprotein IIIa, is associated with neonatal thrombocytopenia. *Blood*, 2002. 99(12): p. 4449-56.
54. Stafford, P. et al. A single-nucleotide polymorphism in the human ITGB3 gene is associated with the platelet-specific alloantigen Va (HPA-17bw) involved in fetal maternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2008. 48(7): p. 1432-8.
55. Bertrand, G. et al. The new platelet alloantigen Cab a: a single point mutation Gln 716 His on the alpha 2 integrin. *Transfusion*, 2009. 49(10): p. 2076-83.
56. Peterson, J. A. et al. New low-frequency platelet glycoprotein polymorphisms associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2010. 50(2): p. 324-33.
57. Peterson, J. A. et al. New platelet glycoprotein polymorphisms causing maternal immunization and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2012. 52(5): p. 1117-24.
58. Jallu, V., M. Dusseaux, and C. Kaplan, A new Ser472Asn (Cab2(a+)) polymorphism localized within the alphaIIb "thigh" domain is involved in neonatal thrombocytopenia. *Transfusion*, 2011. 51(2): p. 393-400.
59. Kroll, H. et al. A new platelet alloantigen, Swi(a), located on glycoprotein Ia identified in a family with fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2011. 51(8): p. 1745-54.
60. Sachs, U. J. et al. A point mutation in the EGF-4 domain of beta(3) integrin is responsible for the formation of the Sec(a) platelet alloantigen and affects receptor function. *Thromb Haemost*, 2012. 107(1): p. 80-7.
61. Jallu, V. et al. The alphaIIb p.Leu841Met (Cab3(a+)) polymorphism results in a new human platelet alloantigen involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2013. 53(3): p. 554-63.
62. Stratton, J. et al. Platelet destruction in autoimmune thrombocytopenic purpura: kinetics and clearance of indium-111-labeled autologous platelets. *J Nucl Med*, 1989. 30(5): p. 629 -637.
63. Bussel, J. B., Kunicki, T. J. and Michelson, A. D. Platelets: New Understanding of Platelet Glycoproteins and Their Role in Disease. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 2000: p. 222-240.
64. Maruya, E. et al. Evidence that CD31, CD49b, and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants. *Blood*, 1998. 92(6): p. 2169-76.
65. Ferrer, G. et al. Analysis of human platelet antigen systems in a Moroccan Berber population. *Transfus Med*, 2002. 12(1): p. 49-54.
66. Mojaat, N. et al. Gene frequencies of human platelet antigens in the Tunisian population. *Tissue Antigens*, 1999. 54(2): p. 201-4.
67. Rozman, P. et al. Genotyping for human platelet-specific antigens HPA-1, -2, -3, -4 and -5 in the Slovenian population reveals a

- slightly increased frequency of HPA-1b and HPA-2b as compared to other European populations. *Eur J Immunogenet*, 1999. 26(4): p. 265-9.
68. Muniz-Díaz, E. et al. Frecuencia de los antígenos plaquetarios específicos de los sistemas HPA-1,-2,-3,-4,-5 y -6 en población española. *Haematologic* 1998. 83 ((suppl. 2) [Ed. Esp].).
 69. Steffensen, R. et al. Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population. *Tissue Antigens*, 1996. 48(2): p. 93-6.
 70. Kluter, H. et al. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang*, 1996. 71(2): p. 121-5.
 71. Jones, D. C. et al. Human platelet alloantigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. *Eur J Immunogenet*, 2003. 30(6): p. 415-9.
 72. Simsek, S. et al. Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood*, 1993. 81(3): p. 835-40.
 73. Merieux, Y. et al. Human platelet antigen frequencies of platelet donors in the French population determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Pathol Biol (Paris)*, 1997. 45(9): p. 697-700.
 74. Mazzucco et al. L.e.a. 6th Europ. Symp. Plat., Gran.& Red Cell Immunobiology. Amsterdam. 2000 Abstract Book: p. p 22.
 75. Holensteiner, A. et al. Human platelet antigen gene frequencies in the Austrian population. *Haemostasis*, 1995. 25(3): p. 133-6.
 76. Kekomaki, S., J. Partanen, and R. Kekomaki, Platelet alloantigens HPA-1, -2, -3, -5 and -6b in Finns. *Transfus Med*, 1995. 5(3): p. 193-8.
 77. Drzewek, K., Brojer, E. and Zupanska, B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. *Transfus Med*, 1998. 8(4): p. 339-42.
 78. De La Vega Elena, C. D. et al. Human platelet-specific antigens frequencies in the Argentinian population. *Transfus Med*, 2008. 18(2): p. 83-90.
 79. Robinson, J. et al. IPD--the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33 Database Issue: p. D523-6.
 80. Halle, L. et al. HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies. *Tissue Antigens*, 2005. 65(3): p. 295-8.
 81. Nogues, N., Subirana, L. and García Manzano, A. Human platelet alloantigens in a Mexican population: a comparative gene frequency study. *Vox Sanguinis*, 2000. 78: p. P060.
 82. Seo, D. H. et al. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med*, 1998. 8(2): p. 129-32.
 83. Lyou, J. Y. et al. PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to -13w. *Transfusion*, 2002. 42(8): p. 1089-95.
 84. Tanaka, S. et al. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. *Transfusion*, 1996. 36(9): p. 813-7.
 85. Tanaka, S. et al. Simultaneous DNA typing of human platelet antigens 2, 3 and 4 by an allele-specific PCR method. *Vox Sang*, 1995. 68(4): p. 225-30.
 86. Castro, V. et al. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *Eur J Immunogenet*, 1999. 26(5): p. 355-60.
 87. Cardone, J. D. et al. Gene frequencies of the HPA-15 (Gov) platelet alloantigen system in Brazilians. *Transfus Med*, 2004. 14(6): p. 433-7.
 88. Metcalfe, P. Platelet antigens and antibody detection. *Vox Sang*, 2004. 87 Suppl1: p. 82-6.
 89. Garner, S. F. et al. A rapid one-stage whole-blood HPA-1a phenotyping assay using a recombinant monoclonal IgG1 anti-HPA-1a. *Br J Haematol*, 2000. 108(2): p. 440-7.
 90. Ouwehand, W. H. et al. Platelet immunology, present and future. *ISBT Science Series*, 2006. 1(1): p. 96-102.
 91. Kaplan, C. et al. Monoclonal platelet antigen capture assays (MAIPA) and reagents: a statement. *Vox Sang*, 2007. 93(4): p. 298-9.
 92. Hurd, C. M. et al. Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms. *Vox Sang*, 2002. 83(1): p. 1-12.

93. Morel-Kopp, M. C. et al. Human platelet alloantigen typing: PCR analysis is not a substitute for serological methods. *Transfus Med*, 1994. 4(1): p. 9-14.
94. Watkins, N. A. et al. A naturally occurring ARG-GLN substitution at position 93 of a platelet $\beta 3$ integrin abolishes anti-HPA-1a binding. *Blood*, 2000. 96:249a.
95. Santoso, S. et al., A naturally occurring Leu-Val mutation in beta3-integrin impairs the HPA-1a epitope: the third allele of HPA-1. *Transfusion*, 2006. 46(5): p. 790-9.
96. Skogen, B. et al. A dinucleotide deletion in exon 4 of the PLA2 allelic form of glycoprotein IIIa: implications for the correlation of serologic versus genotypic analysis of human platelet alloantigens. *Blood*, 1996. 88(10): p. 3831-6.
97. Kroll, H. et al. Frequency of Glanzmann's thrombasthenia carriers estimated by discrepancies in platelet alloantigen typing strategies. *Blood*, 1996. 88: p. 320a.
98. Nogués, N., Muñoz-Díaz, E., Bertrand, G. A new mutation in the platelet GPIIb gene interfering with HPA-2 genotyping approaches: a case report. *Transfusion* 2013; 53(6): 1375-1377.

Inmunohematología
básica y aplicada

SECCIÓN III



Inmunohematología
de leucocitos

El sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos o Human Leucocyte Antigens (HLA)

CRISTINA NAVARRETE*

Introducción

Los Antígenos Leucocitarios Humanos o Human Leucocyte Antigens (HLA) son un grupo de moléculas altamente polimórficas que juegan un rol esencial en la inducción y regulación de la respuesta inmune a través de la presentación de péptidos antigénicos al receptor de las células T (TCR). Es mediante este rol que han sido también implicadas en la susceptibilidad a una variedad de enfermedades infecciosas y autoinmunes. Las moléculas HLA están expresadas en la mayoría de las células y tejidos, los cuales al ser transfundidos o trasplantados en un individuo

* *PhD., FRCPath. Directora nacional de los Servicios de Histocompatibilidad e Inmunogenética, National Health Service Blood and Transplant, Inglaterra. Profesora asociada en Inmunología, División de Infecciones e Inmunidad, University College London. Londres, Reino Unido. Cristina.Navarrete@nhsbt.nhs.uk*

genéticamente distinto, son capaces de generar una vigorosa respuesta inmune, humoral o celular, con importantes consecuencias clínicas.

Este capítulo describirá las bases genéticas y moleculares que determinan los antígenos del sistema HLA y los métodos usados actualmente para su detección y caracterización. También cubrirá los métodos utilizados para investigar la presencia y especificidad de los anticuerpos (Acs) inducidos por estos antígenos.

El sistema HLA

Los genes que codifican las moléculas HLA forman parte de un sistema genético llamado el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En los humanos este complejo es conocido como el sistema HLA, y está localizado en el brazo corto del cromosoma 6. La región en la cual residen estos genes se extien-

de por una distancia de aproximadamente 4 Megabases (Mb), o 7 Mb si se incluye el gen HFE envuelto en el metabolismo de hierro¹⁻³ (Figura 1). Los genes en esta región están organizados en tres regiones, clase I, clase II y clase III; esta última contiene genes que codifican proteínas con diversas funciones inmunológicas, tales como el factor 4 del complemento y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Genes HLA de clase I

Estos genes se han clasificado de acuerdo con su estructura y función en genes clásicos y no clásicos (o genes de clase Ib). Los genes clásicos, HLA-A, B y C, codifican una glicoproteína (GP) de aproximadamente 43 kDa (cadena pesada o cadena α) que está no covalentemente unida a una GP de 12 kDa (b2 microglobulina o cadena liviana) codificada por un gen situado en el cro-

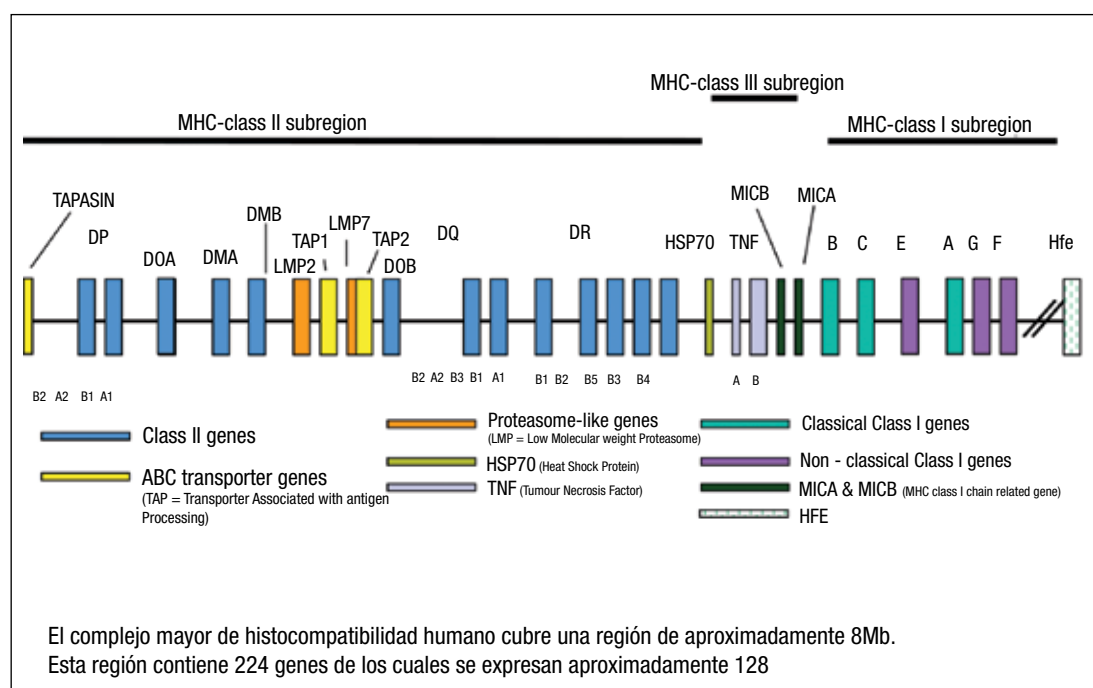


Figura 1. Mapa del MHC

mosoma 15. La cadena α consta de tres dominios extracelulares de alrededor noventa aminoácidos (aa) de longitud, y de estos, los dominios 2 y 3, que son los más polimórficos, forman un bolsillo de más o menos 25 Å de largo y 10 Å de ancho, que puede acomodar una variedad de péptidos antigénicos de entre ocho y diez aminoácidos de longitud para ser presentado a las células T. Los genes no clásicos, HLA-E, F y G, tienen una estructura de exones e intrones similar a la de los genes HLA-A, B y C, pero en general expresan un polimorfismo más reducido.

Los antígenos HLA-A, B y C se expresan en la mayoría de los tejidos y las células sanguíneas, incluidos los linfocitos T y B y las plaquetas. Los antígenos HLA-E y F también se expresan en la mayoría de los tejidos, mientras que HLA-G hasta ahora sólo ha sido detectado en los trofoblastos, monocitos y más recientemente en las células mesenquimales.

Los genes MIC-A y MIC-B situados centroméricos a HLA-B son muy parecidos en estructura a los genes HLA clase I clásicos, pero no requieren β 2-microglobulina o péptido para su expresión en la superficie celular como los HLA-A, B y C. Hasta ahora la expresión de MIC se ha detectado en células endoteliales recién aisladas, fibroblastos, queratinocitos y monocitos. También se expresan en células epiteliales intestinales como resultado de estrés, y en una variedad de tumores de origen epitelial.

Genes HLA de clase II

Al igual que los genes de clase I, los genes de clase II se dividen en clásicos y

no clásicos. Los genes de clase II clásico incluyen DRA y DRB, DQA y DQB y DPA y DPB y codifican heterodímeros constituidos por dos cadenas, α y β , no-covalentemente asociadas, de aproximadamente 34 kDa y 28 kDa, respectivamente. En contraste a las moléculas de clase I, las dos cadenas que forman las moléculas clásicas de clase II, HLA-DR, DQ y DP, están codificados por genes en la región HLA.

Las cadenas α y β están formadas por dos dominios extracelulares: transmembrana y citoplásmico. Los dominios α 1/ β 1 y α 2/ β 2 están codificados por el exón 2 y el exón 3 del gen de la clase II, respectivamente. La mayoría del polimorfismo se encuentra en el dominio β 1 de las moléculas DR, y en los α 1 y β 1 dominios de las moléculas DQ y DP. De manera similar a las moléculas de clase I, estos dominios también crean un surco de unión al péptido. Sin embargo, en el caso de las moléculas de clase II (DR), la ranura está abierta en ambos lados para que pueda acomodar péptidos antigénicos de diferente tamaño, aunque la mayoría de ellos son de aproximadamente 13-25 aminoácidos de longitud. Los genes de HLA clase II no clásicos, DMA, DMB, DOA y DOB, tienen una estructura similar a los genes clásicos de clase II, pero muestran un polimorfismo limitado.

Los genes HLA DR incluyen un gen no polimórfico DRA, y nueve genes DRB, de los cuales DRB2, B6, B7, B8 y B9 son pseudogenes.

El número de genes DRB que se expresan varía dependiendo del alelo DRB1, por ejemplo, HLA DR1, DR103, DR8 y DR10 sólo expresan el gen DRB1. HLA-DR15 y DR16 expresan además el

gen DRB5 que codifica para el producto serológico DR51. HLA DR17, DR18, DR11, DR12, DR13 y DR14 también expresan el gen DRB3, que codifica para la especificidad serológica DR52, mientras que HLA DR4, DR7 y DR9 también expresan el gen DRB4, que codifica el producto serológico DR53. Hay algunas excepciones a esta distribución; por ejemplo, un gen DRB5 se ha encontrado ligado a DR1 (Figura 2).

Por el contrario, hay dos genes DQA y dos DQB, de los cuales sólo A1 y B1 se expresan y ambos son polimórficos. Del mismo modo, hay dos genes DPB y dos DPA, de los cuales sólo DPA1 y DPB1 se expresan y son polimórficos. Estos genes codifican por un heterodímero formado por una cadena α y una cadena β de aproximadamente 34 kDa y 28 kDa, respectivamente. Estas moléculas expresan dos dominios extracelulares α 1/ β 1 y α 2/ β 2 codificada por los

exones 2 y 3 de estos genes. La mayoría del polimorfismo está ubicado en el dominio β 1 para las moléculas DR y α 1, y β 1 para las moléculas DQ y DP. Los antígenos HLA-DR, DQ y DP se expresan constitutivamente en los linfocitos B, monocitos y células dendríticas y los linfocitos T y granulocitos activados. Sin embargo, la expresión de estas moléculas también puede ser inducida en células no hematopoyéticas, tales como fibroblastos y células endoteliales, como resultado de la activación o por el efecto de ciertas citoquinas inflamatorias, tales como γ -interferón y TNF- α .^{4,5}

Además de los genes de clase II clásicos HLA-DR,-DQ y DP-genes, y los no clásicos HLA-DMA-DMB, DOA-y-DOB genes, también están los genes que codifican los polipéptidos de bajo peso molecular de masa o LMP2 y LMP7, los genes TAP1 y TAP2 y el gen Tapasin

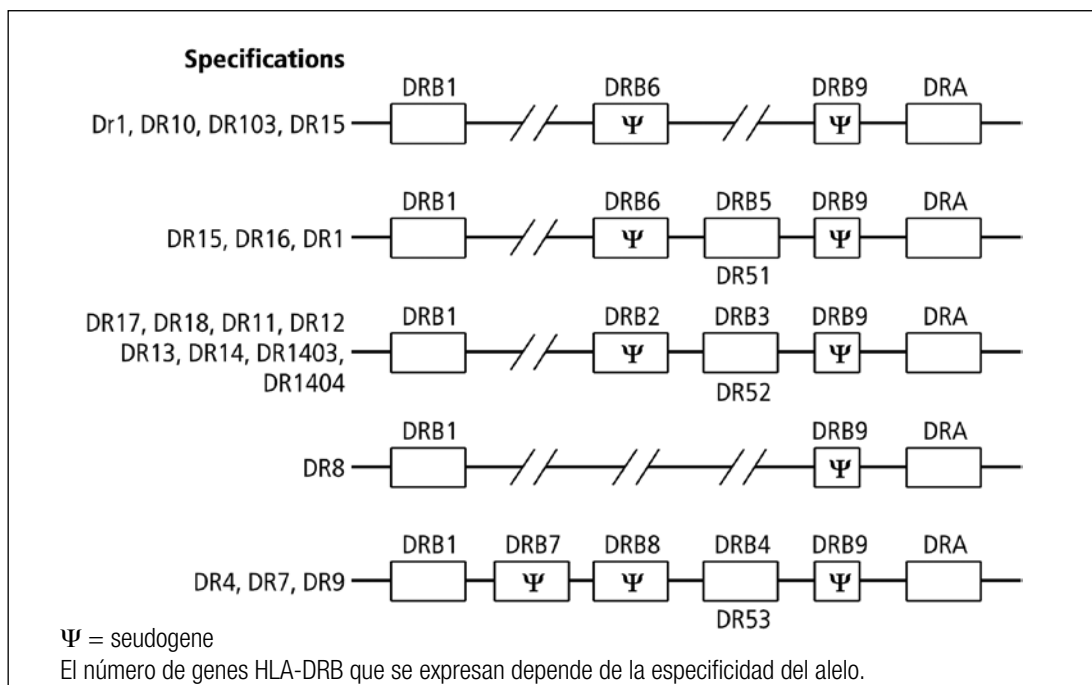


Figura 2. Expresión de los distintos genes HLA-DRB

que participan en el procesamiento, el transporte y la carga de HLA de clase I péptidos antigénicos.

El número de antígenos identificados serológicamente y de alelos identificados en el ADN aumenta cada año¹⁶ (esta información se encuentra disponible en: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>).

Bajo condiciones basales entre doce a catorce moléculas HLA se expresan en la superficie de la membrana de los linfocitos periféricos, seis son de clase I, y entre seis y ocho, de clase II, dependiendo del alelo DR que se exprese (Figura 3).

Debido a la complejidad del polimorfismo de HLA y al gran número de nuevos alelos definidos cada año, la nomenclatura de este sistema ha sido recientemente revisada (Figura 4). En esta versión revisada, sufijos opcionales pueden añadirse a un alelo para indicar su estado de expresión. Los alelos que han demostrado no ser expresados

alelos “nulos”, se les ha dado el sufijo “N”. Un alelo con la superficie celular expresión “baja” cuando se compara con los niveles normales se indica mediante el sufijo “L”. El sufijo “S” se utiliza para describir un alelo especificando una proteína que se expresa como una molécula soluble “secretada”, pero no está presente en la superficie celular. Un sufijo “C” describe un producto de alelo que está presente en el “citoplasma”, pero no en la superficie celular. Un sufijo “A” indica una expresión “aberrante”, y un sufijo “Q” se utiliza cuando la expresión de un alelo no está claramente establecida (Figura 4).

Genética de los HLA

Algunas de las características importantes de los genes HLA es que se expresan en forma codominante, son altamente polimórficos y los alelos de distintos genes se expresan con distintas frecuencias en distintos grupos étni-

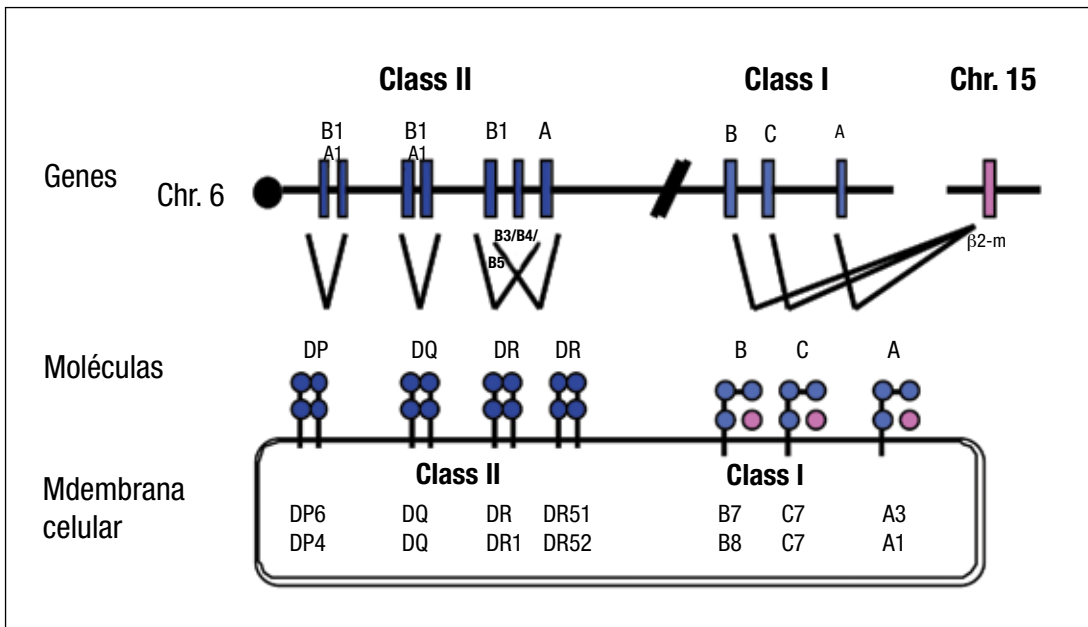


Figura 3. Moléculas HLA expresadas en la membrana celular

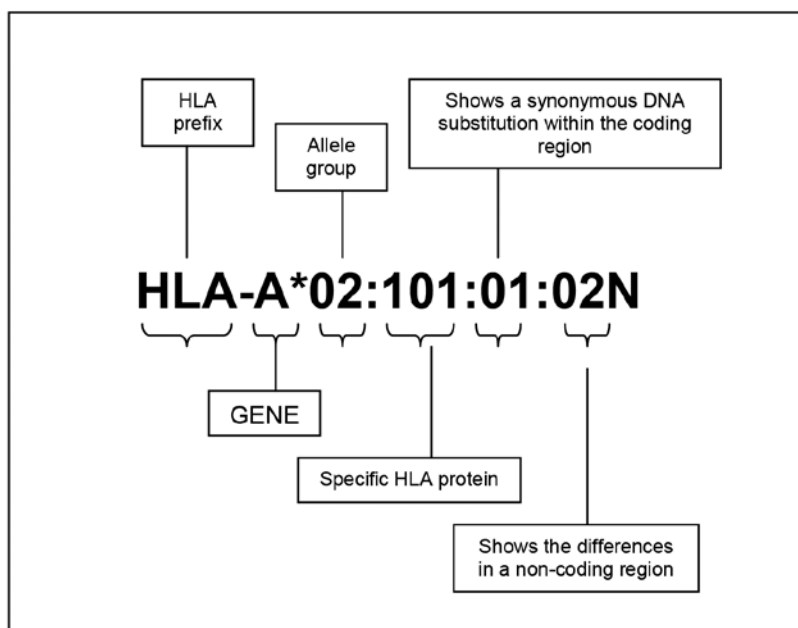


Figura 4. Un ejemplo de la nomenclatura actual

Fuente: Núnes et al.¹⁷

cos. Además, alelos de locus distintos segregan con un fuerte desequilibrio de unión dando origen al concepto del haplotipo. Esta característica es particularmente relevante para la selección de donantes relacionados para pacientes que necesitan un trasplante de células hematopoyéticas troncales en donde la probabilidad entre hermanos de heredar los mismos haplotipos es de 1 en 4 (Figura 5). Algunos de los alelos y haplotipos HLA se expresan en todas o la mayoría de las poblaciones humanas estudiadas, ej. HLA-B44-DR7, mientras otros son característicos de particulares grupos étnicos, ej. HLA-B42-DR18 en negros africanos.

La función de las moléculas HLA

Las moléculas HLA juegan un papel fundamental en la inducción y regu-

lación de la respuesta inmune. Las moléculas HLA clase I clásicas están principalmente, pero no exclusivamente, dedicadas a la presentación de péptidos antigénicos de origen endógeno a las células CD8 + T citotóxicos, mientras que las moléculas HLA clase II presentan principalmente, pero no exclusivamente, péptidos antigénicos exógenos a las células CD4 +.

Las moléculas HLA de clase I clásicas y no clásicas también interactúan con dos tipos distintos de receptores, inhibidores y activadores, presentes en las células NK.⁴ Estos receptores pertenecen a dos familias: la superfamilia de las Ig, también llamadas receptores NK o KIRs, y la superfamilia de lectina tipo C, llamada CD94, que se puede unir de forma covalente con varios miembros de la familia NKG2. Los receptores KIR interactúan con las moléculas HLA-A,-B,-C y G, mientras que CD94-NKG2 re-

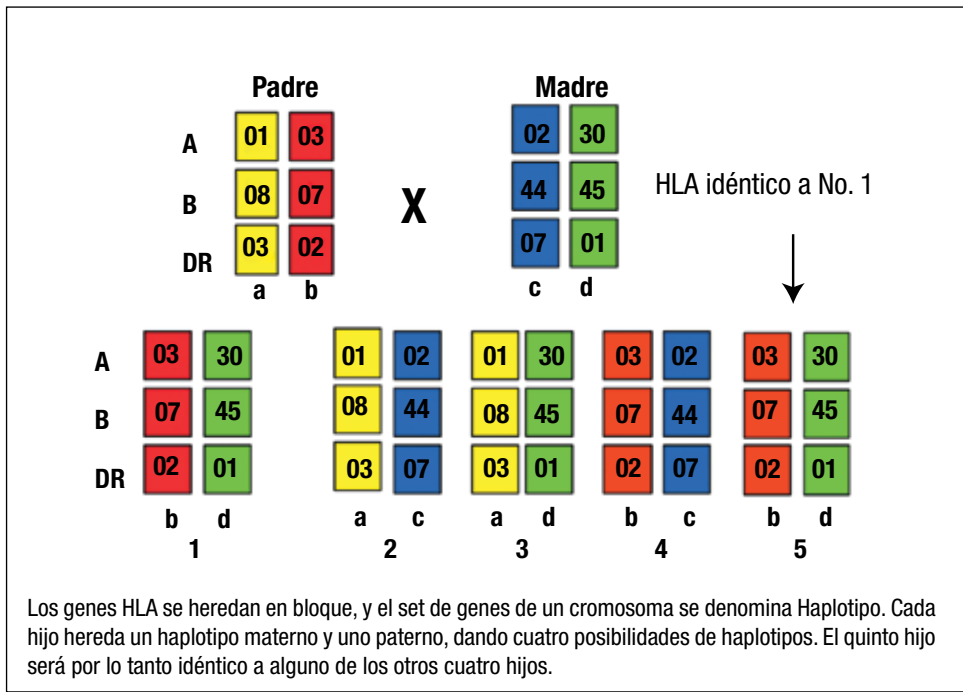


Figura 5. Segregación de haplotipos HLA

conocen las moléculas HLA-E, las cuales son capaces de presentar péptidos derivados de variantes de los antígenos HLA-I, A, B o C y de HLA-G. Los productos MIC-A y MIC-B son reconocidos por receptores presentes en células NK y linfocitos T $\gamma\delta$.⁶

Las moléculas HLA de clase II clásicas están principalmente implicadas en la presentación de péptidos antigénicos exógenos a las células T cooperatoras CD4. Una vez activadas, las células CD4 pueden iniciar y regular una variedad de procesos que conducen a la maduración y a la diferenciación de células (células T CD8 citotóxicas) y efectores humorales (tales como la producción de anticuerpos por las células plasmáticas). Efectores activados también secretan citoquinas proinflamatorias (IL-2, IFN- γ , TNF- α) y citoquinas reguladoras (IL-4, IL-10 y factor de crecimiento transformante- β). La función

principal de las moléculas de HLA-DM es para facilitar la liberación del péptido de la cadena invariante asociada a la clase II (Ii) de la ranura de unión al péptido de las moléculas HLA-DR, de manera que la ranura se puede cargar con el péptido antigénico relevante; esta función es modulada por las moléculas de DO.⁴ La función de los genes LMP2 y LMP7 es mejorar la capacidad de los proteosomas para generar péptidos del tamaño y especificidad para asociarse con las moléculas clase II, mientras que TAP1 y TAP2 y Tapasin están involucrados principalmente en el transporte de los péptidos generados al retículo endoplásmico, en donde se asocian con las moléculas de clase I.

Además de su rol en la presentación de antígenos, otra importante característica de las moléculas HLA es que son capaces de ser reconocidas directa o indirectamente por las células T del huésped

por un mecanismo llamado alorreconocimiento directo o indirecto. En el reconocimiento directo, el TCR del receptor (o paciente) reacciona con los antígenos HLA incompatible presente en las células o tejidos trasplantados, e induce una vigorosa respuesta celular en contra de esos HLAs. En el reconocimiento indirecto, el TCR del receptor (paciente) reconoce péptidos antigénicos derivados de las moléculas HLA incompatibles, pero presentado por sus propias células presentadoras de antígenos, generalmente las células dendríticas. Esta capacidad de reconocimiento directo e indirecto de los HLA, hacen que ellos sean altamente antigénicos y capaces de inducir una vigorosa respuesta inmune.⁷

DetECCIÓN Y DEFINICIÓN DE ANTÍGENOS HLA

Los HLA fueron inicialmente identificados y caracterizados utilizando anticuerpos policlonales presentes en el suero de pacientes inmunizados a través del embarazo, transfusiones o luego de un trasplante. En la medida en que las bases moleculares de estos antígenos se resolvían fue posible desarrollar técnicas basadas en la caracterización del ADN, lo que ha permitido una mejor definición y análisis del polimorfismo.¹⁰

El resultado de este análisis ha demostrado que en el caso de los HLA de clase I, la mayoría del polimorfismo se encuentra en los exones 2 y 3 que codifican para los dominios 2 y 3. En el caso de las moléculas de clase II, el polimorfismo se concentra en el exón 2 que codifica por el dominio una de las moléculas. De tal modo que la ma-

yoría de las técnicas están basadas en la amplificación de estas regiones del gen para su análisis posterior. Hasta hoy, la mayoría de las técnicas utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction o PCR) para amplificar directamente los genes o regiones que se desean analizar. La amplificación de PCR se hace ya sea usando iniciadores específicos para la detección de los alelos que se quieren identificar (PCR-SSP), o iniciadores genéricos para amplificar todas las moléculas, y la especificidad de los alelos es luego analizada con sondas específicas para cada alelo (PCR-SSOP). También se utiliza la técnica de secuenciación directa del ADN (PCR-SBT) por el método de Sanger.

PCR-SSP

Esta técnica involucra la amplificación directa del producto con iniciadores complementarios a secuencias específicas para cada gen o alelo. El ADN amplificado luego se detecta por electroforesis en gel, lo que permite la rápida identificación de alelos en muestras individuales, ya que la lectura de este método es la presencia o ausencia de un producto amplificado para el cual se utilizaron partidores específicos. Utilizando la técnica de PCR-SSP es posible determinar si las secuencias son detectadas en cis o en trans. Una de las principales desventajas de esta técnica (en el caso de los HLA) es que se necesitan muchas reacciones de PCR para identificar todos los alelos descritos. Además, para utilizarla es necesario conocer la secuencia de la región que se desea amplificar y no siempre

se pueden detectar nuevas secuencias (Figura 6).

Sin embargo, el PCR-SSP es la técnica de elección para la rápida determinación de los alelos HLA. Un ejemplo de la tipificación HLA, por PCR-SSP (Figura 7).

PCR-SSOP

En esta técnica, el gen de interés es amplificado por PCR utilizando partidores genéricos complementarios a segmentos altamente conservados en el gen de interés. Los productos amplificados por PCR o amplicones, son después fijados

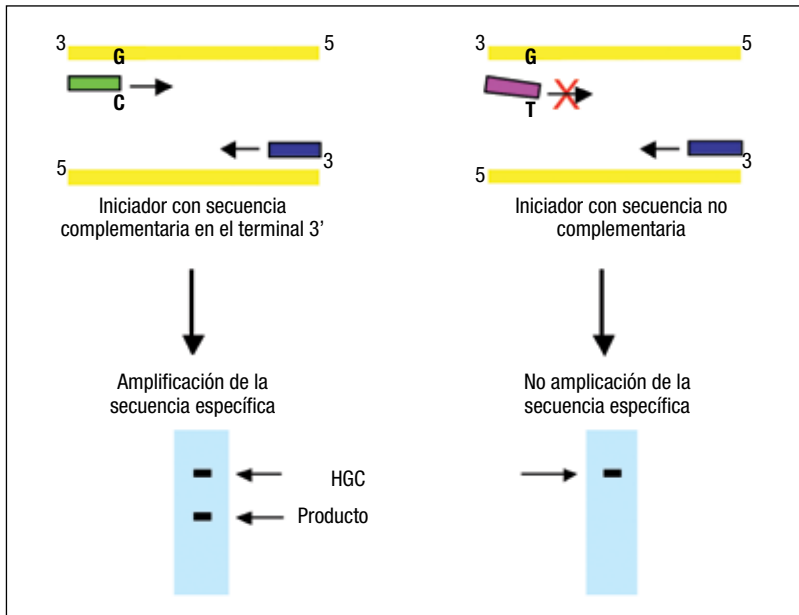
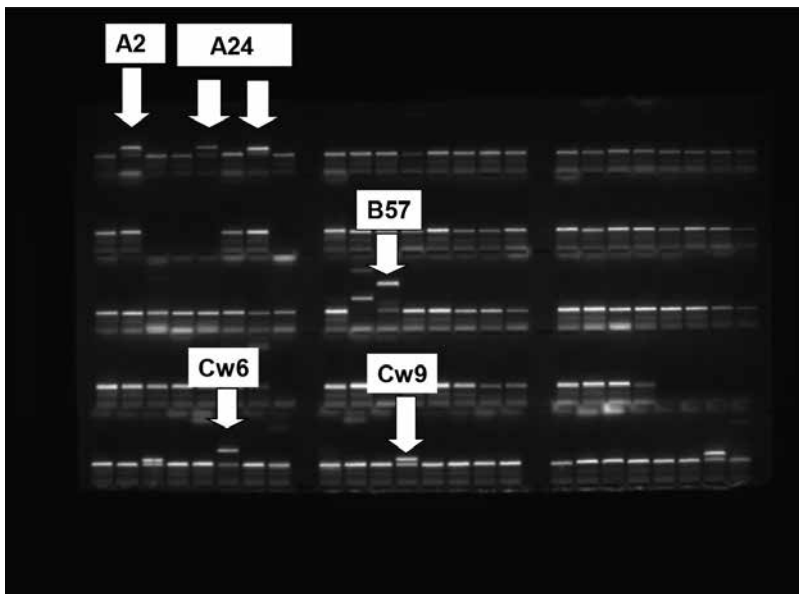


Figura 6. Representación del PCR-SSP



HLA A2, A24/B7,x/Cw6,Cw9

Figura 7. Tipificación HLA por PCR-SSP

en membranas de soporte (por ejemplo, membranas de nylon) que se analizan usando oligonucleótidos marcados y diseñados para reconocer las secuencias polimórficas de ADN presentes en los diversos alelos. Una modificación de esta técnica es la detección del producto amplificado por PCR, con sondas ya marcadas e inmovilizadas sobre membranas o placas. Esta técnica, que ha sido llamada SSOP inverso (rSSOP), es particularmente útil cuando se quieren analizar gran número de muestras, tales como la tipificación de donantes voluntarios de médula ósea. Recientemente se ha descrito una nueva técnica que utiliza un producto genérico de PCR marcado con biotina y sondas alelo específicas unidas a microesferas con distintos fluorocromos. Después de agregar a la reacción R-ficoeritrina conjugada con estreptavidina (SAPE), la fluorescencia se mide usando un instrumento citómetro de flujo como el LABtypeR Luminex (Figura 8).

Secuenciación directa del ADN por el método de Sanger

El principio de la secuenciación del ADN por este método es relativamente sencillo. En el caso de la secuenciación de los alelos HLA, el primer paso es la desnaturalización del ADN para proporcionar un solo filamento de la plantilla, luego se utilizan iniciadores alelos o grupos específicos para amplificar la región que se desea secuenciar, y posteriormente, la secuenciación y la extensión del producto se realizan mediante la adición de partidores de secuenciación genéricos o específicos (reverse y forward) y el uso de la

polimerasa en presencia de exceso de nucleótidos. La mezcla de secuenciación se divide en cuatro tubos, cada uno de los cuales contiene un trifosfato dideoxiribonucleoside específico (ddATP). Cuando estos se incorporan en la cadena de ADN, el alargamiento se interrumpe, dando lugar a la terminación de la cadena. En cada reacción hay incorporación al azar de los terminadores de cadena, por lo tanto, se generan productos de todos los tamaños. Los productos de las cuatro reacciones son luego analizados por electroforesis en carriles paralelos de un gel de poli(acrilamida-urea), y la secuencia se lee mediante la combinación de los resultados de cada carril utilizando un secuenciador automático de ADN.

La secuenciación directa del ADN permite la tipificación de los HLA a alta resolución, lo que es muy importante en la selección de donantes de células hematopoyéticas troncales no emparentados.

Secuenciación de Nueva Generación

Más recientemente se ha descrito un nuevo enfoque para definir y caracterizar estos antígenos a un nivel de alta resolución y rendimiento. Esto implica la secuenciación clonal paralela y masiva usando plataformas de secuenciación de nueva generación o *New Generation Sequencing* (NGS). Estas nuevas plataformas son capaces de producir gran volumen de datos con un alto nivel de resolución.^{8,9}

Una ventaja importante de todas las técnicas basadas en el ADN es que no se requieren células viables para

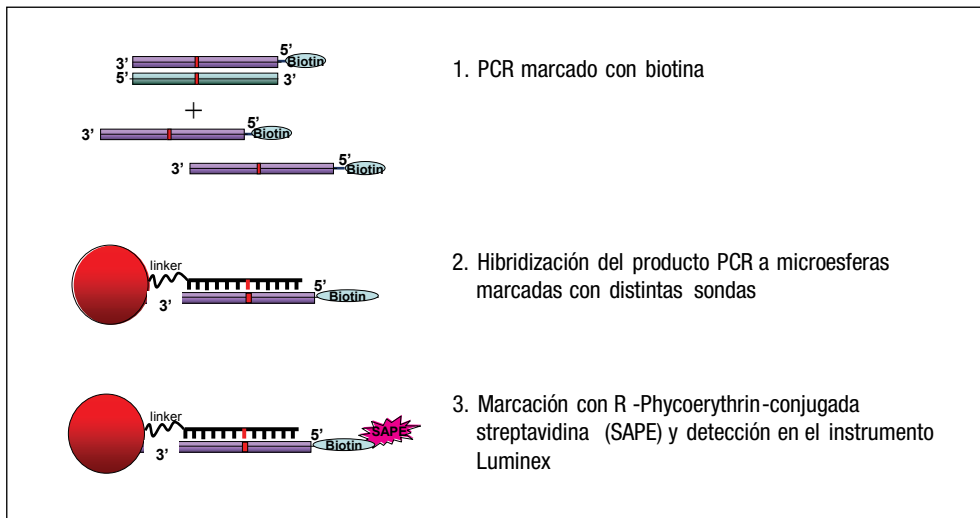


Figura 8. Tipificación HLA por Luminex

llevar a cabo la tipificación HLA de clase I o clase II. Además, como todas las sondas y cebadores se sintetizan a la orden, hay una consistencia de los reactivos utilizados, lo que permite la comparación de los tipos HLA entre diferentes laboratorios. Sin embargo, aunque la tipificación serológica está siendo reemplazada rápidamente por técnicas de tipificación basadas en el ADN, los reactivos serológicos todavía pueden ser necesarios para los estudios de expresión de antígenos.

Anticuerpos HLA

Los Acs HLA son inducidos a través del embarazo, transfusiones de sangre o por trasplantes. La afinidad, avidez y la clase de inmunoglobulina (Ig) de los Acs producidos dependen de varios factores, incluyendo la ruta y persistencia de la inmunización y el estado inmune del individuo. Los Acs HLA se pueden identificar en el aproximadamente 20% de embarazos humanos, y en este caso los Acs son mono y multi-

específicos, de títulos y afinidad altos y de clase IgG. Aunque los anticuerpos HLA IgG pueden cruzar la placenta, en general estos no son dañinos para el feto. Los Acs producidos después del trasplante son sobre todo IgG, aunque IgM también puede estar presente. En cambio, la mayoría de los Acs HLA presentes en pacientes multitransfundidos son mezcla de IgM e IgG, multiespecíficos y en contra epítopes públicos.

La decisión de introducir depleción leucocitaria universal de la sangre ha llevado a una reducción en los niveles de aloinmunización en pacientes no inmunizados previamente, pero no ha sido muy eficaz en disminuir la producción de Acs en individuos ya sensibilizados, como por ejemplo mujeres que se hayan inmunizado a través del embarazo.⁷

Detección de anticuerpos HLA

En la actualidad existe una variedad de técnicas para detectar estos Acs, incluidas la técnica de microlinfotoxicidad

dependiente del complemento (CDC), la técnica de ELISA, la de citometría de flujo y más recientemente una técnica basada en la detección de anticuerpos usando microesferas conjugadas con distintos fluorocromos y que expresan diferentes antígenos de HLA usando la plataforma Luminex. Con la excepción del test de ELISA, la mayoría de las técnicas descritas pueden ser usadas para la detección de los Acs y para realizar las pruebas cruzadas requeridas previas a un trasplante.^{11,12}

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

Una de las técnicas originalmente utilizadas para la detección de Acs es la que permite la detección de Acs linfocitotóxicos. Esta técnica está basada en que (en presencia de complemento de conejo) los Acs que reaccionan con el antígeno presente en la superficie de la célula conducen a la activación del complemento por la vía clásica, y dan lugar a la interrupción de la membrana de la célula. Las células dañadas son detectadas agregando bromuro de ethidium (EB), y las células vivas son identificadas agregando la naranja de la acridina (AO) al final del período de la incubación. Las células marcadas con el AO cuando se exponen a la luz ultravioleta (UV) aparecen verdes, mientras que las células dañadas permiten la entrada del EB, que se une al ADN y aparecen rojas bajo luz UV. Las reacciones positivas o negativas son evaluadas dependiendo del porcentaje de células muertas en cada uno de los pocillos como 0%-10% (negativo); 11%-20% (negativa dudosa 2); 21%-50% (posi-

tivo débil 4); 51%-80% (positiva 6); 81%-100% (positiva fuerte 8).¹³

Esta técnica, sin embargo, no discrimina entre anticuerpos HLA y otros anticuerpos citotóxicos linfocito-reactivos incluyendo autoanticuerpos. Sin embargo, la mayoría de los autoanticuerpos citotóxicos son IgM y pueden ser identificados usando dithiothreitol (DTT). La adición de DTT al suero da lugar a la interrupción de los enlaces de disulfuro en la molécula de IgM, conduciendo a la pérdida de citotoxicidad debido a IgM. La exposición prolongada o el exceso de DTT puede conducir a la interrupción de los enlaces de disulfuro intramoleculares en las moléculas de IgG, y también puede inactivar el complemento, pero esto se puede inhibir por la adición de cisteína. Puesto que la prueba de la CDC detecta solamente los anticuerpos citotóxicos, otras técnicas tales como el ELISA o la citometría de flujo son necesarias para detectar los anticuerpos no-citotóxicos. El CDC es aun hoy día una de las técnicas más usadas para realizar las pruebas cruzadas entre el suero del paciente y las células del potencial donante que se realizan antes del posible trasplante. Una de las mayores desventajas es que es difícil diferenciar (al menos que se usen poblaciones subcelulares separadas) si la reacción es contra los linfocitos T o B. Esta reactividad se usa como un marcador indirecto de si los anticuerpos son de HLA clase I (reaccionando con células T y B) o de clase 2 (reacciones en contra de los linfocitos B solamente). Sin embargo, se ha descrito que, en algunos casos, los anticuerpos de clase I (HLA-A, B o C) reaccionan preferencialmente con los linfocitos B.

ELISA

En esta técnica de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas - ELISA (del acrónimo inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) antígenos purificados o recombinantes se inmovilizan en una microplaca de 96 pocillos directamente o a través de un anticuerpo dirigido contra una región no polimórfica de la molécula en la que residen los aloantígenos correspondientes. En el caso de los HLA, este Ac se encuentra dirigido a la parte monomórfica de la molécula (dominio $\alpha 3$) o en contra de la $\beta 2$ -microglobulina. Esto permite que la región polimórfica ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) queden disponibles para la unión al anticuerpo específico. Luego se agrega el suero del paciente y los anticuerpos HLA-específicos unidos a los antígenos inmovilizados en la placa se detectan con un anticuerpo anti-Ig humana conjugado con una enzima (HRP). Esta reacción es detectada con la adición del sustrato específico que cataliza la reacción produciendo un cambio del color que se identifique en un lector de ELISA. Una de las ventajas principales de esta técnica es que percibe Acs HLA-específicos a través de la detección de Acs unidos a los antígenos HLA solubilizados o purificados.¹⁰

Inmunofluorescencia por citometría de flujo

En esta técnica, los anticuerpos unidos a las células que expresan el antígeno correspondiente, son detectados usando un anticuerpo marcado con una molécula fluorescente, como por ejemplo

isotiocianato o R-phycoerythrin, en contra de la Ig humana. Usando esta técnica es posible identificar si los Acs presentes en el suero son IgG o IgM usando un Ac marcado en contra de la IgG o IgM humana.

Al final del período de incubación del suero con las células diana, y después de remover el exceso de Ac marcado, las células se pasan a través de un rayo láser en el citómetro de flujo. Las diversas poblaciones celulares se identifican de acuerdo con su morfología y granularidad en la fluorescencia. Usando un segundo anticuerpo marcado con un fluorocromo distinto en contra de marcadores específicos, tales como CD3 o CD19, es posible identificar si la reactividad es en contra de los linfocitos T o B. Esta técnica es la más comúnmente usada en las pruebas cruzadas realizadas previas al trasplante, ya que permite identificar si la reactividad es en contra de las células B o T.¹²

En general, la intensidad de la fluorescencia se correlaciona con la cantidad de Ig unida a las células, y por lo tanto, es una indicación de la cantidad de Ac que se encuentra en el suero.

La ventaja principal de esta técnica es su mayor sensibilidad comparada con el CDC y ELISA. Sin embargo, una de las desventajas es que también detecta Acs linfocito-reactivos no específicos cuya relevancia clínica no está aún muy clara. Para superar esta limitación existen hoy día microesferas recubiertas con una gran variedad de proteínas recombinantes de distintos alelos HLA, lo que permite una mejor definición de la especificidad de estos Acs.

Luminex

Esta técnica basada en el uso del lector de fluorescencia Luminex utiliza microesferas de poliestireno cubiertas con proteínas HLA recombinantes o purificadas y marcadas con distintos fluorocromos (the X-map Luminex assay). Las microesferas luego se incuban con el suero del paciente y la reacción se visualiza usando un Ac conjugado con PE, en contra de la Ig humana. Las reacciones positivas o negativas se leen usando un analizador de Luminex que puede distinguir hasta cien microesferas de diversos colores en un solo tubo. Luminex es hoy la técnica más sensible para la detección de los anticuerpos de HLA. Recientemente, esta tecnología ha sido mejorada mediante la introducción de las microesferas recubiertas de distintos alelos HLA de clase I y clase II, lo que permite una mejor identificación de las especificidades de los Acs presentes en los pacientes.^{14,15}

Conclusiones

Las bases moleculares de la mayoría de los antígenos presentes en las células sanguíneas, incluyendo aquellos de los sistemas HLA, están ya definidas, lo que permite el desarrollo y el uso de técnicas moleculares para su definición a alta resolución. Esto ha producido resultados muy valiosos para el diagnóstico y el manejo de las condiciones clínicas en las cuales estos antígenos están involucrados, como por ejemplo en la selección de donantes o productos para pacientes que necesitan un trasplante o una transfusión idéntica o compatible. La implementación de

la tecnología de secuenciación permite un análisis detallado de la expresión de estos alelos en diferentes grupos étnicos, lo cual contribuye a nuestro conocimiento sobre la evolución de las distintas poblaciones humanas y sobre el rol del polimorfismo en el desarrollo de la respuesta inmune.

Este conocimiento también ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas para la detección de los Acs específicos, ya sea usando proteínas purificadas o recombinantes expresadas en la membrana de líneas celulares o unidas a microesferas marcadas y detectadas por citometría de flujo o en la plataforma Luminex. Esto es particularmente importante en el caso de los pacientes altamente inmunizados como aquellos en espera de un trasplante, ya que permiten la clara identificación de Acs presente en el paciente, y por consiguiente, la definición de los antígenos no permitidos en un posible donante.

Referencias

1. Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R. C., Bruford, E. A., Khodiyar, V. K. et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev*, 2004; 5:889-899.
2. Traherne, J. A. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *J. Immunogenet*, 2008;35:179-192.
3. Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H., Kulski, J. K. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J. Hum Genet.*, 2009; 54:15-39.
4. Navarrete, C. Human leucocyte antigens In: *Practical Transfusion Medicine*, 3rd Ed. M. F. Murphy & D. H. Pamphilon (eds) Wiley-Blackwell, 2009. pp. 30-43

5. Ouwehand, H. & Navarrete, C. The molecular basis of blood cell alloantigens. In: *Molecular Hematology*, 3rd Ed. Proven, D. & Gribben, J. (eds) Blackwell Publishing, 2010. pp. 259-275
6. Parham, P. & McQueen, K. L. Alloreactive killer cells: hindrance and help for haematopoietic transplants. *Nat Rev Immunol.*, 2003; 3:108-121.
7. Brown, C. J. & Navarrete, C. V. Clinical relevance of the HLA system in blood transfusion. *Vox Sang.*, 2011; 101:93-105.
8. Metzker, M. L. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet.*, 2010; 11:31-46.
9. Bentley, G., Higuchi, R., Hogland, B., Goodridge, D., Sayer, D., Trachtenberg, E. A. et al. High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. *Tissue Antigens*, 2009; 74:393-403.
10. Dunn, P. P. J. Human leucocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal. *Int J Immunogenet*, 2011; 38:463-473.
11. Brown, C. & Navarrete, C. HLA antibody screening by LCT, LIFT and ELISA. In: Bidwell, J. & Navarrete, C. (eds), *Histocompatibility Testing*. London: Imperial College Press, 2000, pp. 65-98.
12. Howell, W. M., Carter, V., Clark, B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *J Clin Pathol.*, 2010; 63:387-90.
13. Terasaki, P. L. & McClelland, J. D. Microdroplet assay of human serum cytokines. *Nature*, 2000; 204:998-1000.
14. Schnaidt, M., Weinstock, C., Jurisic, M., Schmid-Horch, B., Ender, A., Wernet, D. HLA antibody specification using single-antigen beads – a technical solution for the prozone effect. *Transplantation*, 2011; 92:510-515.
15. Tait, B. D. Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. *Cur Opin Immunol*, 2009; 21:573-577.
16. Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B. et al. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens*, 2010; 75:291-455.
17. Nunes, E., Heslop, H., Fernández-Vina, M., Taves, C., Wagenknecht, D. R. et al. Definitions of histocompatibility typing terms. *Blood*, 2011; 118:e180-e183.

Antígenos y anticuerpos de los leucocitos. Técnicas de estudio e importancia clínica

CARLOS DANIEL DE LA VEGA ELENA*
EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ**

Introducción

Los neutrófilos son células que desempeñan un papel central en la defensa del huésped contra la invasión bacteriana y fúngica. En los pacientes con recuentos por debajo de $1 \times 10^9/L$ debido a enfermedades o a los efectos adversos de los tratamientos farmacológicos, existe una correlación entre el número circulante y la duración de la neutropenia con el riesgo de infección.

En las neutropenias inmunes la destrucción o alteración de la función de los neutrófilos es mediada por anticuerpos. Dependiendo de la naturaleza de la reacción inmune, podemos clasi-

* *PhD. Responsable del Laboratorio de Inmunohematología. Servicio de Hematología y Medicina Transfusional. Hospital Italiano Garibaldi (STEM SRL). Codirector de la Carrera de Especialización en Hematología. Instituto Universitario Italiano de Rosario. Rosario. Argentina. daniel.delavega@yahoo.com*

** *Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. emuniz@bst.cat*

ficar las estructuras blanco de los anticuerpos como autoantígenos y aloantígenos.

Autoantígenos granulocitarios

La pérdida de la autotolerancia conduce a un proceso autoinmune. En el neutrófilo, las estructuras blanco de los autoanticuerpos suelen ser porciones monomórficas del receptor de IgG FcγRIIIb o del complejo CD11b/CD18 presentes en el individuo respondedor y en prácticamente todos los individuos. En ocasiones, el autoanticuerpo muestra una mayor afinidad por una estructura polimórfica, simulando una especificidad aloinmune. A diferencia de esta última, la estructura blanco de estos anticuerpos está invariablemente presente en el individuo respondedor.

Aloantígenos granulocitarios

Descripción, clasificación y nomenclatura

Los neutrófilos humanos, al igual que el resto de las células sanguíneas, presentan en la cara externa de su membrana estructuras polimórficas e inmunogénicas. Estas estructuras, denominadas “aloantígenos del granulocito”, genéticamente determinadas pueden causar aloinmunización durante el embarazo, la transfusión sanguínea o el trasplante.

Una forma de clasificar los aloantígenos granulocitarios es en función de su expresión en otras células:

Antígenos comunes de granulocitos: son aquellos antígenos granulocitarios con una expresión amplia, incluyendo a los antígenos de los sistemas

de grupo sanguíneo I, P, Le^x, sialil-Le^x y a las moléculas de HLA de clase I. Estos antígenos no serán nuevamente mencionados.

Antígenos compartidos de granulocitos: incluye los antígenos granulocitarios con una distribución más restringida, generalmente expresados también en otros leucocitos. Muchos de los cuales han sido localizados en el complejo CD11/CD18.

Antígenos específicos de granulocitos: son aquellos antígenos con una expresión restringida a la membrana granulocitaria y a sus precursores. Muchos de los cuales han sido localizados en el receptor FcγIIIb (CD16b).

Nomenclatura HNA

La nomenclatura originalmente propuesta para los antígenos granulocitarios usaba la letra N de neutrófilos (aun si en la mayoría de los trabajos utilizaban granulocitos en lugar de neutrófilos aislados), seguido por una letra mayúscula que designaba el locus del gen que controlaba la expresión del antígeno, seguido por un número designando un alelo especificado para ese locus, por ejemplo NA1.¹ En 1998, en una reunión del Comité del Trabajo de antígenos de granulocitos de la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (ISBT), se acordó establecer una nueva nomenclatura basada en la localización glicoproteica de estos antígenos (HNA-siglas del inglés *human neutrophil antigens*-) que incluye tanto a los aloantígenos específicos de neutrófilos como a aquellos con una distribución algo más amplia.²

Los sistemas HNA son designados numéricamente dependiendo de la glicoproteína portadora (ej. HNA-1 = FcγRIIIb (CD16b); HNA-2 = NB1 (CD177); etc.), y los antígenos alfabéticamente, siguiendo el orden cronológico de su descubrimiento (ej. HNA-1a, HNA-1b, etc.). Hasta la fecha son cinco

los sistemas HNA descritos que incluyen un total de nueve antígenos granulocitarios (Tabla 1). Desafortunadamente, para muchos antígenos descritos con anterioridad ya no se dispone de los antisueros correspondientes de origen humano y, por lo tanto, no es posible avanzar en su caracterización.

Tabla 1. Aloantígenos de Neutrófilos Humanos (HNA)

Sistema HNA	Antígenos	Nombre anterior	Glicoproteína (CD)	Cambio de aminoácido	Alelos	Cambio de nucleótido	Referencias
HNA-1	HNA-1a	NA1	FcγRIIIb (CD16b)	Arg36 Leu38 Asn65 Ala78 Asp82 Val106	FCGRB*01	G108 C114 A197 G247 C266 G319	57 8 6
	HNA-1b	NA2	FcγRIIIb (CD16b)	Ser36 Leu38 Ser65 Ala78 Asn82 Ile106	FCGRB*02	C108 T114 G197 A247 C266 A319	1 8 6
	HNA-1c	SH	FcγRIIIb (CD16b)	Ser36 Leu38 Ser65 Asp78 Asn82 Ile106	FCGRB*03	C108 T114 G197 A247 A266 A319	12
	HNA-1d		FcγRIIIb (CD16b)	Ala78 Asn82	FCGRB*02	A247 C266	4
HNA-2	HNA-2	NB1	NB1 (CD177)	Ausencia proteína (fenotipo nulo)	CD177*01	Defecto en la expresión	15 16 17
HNA-3	HNA-3a	5b	CTL-2 (SLC44A2)	Arg154	SLC44A2	G461	9 58
HNA-3	HNA-3b	5a	CTL-2 (SLC44A2)	Gln154	SLC44A2	A461	
HNA-4	HNA-4a	MART	Mac-1, CR3 o αMβ2 (CD11b)	Arg61	ITGAM*01	G 230	26 25
HNA-5	HNA-5a	OND	LFA-1 o αLβ2 (CD11a)	Arg766	ITGAL*01	G2372	28 25

HNA-1

El sistema HNA-1 está compuesto por cuatro antígenos: HNA-1a, HNA-1b, HNA-1c³ y el recientemente descrito HNA-1d.⁴ Estos antígenos se expresan únicamente en los granulocitos neutrófilos y sus precursores, y se encuentran en todos los neutrófilos segmentados, en alrededor de la mitad de los metamielocitos neutrófilos y en un 10% de los mielocitos neutrófilos. También se hallan en forma soluble en el plasma y en otros fluidos. La herencia de estos antígenos acompaña la de su glicoproteína portadora, el FcγRIIIb.⁵⁻⁸

FcγRIIIb (CD16b)

El FcγRIII (CD16) es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, estrechamente relacionado a otros receptores de la porción Fc de las IgG (FcγR).⁹ El FcγRIII existe en dos formas no alélicas: FcγRIIIa (CD16a) y FcγRIIIb (CD16b) codificadas por los genes *FCGR3A* y *FCGR3B* respectivamente, localizados en el cromosoma humano 1q23-24.¹⁰

El FcγRIIIb (CD16b) es un receptor de baja afinidad para IgG1 e IgG3, cuya función es la remoción de los inmunocomplejos circulantes y la fagocitosis de microorganismos opsonizados. Este receptor es específico del neutrófilo y se encuentra en gran número en la membrana plasmática. La presencia del receptor en el plasma se debe probablemente al clivaje de éste como consecuencia de la apoptosis de los neutrófilos.¹¹

Se trata de una glicoproteína de 186 aminoácidos, anclada a la membrana

plasmática vía un grupo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI).¹⁰

Los anticuerpos contra los antígenos que componen el sistema HNA-1 reconocen tres variantes polimórficas e inmunogénicas del FcγRIIIb (CD16b). Las tres variantes alotípicas de este receptor, denominadas FcγRIIIb^{HNA-1a}, FcγRIIIb^{HNA-1b} y FcγRIIIb^{HNA-1c}, difieren bioquímicamente entre sí en su secuencia aminoacídica y en el patrón de glicosilación. El FcγRIIIb^{HNA-1a} porta el antígeno HNA-1a, el FcγRIIIb^{HNA-1b}, el HNA-1b y al HNA-1d, y el FcγRIIIb^{HNA-1c} porta tanto el antígeno HNA-1c como el HNA-1b.

A nivel de la secuencia de aminoácidos entre el FcγRIIIb^{HNA-1a} y FcγRIIIb^{HNA-1b} las diferencias son cuatro sustituciones en los residuos 36, 65, 82 y 106 de la proteína madura (Figura 1). Además, el FcγRIIIb^{HNA-1b} presenta seis sitios potenciales de N-glicosilación frente a los cuatro de FcγRIIIb^{HNA-1a} de lo cual resulta una diferencia de peso molecular aparente de 65 kDa-80 kDa y 50 kDa-65 kDa respectivamente.⁶ Los sitios adicionales de glicosilación están localizados en dos de los cuatro residuos del dominio distal tipo-inmunoglobulina que define los polimorfismos HNA-1 y su interacción con la IgG. El FcγRIIIb^{HNA-1c} es semejante al FcγRIIIb^{HNA-1b}, excepto por un cambio de una alanina por un ácido aspártico en el residuo 78. Este cambio elimina la inmunorreactividad HNA-1d, pero no la inmunorreactividad HNA-1b.

FCGR3B

El gen *FCGR3B* que codifica el FcγRIIIb está localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q23) y consiste en cinco exones.

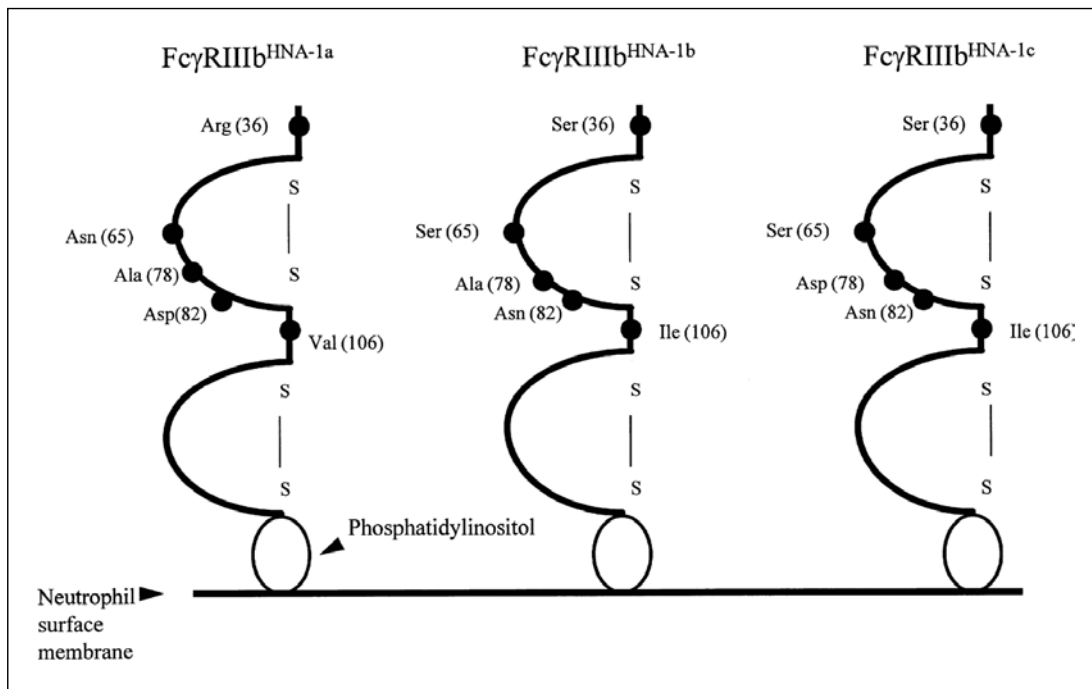


Figura 1. Representación esquemática de la sustitución de aminoácidos que resultan en las formas HNA-1a, -1b y -1c del FcγRIIIb*

Los tres alelos que codifican para las variantes FcγRIIIb^{HNA-1a}, FcγRIIIb^{HNA-1b} y FcγRIIIb^{HNA-1c}, fueron denominados siguiendo las recomendaciones internacionales como *FCGR3B*1*, *FCGR3B*2* y *FCGR3B*3* respectivamente.

El alelo *FCGR3B*1* difiere del *FCGR3B*2* en cinco nucleótidos en las posiciones 141, 147, 227, 277 y 349. Cuatro de los cambios nucleotídicos resultan en las diferencias en la secuencia aminoacídica entre los antígenos HNA-1a y HNA-1b, y el quinto polimorfismo en la posición 147 es silencioso.⁵⁻⁸ Como era de esperar, el alelo *FCGR3B*3* es idéntico al *FCGR3B*2*, excepto por la sustitución de una adenina por una citosina en la

posición 266,¹² responsable del cambio en el residuo 78 del FcγRIIIb (Tabla 2). Esta gran homología estaría indicando probablemente que el alelo *FCGR3B*3* surgió como resultado de una mutación puntual del *FCGR3B*2*.

Inesperadamente no todos los individuos poseen dos copias del *FCGR3B*. Muchos individuos caucásicos HNA-1c (+) presentan tres locus *FCGR3B*, probablemente por duplicación génica.¹³ Como contrapartida, existen individuos que presentan una delección del gen, que en su forma homocigota es responsable del denominado fenotipo HNA-1 nulo (herencia recesiva), caracterizado por la ausencia del receptor FcγRIIIb y de los antígenos HNA-1 en los granulocitos.

Tabla 2.

Alelo codificante Fc γ RIIIb	Fc γ RIIIb Residuo aminoacídico						Antígeno
	36	38	65	78	82	106	
FCGR3A	Arg	Leu	Ser	Ala	Asp	Ile	
FCGR3B*01	Arg	Leu	Asn*	Ala	Asp	Val*	HNA-1a
FCGR3B*02	Ser*	Leu	Ser	Ala	Asn*	Ile	HNA-1b,1d
FCGR3B*03	Ser*	Leu	Ser	Asp*	Asn*	Ile	HNA-1b,1c
*Diferencia en el residuo aa con respecto a Fc γ RIIIa ⁴							

Frecuencias

La frecuencia de los antígenos HNA-1a, HNA-1b y HNA-1c varía considerablemente entre las distintas poblaciones caracterizadas. En las poblaciones negras y caucásicas, el antígeno HNA-1b se presenta más frecuentemente que el HNA-1a (75%-90% vs 44%-74%), mientras que en las poblaciones orientales y amerindias se da el caso contrario (36%-70% vs 83%-91%).

El antígeno HNA-1c se observa con una frecuencia alta en la población africana negra (20%-30%), mientras que en las poblaciones orientales y amerindias el hallazgo del antígeno es excepcional. En caucásicos la frecuencia de éste varía entre 5% y 10%.

La incidencia de la deficiencia del Fc γ RIIIb (fenotipo HNA-1 nulo) es baja en las poblaciones caucásicas (alrededor de 0,1%), y algo más frecuente (alrededor del 1%) en africanos y afroamericanos. Alrededor del 3% de los individuos caucásicos podría ser heterocigotos para la deficiencia génica.⁹ El fenotipo HNA-1 nulo está virtualmente ausente entre los amerindios.

Expresión

La densidad del Fc γ RIIIb en la membrana de los neutrófilos se correlaciona con el número de genes FCGRB que posee

un individuo. Normalmente hay entre 100.000 y 200.000 copias del Fc γ RIIIb por neutrófilo,⁸ pero los individuos con tres copias del gen FCGR3B expresan mayores cantidades del receptor en su superficie. Los individuos heterocigotos para la delección del gen expresan aproximadamente la mitad del Fc γ RIIIb que un individuo normal; también los niveles plasmáticos del Fc γ RIIIb soluble en estos individuos son del 50%.

Los neutrófilos de pacientes con Hemoglobinuria Paroxística Nocturna presentan una reducción muy importante del número de Fc γ RIIIb y de los antígenos HNA-1 que portan, debido a la alteración en el anclaje de las glicoproteínas generado por GPI.

Función, anticuerpos e importancia clínica

La importancia clínica de los polimorfismos HNA-1 todavía no se conoce completamente. El Fc γ RIIIb no une IgG2 o IgG4, pero sí las IgG1 y IgG3 como complejos inmunes *in vitro*, los polimorfismos HNA-1 influyen la capacidad del Fc γ RIIIb para fagocitar partículas opsonizadas con IgG. El Fc γ RIIIb^{HNA-1a} presenta una mayor capacidad fagocítica probablemente por los distintos patrones de glicosilación de las variantes alotípicas. Los granulocitos de indivi-

duos con genotipo HNA-1a1a muestran mayor capacidad de fagocitosis que los de individuos con genotipo HNA-1b1b. Existe cierta evidencia de su efecto *in vivo*: los pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica homocigotos para el alelo FCGR3B*1 (HNA-1a1a) serían menos propensos a desarrollar infecciones graves del tracto gastrointestinal o genitourinario comparado con aquellos pacientes heterocigotos y homocigotos para el alelo FCGR3B*2 (HNA-1a1b y HNA-1b1b).¹⁴

***FcγRIIIb* nulo**

Debido a que la mayoría de los individuos identificados como deficientes de FcγRIIIb no tienen historias de infecciones bacterianas serias o autoinmunidad, esta deficiencia relativamente frecuente puede pasar sin ser reconocida. Sin embargo, las mujeres deficientes en FcγRIIIb pueden formar isoanticuerpos contra el mismo, capaces de causar una neutropenia neonatal isoimmune.

***HNA-2a* (NB1)**

El antígeno HNA-2a fue descrito en 1971 por Lalezari y col. como el antígeno específico de neutrófilo 'NB1'. Este antígeno de alta frecuencia en africanos, asiáticos y caucásicos (Tabla 3),¹⁵ está asociado a la glicoproteína NB1 (CD177), de 56 kDa a 64 kDa y anclada a la membrana plasmática y a la de pequeñas vesículas y gránulos específicos a través de un grupo GPI. Una característica distintiva del antígeno HNA-2a es su expresión limitada a una subpoblación de los granulocitos neutrófilos.^{16,17}

Los individuos tipificados como HNA-2a negativo y la subpoblación de neutrófilos HNA-2a negativo muestran

un fenotipo HNA-2a nulo, es decir, sus neutrófilos son deficientes de la glicoproteína portadora. Los aloanticuerpos formados por los individuos HNA-2a negativo son, por lo tanto, isoanticuerpos.

Genética

Kissel y col. secuenciaron el gen que codifica el antígeno HNA-2 y lo localizaron en el cromosoma 19q13.2.¹⁸ El cDNA de HNA-2a consiste en 1.311pb que codifican para 437 aminoácidos incluyendo un péptido señal de veintiún aminoácidos.

El fenotipo HNA-2a-nulo podría ser resultado de un *splicing* incorrecto que resultaría en un ARNm que contiene secuencias intrónicas y un codón stop prematuro, mientras que la expresión heterogénea sería atribuida a la falta de transcripción génica en una subpoblación de neutrófilos.¹⁹

Expresión

El antígeno HNA-2a se expresa únicamente en los neutrófilos, y se encuentra en la membrana plasmática, en la membrana de los gránulos secundarios (específicos) y en las vesículas secretoras. Durante la activación del neutrófilo, el CD177 se transloca desde las vesículas secretoras y gránulos específicos a la membrana plasmática. Se observa en neutrófilos desde el estadio mielocito en adelante. El antígeno HNA-2a es el único antígeno expresado heterogéneamente solo en una subpoblación de neutrófilos. El tamaño de la subpoblación de neutrófilos HNA-2a-positivo varía individualmente entre 0% y 100% con una variación de 55% ± 22%. No se han encontrado diferen-

Tabla 3. Frecuencias antigénicas (%) y frecuencias génicas en diferentes poblaciones

Poblaciones	HNA-1a (NA1)	HNA-1b (NA2)	HNA-1c (SH)	HNA nulo (NA nulo)	HNA-2a (NB1)	HNA-3a (5b)	HNA-4a (MART)	HNA-5a (OND)
Negros africanos	68 (0,43)	78 (0,53)	28-38 (0,12-0,21)	2	98	nd	nd	88
Africanos americanos	46 (0,31)	84 (0,69)	23 (0,12)	nd	nd	nd	nd	nd
Chinos	90 (0,68)	52 (0,31)	0	nd	99 (0,91)	nd	nd	65
Indios asiáticos	44 (0,30)	83 (0,70)	16	nd	nd	nd	nd	nd
Japoneses	88 (0,65)	51-64 (0,30-0,38)	<0,4	<0,4	89 (0,66)	nd	nd	nd
Coreanos	nd	nd	<1	nd		nd	99	96
Europeos	54-58 (0,32-0,35)	87-88 (0,64-0,65)	5-7	0,2-0,8	87-94 (0,63-0,75)	89-99	96	96 (0,82)
USA	56-62 (0,34-0,37)	89 (0,67)	5	nd	97 (0,83)	nd	nd	96 (0,82)
Argentinos	68,2 (0,44)	76,0 (0,56)	4,7 (0,023)	nd	nd	nd	nd	nd
Amerindios-USA	91 (0,55)	80 (0,45)	1	nd	nd	nd	100	96
Amerindios-Brasil	nd (0,68)	nd (0,21)	<1	11				

nd: no descrita

cias entre caucásicos, afroamericanos y orientales. La expresión de HNA-2a ha sido reportada como más intensa en mujeres (63%) que en hombres (53%), y disminuida en mujeres mayores, pero no en hombres, lo cual sugiere que los estrógenos podrían influenciar la expresión de HNA-2. Estas observaciones están de acuerdo con el hecho de que la expresión de HNA-2 aumenta durante el embarazo.

Función y significación clínica

El CD177 está involucrado en la adhesión de los neutrófilos al endotelio y participar de la migración transendotelial. Se observa una significativa *up-regulation* de la expresión de HNA-2a en

pacientes con infecciones bacterianas y Policitemia Vera, así como en donantes de células hematopoyéticas estimulados con factores de crecimiento.²⁰

HNA-3a (5b) y HNA-3b (5a)

Los antígenos HNA-3a y HNA-3b (anteriormente antígenos del sistema 5) fueron descubiertos por van Leeuwen *et al* en 1964, usando antisueros obtenidos de gestantes inmunizadas.²¹ Los antígenos del sistema 5 fueron encontrados expresados en granulocitos, plaquetas, linfocitos, riñones, bazo y tejido linfático. Más tarde se evidenció que este sistema es específico de granulocitos y que la amplia expresión que le fue atribuida anteriormente podría ser en realidad a causa de

otros aloanticuerpos, fundamentalmente de especificidad anti-HLA.²²

La base molecular de este sistema fue establecida recientemente: un cambio de un único aminoácido en la posición 154 de la CTL-2 (choline transporter-like protein-2) por una arginina confiere a esa proteína una especificidad HNA-3a.²³ En cambio, una glutamina define el antígeno HNA-3b.

Este antígeno ha sido estudiado sólo en poblaciones caucásicas donde se reportan frecuencias fenotípicas que varían entre 89% y 96%.

Los aloanticuerpos anti-HNA-3a son detectados frecuentemente en casos muy graves de lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (LPA-AT), particularmente en los casos fatales o aquellos que requieren ventilación asistida.²⁴ También pueden causar reacciones febriles transfusionales y neutropenia neonatal aloinmune. La capacidad de estos anticuerpos para causar la aglutinación de los neutrófilos es tan característica que la técnica más adecuada para su detección es la leucoaglutinación.

Los antisueros contra el antígeno HNA-3b (5a) son raros y, consecuentemente, su significado clínico no ha sido totalmente dilucidado.

HNA-4a (MART)

El antígeno “MART”, ahora llamado HNA-4a, fue descubierto en 1986 en Estados Unidos, por Kline *et al.*, durante una búsqueda sistemática de anticuerpos antigranulocitarios en mujeres múltiparas.

El HNA-4a resulta del cambio de una arginina en lugar de una histidina en el residuo 61 de la subunidad α M

(CD11b) de la familia de las integrinas β 2 (CD18), como consecuencia de un cambio de un único nucleótido (SNP) 230A>G en la secuencia codificante (*ITGAM*01 (230G)*).²⁵

Ambas subunidades forman el complejo CD11b/CD18 (también conocido como Mac-1, CR3 o α M β 2) que presenta un patrón de herencia autosómico dominante, y se expresa en granulocitos, monocitos, células NK y en una subpoblación de linfocitos T.²⁶

Este complejo juega un papel muy importante en la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales y plaquetas y también en la fagocitosis. No se conoce el efecto del polimorfismo sobre la función del complejo CD11b/CD18.

El antígeno HNA-4a presenta una frecuencia fenotípica alta en todas las poblaciones estudiadas. Este antígeno está presente en el 99,1% de la población norteamericana, 98,6% de la alemana, 99,5% de la australiana y en el 100% de la población coreana y amerindia (Tabla 3).

La incompatibilidad fetomaterna para el antígeno HNA-4a ha sido reportada como responsable de un único caso de neutropenia neonatal aloinmune.²⁷ El complejo CD11b/CD18 es un blanco frecuente de autoanticuerpos antigranulocitarios.

HNA-5a (OND)

El antígeno OND, ahora llamado HNA-5a, fue descubierto en 1979 por Décary *et al.*²⁸ Este antígeno está localizado en la cadena α L (CD11a) de la familia de las integrinas β 2.

El HNA-5a está definido por una sustitución de una arginina por una treo-

nina en el residuo 766 de la subunidad CD11a, como consecuencia de un cambio de un único nucleótido 2372HC>G en la secuencia codificante (ALELO: *IT-GAL*01 (2372G)*).²⁵

El complejo CD11a/CD18 también conocido como LFA-1 o integrina $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ se expresa en granulocitos, monocitos y linfocitos T y B.²⁸ Este complejo funciona como una molécula de adhesión. No se sabe si la función de la integrina está influenciada por el polimorfismo HNA-5a.

La incompatibilidad fetomaterna para el antígeno HNA-4a ha sido reportada como responsable de un único caso de neutropenia neonatal aloinmune.²⁹

El antígeno presenta una frecuencia fenotípica entre 65% y 96% en las diferentes poblaciones estudiadas (Tabla 3).

Frecuencias poblacionales

Como ya se comentó, las frecuencias fenotípicas y génicas de algunos aloantígenos de neutrófilos humanos han sido determinadas en diversas poblaciones y se han observado entre ellas diferencias en su distribución (Tabla 3).

Conocer las frecuencias alélicas HNA en una población dada y disponer de un panel de células con fenotipos caracterizados, es importante para:

- El diagnóstico serológico de las reacciones transfusionales.
- El diagnóstico de las neutropenias aloinmunes y el consejo a mujeres con antecedentes obstétricos de neutropenia aloinmune neonatal.
- En menor medida, contar con un marco para la búsqueda de hemocomponentes compatibles para pacientes con anticuerpos anti-HNA.

Detección y caracterización de los anticuerpos y antígenos de neutrófilos

Un gran número de técnicas se han desarrollado para la detección de anticuerpos antigranulocitarios en los últimos veinticinco años, pero sólo unas pocas han demostrado ser adecuadas para el diagnóstico serológico. El empleo de al menos dos técnicas es esencial para maximizar la detección de estos anticuerpos.³⁰

Actualmente se recomienda como método óptimo para la detección de anticuerpos antigranulocitarios una combinación del test de granuloaglutinación (GAT) y la técnica de inmunofluorescencia indirecta para granulocitos (GIFT, acrónimo de Granulocyte Immunofluorescence Test).³¹

La técnica de GIFT nos permite identificar claramente los anticuerpos de especificidad anti-HNA-1, -2, -4 o 5, bien en el microscopio de fluorescencia o a través de la citometría de flujo (Figura 2). La menor densidad antigénica del antígeno HNA-3a hace que los anticuerpos de especificidad anti-HNA-3a den lugar en algunas ocasiones a resultados muy débiles. Por otra parte, la característica expresión de HNA-2a en forma de dos subpoblaciones de granulocitos, una que expresa el antígeno y otra en la que éste es indetectable, permite la discriminación clara de esta especificidad respecto a otras.

El GAT es la técnica de elección para la detección de anticuerpos anti-HNA-3a. El fundamento consiste en la migración y aglutinación de los neutrófilos en presencia de un plasma que contenga anticuerpos, y que podemos

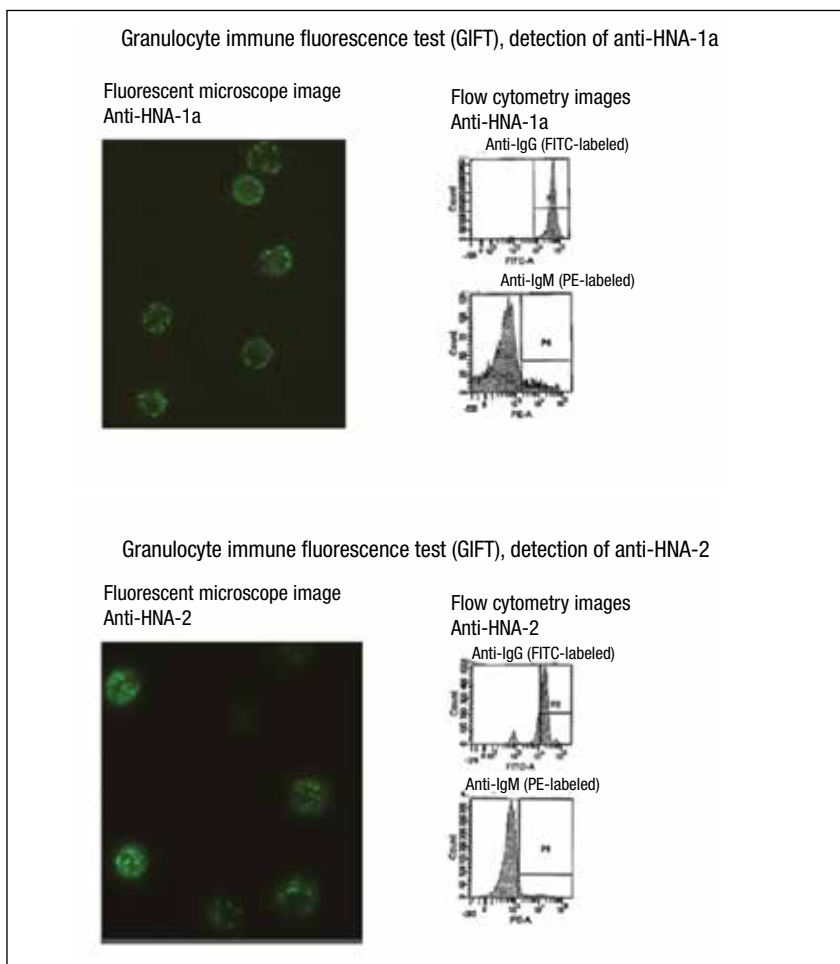


Figura 2. Ejemplos en la lectura por microscopía de fluorescencia con la técnica de GIFT

Fuente: *Granulocyte Immunology* de J. Bux. Máster Internacional en Medicina Transfusional (EMTACT, 2013), Módulo de Inmunohematología (Coordinadores: M de Hass y E Muñoz-Díaz).

evaluar a través del microscopio (Figura 3). Los anticuerpos dirigidos contra otros antígenos HNA pocas veces son aglutinantes, y su detección se realiza de forma óptima con la técnica de inmunofluorescencia. Los anticuerpos anti-HLA de clase I anti-HLA-A2 también pueden aglutinar a los neutrófilos, por lo que su detección es factible con la técnica de GAT.

Una desventaja de ambas técnicas se debe a que éstas son susceptibles de

interferencia por inmunocomplejos y anticuerpos anti-HLA (a menos que el suero sea preabsorbido con plaquetas). La prueba de MAIGA (del inglés *monoclonal antibody-specific immobilization of granulocyte antigen*)^{32,33} utiliza anticuerpos monoclonales para capturar las glicoproteínas de membrana blanco que tienen unido anticuerpo y evita la interferencia por anticuerpos anti-HLA e inmunocomplejos. El MAIGA permite la elucidación de mezclas

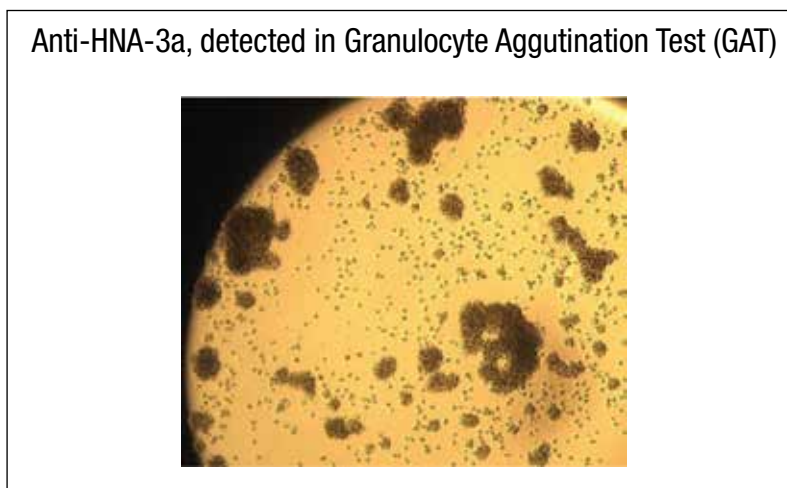


Figura 3. Técnica de Granuloaglutinación (GAT)

Fuente: *Granulocyte Immunology* de J. Bux. Máster Internacional en Medicina Transfusional (EMTACT, 2013), Módulo de Inmunohematología (Coordinadores: M de Hass y E Muñiz-Díaz).

complejas de anticuerpos antigranulocitos con diferentes especificidades en el suero humano. La escasez de anticuerpos monoclonales apropiados restringe la aplicación del MAIGA, pero actualmente por esta técnica pueden ser detectados los anticuerpos antigranulocitarios reactivos contra FcγRIIIb, HNA-2a y CD11/18.^{25,32,34} La prueba de MAIGA es incapaz de detectar todos los anticuerpos porque la unión del anticuerpo del paciente puede ser bloqueada por el anticuerpo monoclonal de “captura” debido a interferencia estérica. Esta posibilidad hace aconsejable un mínimo de dos anticuerpos monoclonales frente a cada una de las glicoproteínas que albergan los diferentes polimorfismos HNA. Los anticuerpos anti-HNA-3a no pueden ser investigados con esta técnica porque no disponemos de anticuerpos reactivos contra la glicoproteína CTL2 que se hayan demostrado útiles para este fin.

Las mismas técnicas mencionadas son empleadas para el tipaje serológico

de los antígenos HNA. Sin embargo, los antisueros humanos son difíciles de obtener y contienen con frecuencia anticuerpos dirigidos contra los antígenos HLA de clase I, limitando así su uso a los análisis “glicoproteína-específicos”, tales como la técnica de MAIGA. En la actualidad se dispone comercialmente de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos HNA-1a, -1b y -2a que son usados para fenotipar neutrófilos por inmunofluorescencia y citometría de flujo. Esta última metodología es rápida y fácil, permitiendo utilizar sangre total en lugar de neutrófilos aislados.

Actualmente, el tipaje serológico ha sido reemplazado por el análisis del genotipo HNA mediante técnicas de PCR-SSP *in house* o comerciales (Figura 4). La genotipificación HNA es posible para ocho de los nueve antígenos descritos a partir de la determinación de sus bases moleculares. Ésta puede realizarse con ADN genómico obtenido de cualquier material celular. Aspecto muy importante, ya que elimina

la necesidad de trabajar con granulocitos frescos, lo cual permite diferir la tipificación durante meses; situación muy distinta al plazo que impone la extrema labilidad de los granulocitos para su empleo en técnicas serológicas. El tipaje del isoantígeno HNA-2a sigue efectuándose por serología, dado

que la base molecular del déficit del antígeno obedece a un defecto de expresión génica. El tipaje a gran escala, muy útil en estudios de población, también puede llevarse a cabo con técnicas de PCR a tiempo real empleando sondas TaqMan, o bien mediante secuenciación.

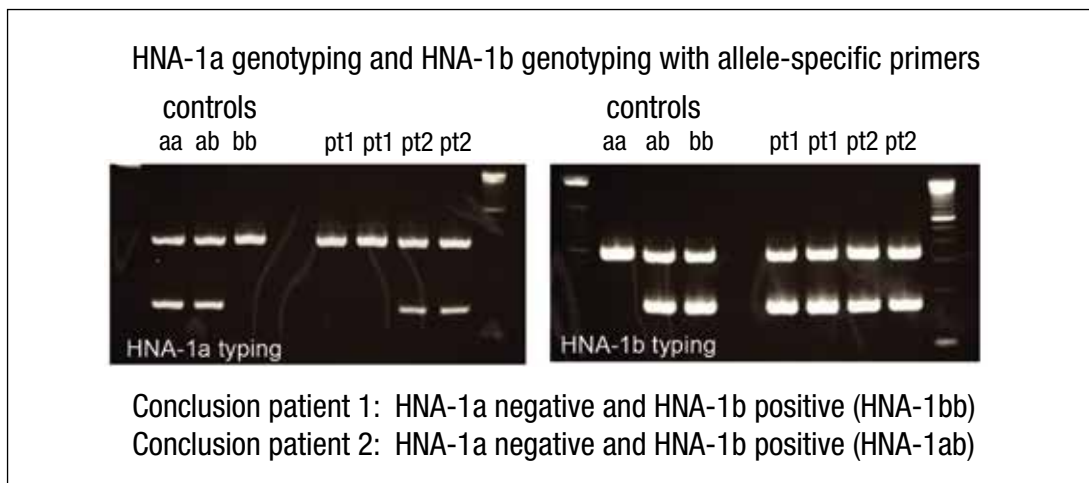


Figura 4. Ejemplos de genotipificación HNA con PCR-SSP

Fuente: *Granulocyte Immunology* de J. Bux. Máster Internacional en Medicina Transfusional (EMTACT, 2013), Módulo de Inmunohematología (Coordinadores: M de Hass y E Muñiz-Díaz).

Importancia clínica de la aloinmunización HNA

Las glicoproteínas granulocitarias son el blanco frecuente del sistema inmune. Sus polimorfismos son reconocidos por linfocitos B y T alogénicos para despertar una respuesta efectora esencialmente humoral. Los anticuerpos generados se unen a sus correspondientes antígenos en la superficie del granulocito y conducen al secuestro y destrucción de estas células por los macrófagos, vía la interacción con receptores para la porción Fc de la inmunoglobulina, como se ha descrito para la plaqueta.³⁵ Este proceso resulta

en neutropenia. Estos anticuerpos están usualmente dirigidos contra el receptor de IgG de baja afinidad Fc γ RIIb (CD16), el receptor de la fracción C3bi del complemento (CD11b/CD18) y unas pocas glicoproteínas más, todavía no caracterizadas.

Los citados aloanticuerpos pueden causar los siguientes procesos aloinmunes: la lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (LPA-RT, habitualmente denominada TRALI, según su acrónimo en inglés), la reacción febril no hemolítica, la neutropenia neonatal aloinmune y la neutropenia inmune asociada con el trasplante de médula ósea. Se excluye a la neutrope-

nia autoinmune por no ser causada por aloanticuerpos, sino por autoanticuerpos. Sobre esto último es importante remarcar que en ocasiones el autoanticuerpo puede “simular” una especificidad HNA, pero su etiopatogenia es distinta al resto de los cuadros descritos a continuación.

Lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión (LPA-RT)

Desde su descripción inicial, en 1951,³⁶ y el empleo de la denominación TRALI, en 1983,³⁷ han sido muchos los casos graves o fatales descritos de esta complicación de la transfusión sanguínea considerada como una de las principales causas de morbi-mortalidad asociada a la transfusión.³⁸ En 2004 se celebró en Toronto una conferencia de consenso³⁹ para establecer claramente las bases del diagnóstico y la prevención de esta grave complicación. Según la conferencia, el TRALI se caracteriza por la aparición de un cuadro brusco de distrés respiratorio a los pocos minutos de iniciar la transfusión y hasta un máximo de seis horas, hipoxemia ($PaO_2 / FiO_2 < 300$ mm Hg, o saturación de O_2 90% u otra evidencia clínica), infiltrados pulmonares bilaterales visibles por radiología y compatibles con edema pulmonar y que no exista evidencia de insuficiencia cardíaca. Se exige, además, que no haya factores de riesgo de lesión pulmonar aguda (ALI) como aspiración, traumatismo múltiple, neumonía, bypass cardiopulmonar, quemaduras extensas, shock, sepsis, etc. En el caso de que uno o más de estos factores estén presentes al producirse la complicación, cabe hablar de un “posible TRALI”.

El TRALI inmune es debido a anticuerpos antileucocitarios presentes en el plasma de los componentes transfundidos procedentes de donantes aloimmunizados, especialmente de mujeres sensibilizadas a través de gestaciones previas. Por tanto, la incidencia es principalmente dependiente del volumen de plasma transfundido, y por ello es mucho más elevada en el caso de las transfusiones de plasma.⁴⁰⁻⁴² Con la introducción de la estrategia de no transfundir plasma procedente de donantes de sexo femenino en diferentes países europeos, el número de casos recogidos por los sistemas de Hemovigilancia se ha reducido notablemente y los casos fatales son excepcionales.^{42,43}

Está ampliamente aceptada la teoría de que en el TRALI inmune a los aloanticuerpos transfundidos aglutinan y activan a los neutrófilos que en la microcirculación pulmonar se lisan y liberan enzimas proteolíticas y ROS.⁴⁴ Sin embargo, no todos los componentes portadores de anticuerpos antileucocitarios acaban produciendo un TRALI. La reacción suele observarse especialmente en pacientes graves cuyos neutrófilos, monocitos, plaquetas y endotelio ya están dispuestos (*primed*), preparados para liberar mediadores solubles que van a actuar sobre los neutrófilos activados y a potenciar las acciones que van a desencadenarse. Este modelo llamado en “dos golpes” ha sido recientemente ratificado por la observación de que los anticuerpos anti-HNA-3a, que suelen producir los casos más graves, tienen la capacidad de unirse directamente al endotelio pulmonar induciendo la liberación de ROS y de mediadores solubles directa-

mente en el punto de lesión tisular.⁴⁵ Cuando los componentes sanguíneos no son leucorreducidos, cabe la posibilidad de que el anticuerpo responsable esté presente en el receptor.

Existe un segundo tipo de TRALI, el llamado no inmune, que puede producirse por la acción de otras sustancias solubles con capacidad para activar a los neutrófilos. Los hematíes y las plaquetas almacenadas liberan lípidos como la lisofosfatidilcolina que tiene esta capacidad, y que no se detectan en los componentes frescos.^{46,47} Los pacientes con procesos oncohematológicos y enfermedades cardíacas son considerados pacientes de riesgo para el TRALI no inmune, pero las reacciones que sufren suelen ser de carácter menos grave que en el TRALI de mecanismo inmune.³⁸

Ante la sospecha de una reacción de este tipo, se debe detener la transfusión inmediatamente y administrar oxígeno y asistencia ventilatoria en los casos que así lo requieran. En muchos pacientes se administran esteroides e incluso diuréticos, aunque no hay ninguna evidencia que avale la indicación de estos fármacos. En el laboratorio se estudiará la presencia de anticuerpos con especificidad HLA o contra antígenos específicos de neutrófilos en el suero del donante y en el receptor, aunque el estudio de este último puede obviarse si estamos administrando componentes leucorreducidos. Para catalogar el cuadro como TRALI inmune es fundamental que los anticuerpos detectados en el donante se correspondan con el fenotipo o genotipo del receptor, o bien que una prueba cruzada entre ambos resulte positiva. El mero hallaz-

go de los anticuerpos no es suficiente si no probamos esta correlación entre el agente agresor y el receptor diana. Finalmente, debe tenerse en cuenta que el estudio del laboratorio nos permite catalogar como inmune o no inmune a esta complicación, pero que el diagnóstico de TRALI es eminentemente clínico, y la ausencia de anticuerpos nunca excluye este diagnóstico.

Reacción febril no hemolítica

Se define como un incremento de la temperatura de ≥ 1 °C asociado con una transfusión y sin ninguna otra causa atribuible. Se acompaña de escalofríos. La mayoría son benignas, aunque algunas pueden causar una molestia significativa o cambios hemodinámicos. Esto ocurre debido a la reacción de aloanticuerpos en el plasma del receptor contra antígenos específicos de granulocitos, anticuerpos dirigidos contra antígenos HLA o HPA e incluso a la infusión de citoquinas presentes en el producto transfundido (IL-1, IL-8, TNF α).⁴⁸

Como la fiebre puede ser la manifestación inicial de cualquier reacción postransfusional, se debe interrumpir inmediatamente la transfusión, mantener la hidratación y administrar antihiperféticos.

Neutropenia aloinmune neonatal

Durante el embarazo, las madres pueden aloinmunizarse contra los antígenos granulocitarios que el feto ha heredado del padre biológico. La neutropenia neonatal aloinmune (NNA) ocurre cuando los anticuerpos de clase IgG maternos dirigidos contra estos an-

tígenos cruzan la placenta ocasionando la destrucción de los neutrófilos en el feto y/o en el recién nacido.^{49,50} Se calcula que la NNA se da con una frecuencia de uno cada dos mil nacimientos de los que el 40% acontecen con la primera gestación. Aproximadamente entre un 1% y un 3% de mujeres gestantes se inmunizan, pero sólo entre el 0,1% y el 0,4% de los anticuerpos se identifican como anticuerpos que claramente pueden asignarse a una determinada especificidad HNA.^{51,52} Habitualmente, los anticuerpos responsables van dirigidos contra los antígenos de la proteína FcγRIIIb o HNA-2.^{15,49,53,54} Las madres con deficiencia de FcγRIIIb también pueden producir isoanticuerpos específicos contra este receptor causando neutropenia neonatal.

La mayoría de los recién nacidos experimenta una neutropenia aislada (número de neutrófilos $<1.5 \times 10^3/L$), con recuentos absolutos menores a $0,5 \times 10^3/L$ en los casos más graves. Como durante la vida intrauterina el feto está protegido, no es hasta el nacimiento que comienzan a observarse las complicaciones infecciosas previsibles, mayoritariamente onfalitis y estafilodermatitis.³ El cuadro clínico suele ser autolimitado y resolverse entre dos y seis meses. En los casos más graves con neutropenia persistente puede ser necesario el tratamiento con factor estimulante de colonias granulocitarias (G-CSF) o inmunoglobulinas intravenosas a altas dosis (IgGiv).⁵⁵

La onfalitis y las infecciones cutáneas están frecuentemente asociadas a este cuadro. Muy raramente las infecciones más graves, resultan en meningitis o neumonía.^{1,3} Una mortalidad asociada a este cuadro del 5% fue re-

portada en un estudio.⁵⁶ El tratamiento de los niños afectados se limita al uso intermitente de antibióticos para controlar las infecciones bacterianas e IgGiv y factores estimulantes de colonias de granulocitos para elevar los niveles de neutrófilos.

Referencias

1. Lalezari, P., Radel, E. Neutrophil-specific antigens: immunology and clinical significance. *Semin Hematol*, 1974; 11: 281-90.
2. Bux, J. Nomenclature of granulocyte alloantigens. ISBT Working Party on Platelet and Granulocyte Serology, Granulocyte Antigen Working Party. International Society of Blood Transfusion. *Transfusion*, 1999; 39: 662-3.
3. Bux, J., Jung, K. D., Kauth, T., Mueller-Eckhardt, C. Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. *Transfus Med*, 1992; 2: 143-9.
4. Reil, A., Sachs, U. J., Siahianidou, T., Flesch, B. K., Bux, J. HNA-1d: a new human neutrophil antigen located on Fcγ receptor IIIb associated with neonatal immune neutropenia. *Transfusion*, 2013.
5. Trounstein, M. L., Peltz, G. A., Yssel, H., Huizinga, T. W., von dem Borne, A. E., Spits, H., et al. Reactivity of cloned, expressed human Fc gamma RIII isoforms with monoclonal antibodies which distinguish cell-type-specific and allelic forms of Fc gamma RIII. *Int Immunol*, 1990; 2: 303-10.
6. Ory, P. A., Clark, M. R., Kwoh, E. E., Clarkson, S. B., Goldstein, I. M. Sequences of complementary DNAs that encode the NA1 and NA2 forms of Fc receptor III on human neutrophils. *J Clin Invest*, 1989; 84: 1688-91.
7. Ravetch, J. V., Perussia, B. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med*, 1989; 170: 481-97.
8. Huizinga, T. W., Kleijer, M., Tetteroo, P.A., Roos, D., von dem Borne, A. E. Biallelic neu-

- trophil Na-antigen system is associated with a polymorphism on the phospho-inositol-linked Fc gamma receptor III (CD16). *Blood*, 1990; 75: 213-7.
9. Metcalfe, P., Watkins, N. A., Ouwehand, W. H., Kaplan, C., Newman, P., Kekomaki, R. et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang*, 2003; 85: 240-5.
 10. van de Winkel, J. G., Capel, P. J. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today*, 1993; 14: 215-21.
 11. Huizinga, T. W., de Haas, M., Kleijer, M., Nuijens, J. H., Roos, D., von dem Borne, A. E. Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J Clin Invest*, 1990; 86: 416-23.
 12. Bux, J., Stein, E. L., Bierling, P., Fromont, P., Clay, M., Stroncek, D. et al. Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc gamma receptor IIIb. *Blood*, 1997; 89: 1027-34.
 13. Koene, H. R., Kleijer, M., Roos, D., de Haas, M., Von dem Borne, A. E. Fc gamma RIIIB gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct Fc gamma RIIIB genes in NA(1+,2+)SH(+) individuals. *Blood*, 1998; 91: 673-9.
 14. Foster, C. B., Lehrnbecher, T., Mol, F., Steinberg, S. M., Venzon, D. J., Walsh, T. J., et al. Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*, 1998; 102: 2146-55.
 15. Lalezari, P., Murphy, G. B., Allen, F. H. Jr. NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J Clin Invest*, 1971; 50: 1108-15.
 16. Stroncek, D. F., Skubitz, K. M., McCullough, J. J. Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. *Blood*, 1990; 75: 744-55.
 17. Goldschmeding, R., van Dalen, C. M., Faber, N., Calafat, J., Huizinga, T. W., van der Schoot, C. E. et al. Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils. *Br J Haematol*, 1992; 81: 336-45.
 18. Kissel, K., Santoso, S., Hofmann, C., Stroncek, D., Bux, J. Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions. *Eur J Immunol*, 2001; 31: 1301-9.
 19. Kissel, K., Scheffler, S., Kerowgan, M., Bux, J. Molecular basis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency. *Blood*, 2002; 99: 4231-3.
 20. Gohring, K., Wolff, J., Doppl, W., Schmidt, K. L., Fenchel, K., Pralle, H. et al. Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *Br J Haematol*, 2004; 126: 252-4.
 21. Van Leeuwen, A., Eernisse, J. G., Van, R. A. New Leucocyte Group with Two Alleles: Leucocyte Group Five. *Vox Sang*, 1964; 9: 431-46.
 22. Kuijpers, R. W., Dooren, M. C., von dem Borne, A. E., Ouwehand, W. H. Detection of human monocyte-reactive alloantibodies by flow cytometry after selective downmodulation of the Fc receptor I. *Blood*, 1991; 78: 2150-6.
 23. Greinacher, A., Wesche, J., Hammer, E., Furll, B., Volker, U., Reil, A. et al. Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a. *Nat Med*, 2010; 16: 45-8.
 24. Silliman, C. C., Curtis, B. R., Kopko, P. M., Khan, S. Y., Kelher, M. R., Schuller, R. M. et al. Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model. *Blood*, 2007; 109: 1752-5.
 25. Simsek, S., van der Schoot, C. E., Daams, M., Huiskes, E., Clay, M., McCullough, J. et al. Molecular characterization of antigenic polymorphisms (Ond(a) and Mart(a)) of the beta 2 family recognized by human leukocyte alloantisera. *Blood*, 1996; 88: 1350-8.
 26. Kline, W. E., Press, C., Clay, M., Keashen-Schnell, M., Hackel, E., McCullough, J. Three sera defining a new granulocyte-monocyte-T-lymphocyte antigen. *Vox Sang*, 1986; 50: 181-6.
 27. Fung, Y. L., Pitcher, L. A., Willett, J. E., Reed, C., Mison, L., Bux, J. et al. Alloimmune neonatal neutropenia linked to anti-HNA-4a. *Transfus Med*, 2003; 13: 49-52.

28. Decary, F., Verheugt, F. W., van Helden-Henningheim, L., von Riesz, E., Schreuder-van Gelder, R., von dem Borne, A. E. et al. Recognition of a non-HLA-ABC antigen present on B and T lymphocytes and monocytes only detectable with the indirect immunofluorescence test. *Vox Sang*, 1979; 36: 150-8.
29. Porcelijn, L., Abbink, F., Terraneo, L., Onderwater-vd Hoogen, L., Huiskes, E., de Haas, M. Neonatal alloimmune neutropenia due to immunoglobulin G antibodies against human neutrophil antigen-5a. *Transfusion*, 2011; 51: 574-7.
30. von dem Borne, A. E., von Riesz, E., Verheugt, F. W., ten Cate, J. W., Koppe, J. G., Engelfriet, C. P. et al. Baka, a new platelet-specific antigen involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang*, 1980; 39: 113-20.
31. Bux, J., Chapman, J. Report on the second international granulocyte serology workshop. *Transfusion*, 1997; 37: 977-83.
32. Metcalfe, P., Waters, A. H. Location of the granulocyte-specific antigen LAN on the Fc-receptor III. *Transfus Med*, 1992; 2: 283-7.
33. Bux, J., Kober, B., Kiefel, V., Mueller-Eckhardt, C. Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. *Transfus Med*, 1993; 3: 157-62.
34. Bux, J., Hartmann, C., Mueller-Eckhardt, C. Alloimmune neonatal neutropenia resulting from immunization to a high-frequency antigen on the granulocyte Fc gamma receptor III. *Transfusion*, 1994; 34: 608-11.
35. Stratton, J., Ballem, P., Gernsheimer, T., Cerqueira, M., Slichter, S. Platelet destruction in autoimmune thrombocytopenic purpura: kinetics and clearance of indium-111-labeled autologous platelets. *J Nucl Med*, 1989; 30: 629-37.
36. Barnard, R. D. Indiscriminate transfusion: a critique of case reports illustrating hypersensitivity reactions. *N Y State J Med*, 1951; 51: 2399-402.
37. Popovsky, M. A., Abel, M. D., Moore, S. B. Transfusion-related acute lung injury associated with passive transfer of antileukocyte antibodies. *Am Rev Respir Dis*, 1983; 128: 185-9.
38. Bux, J. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sang*, 2005; 89: 1-10.
39. Goldman, M., Webert, K. E., Arnold, D. M., Freedman, J., Hannon, J., Blajchman, M. A. et al. Proceedings of a consensus conference: towards an understanding of TRALI. *Transfus Med Rev*, 2005; 19: 2-31.
40. Reil, A., Keller-Stanislawski, B., Gunay, S., Bux, J. Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. *Vox Sang*, 2008; 95: 313-7.
41. Keller-Stanislawski, B., Reil, A., Gunay, S., Funk, M. B. Frequency and severity of transfusion-related acute lung injury--German haemovigilance data (2006-2007). *Vox Sang*, 2010; 98: 70-7.
42. Chapman, C. E., Stainsby, D., Jones, H., Love, E., Massey, E., Win, N. et al. Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma. *Transfusion*, 2009; 49: 440-52.
43. Reesink, H. W., Lee, J., Keller, A., Dennington, P., Pink, J., Holdsworth, R. et al. Measures to prevent transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Vox Sang*, 2012; 103: 231-59.
44. Bux, J., Sachs, U. J. The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br J Haematol*, 2007; 136: 788-99.
45. Silliman, C. C., Ambruso, D. R., Boshkov, L. K. Transfusion-related acute lung injury. *Blood*, 2005; 105: 2266-73.
46. Silliman, C. C., Voelkel, N. F., Allard, J. D., Elzi, D. J., Tudor, R. M., Johnson, J. L. et al. Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *J Clin Invest*, 1998; 101: 1458-67.
47. Silliman, C. C., Paterson, A. J., Dickey, W. O., Stroneck, D. F., Popovsky, M. A., Caldwell, S. A. et al. The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. *Transfusion*, 1997; 37: 719-26.

48. Ferrara, J. L. The febrile platelet transfusion reaction: a cytokine shower. *Transfusion*, 1995; 35: 89-90.
49. Bux, J., Westphal, E., de Sousa, F., Mueller-Eckhardt, G., Mueller-Eckhardt, C. Alloimmune neonatal neutropenia is a potential side effect of immunization with leukocytes in women with recurrent spontaneous abortions. *J Reprod Immunol*, 1992; 22: 299-302.
50. Lalezari, P., Nussbaum, M., Gelman, S., Spaet, T. H. Neonatal neutropenia due to maternal isoimmunization. *Blood*, 1960; 15: 236-43.
51. Bux, J., Mueller-Eckhardt, G., Mueller-Eckhardt, C. Autoimmunization against the neutrophil-specific NA1 antigen is associated with HLA-DR2. *Hum Immunol*, 1991; 30: 18-21.
52. Clay, M., Kline, W., McCullough, J. The frequency of granulocyte-specific antibodies in postpartum sera and a family study of the 6B antigen. *Transfusion*, 1984; 24: 252-5.
53. Curtis, B. R., Reno, C., Aster, R. H. Neonatal alloimmune neutropenia attributed to maternal immunoglobulin G antibodies against the neutrophil alloantigen HNA-1c (SH): a report of five cases. *Transfusion*, 2005; 45: 1308-13.
54. de Haas, M., Kleijer, M., van Zwieten, R., Roos, D., von dem Borne, A. E. Neutrophil Fc gamma RIIIb deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. *Blood*, 1995; 86: 2403-13.
55. Bux, J. Granulocyte Antibody-Mediated Neutropenias and Transfusion Reactions. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 1999; 26: 152-7.
56. Skacel, P. O., Stacey, T. E., Tidmarsh, C. E., Contreras, M. Maternal alloimmunization to HLA, platelet and granulocyte-specific antigens during pregnancy: its influence on cord blood granulocyte and platelet counts. *Br J Haematol*, 1989; 71: 119-23.
57. Lalezari, P., Bernard, G. E. An isologous antigen-antibody reaction with human neutrophils, related to neonatal neutropenia. *J Clin Invest*, 1966; 45: 1741-50.
58. Van, L., Eernisse, J. G., Van, R. A New Leucocyte Group with Two Alleles: Leucocyte Group Five. *Vox Sang*, 1964; 9: 431-46.

Inmunohematología
básica y aplicada

SECCIÓN IV



Inmunohematología
en la práctica y el diagnóstico
de los procesos

Anemia hemolítica autoinmune

EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ*
CARMEN CANALS SURÍS**

Introducción

La anemia hemolítica autoinmune (AHAI) es un tipo de anemia hemolítica adquirida, producida por anticuerpos que reaccionan con los propios hematíes del paciente (autoanticuerpos) conduciendo a su destrucción. Se han reportado incidencias muy variables que oscilan entre 1 en 25.000 y 1 en 80.000 casos/año.¹⁻⁵ Estas diferencias reflejan probablemente el uso de criterios muy variables para su catalogación. Se presenta en individuos de cualquier edad, pero se da con mayor frecuencia en individuos adultos –un 70% de los pacientes afectos son mayores de 40 años– que en niños. La distribución por edad se corresponde con la mayor incidencia de síndromes linfoproliferativos entre los pacientes de más edad y

* Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. emuniz@bst.cat

** Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. ccanals@bst.cat

que a menudo cursan con AHAI asociada a la enfermedad de base.

En función de la **etiología**, la AHAI se clasifica como (Tabla 1):

- Idiopática o primaria, cuando no parece asociada a ninguna otra patología.
- Secundaria o asociada, cuando se presenta como expresión de una disregulación inmune concomitante con otras patologías de carácter infeccioso, autoinmune o neoplásico (neoplasias sólidas y hematológicas).

En función de la **temperatura óptima de reacción del autoanticuerpo**, se clasifica en:

- AHAI por anticuerpos calientes, cuando la temperatura óptima de reacción es cercana a 37 °C.
- AHAI por anticuerpos fríos, cuando los anticuerpos responsables reaccionan a temperaturas bajas, preferentemente a 4 °C.
- AHAI mixtas, cuando están mediadas por ambos tipos de anticuerpos. La AHAI por anticuerpos calientes es la más frecuente, y afecta hasta un 70%-80% de los pacientes diagnosticados de AHAI. Las AHAI por anticuerpos fríos representan alrededor de un 15% de los casos y, finalmente, las formas mixtas son mucho más infrecuentes.

Tabla 1. Clasificación de las anemias hemolíticas autoinmunes

AHAI por anticuerpos calientes (IgG)
Primaria o idiopática Secundaria o asociada <ul style="list-style-type: none"> • Neoplasias: linfoma, carcinoma, quistes dermoides de ovario, sarcoma de Kaposi • Enfermedades autoinmunes: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide • Inmunodeficiencias: virus de inmunodeficiencia humana
AHAI por anticuerpos fríos (IgM)
<i>Síndrome de aglutininas frías</i> Primario (idiopático) Secundario o asociado <ul style="list-style-type: none"> • Síndromes linfoproliferativos: leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B, macroglobulinemia de Waldenström • Infecciones: mononucleosis infecciosa, <i>Mycoplasma pneumoniae</i>, y menos frecuentemente otros virus (adenovirus, citomegalovirus, virus influenza, varicela zóster) o bacterias (<i>Listeria monocitogenes</i>, <i>Treponema pallidum</i>) <i>Hemoglobinuria paroxística a frigore</i> Primaria o Idiopática Secundaria o asociada <ul style="list-style-type: none"> • Infecciones víricas de vías respiratorias altas, sarampión, parotiditis, varicela, y menos habitualmente el virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, adenovirus, influenza A, o bacterianas por <i>Haemophilus influenza</i> y <i>Escherichia coli</i>. • Sífilis (raro)
AHAI Mixta (IgG e IgM)

AHAI por anticuerpos calientes

Etiopatogenia

La AHAI por anticuerpos calientes está mediada por autoanticuerpos que reaccionan de forma óptima a 37 °C. La mayoría de los anticuerpos son de clase IgG1 o IgG3. Raramente están implicados anticuerpos de clase IgM o IgA capaces de reaccionar a 37 °C, solos o acompañando a los de clase IgG. El estímulo que desencadena la formación de autoanticuerpos se desconoce, pero la infección, los procesos inflamatorios y los fármacos pueden alterar los mecanismos de regulación inmune que en condiciones normales impiden la formación de anticuerpos contra los propios antígenos. Por otra parte, algunos patógenos pueden estimular la formación de anticuerpos con reacción cruzada con determinados antígenos eritrocitarios, o bien los complejos inmunes que resultan pueden fijarse secundariamente a los hematíes. Aunque las neoplasias de células B se asocian a menudo con AHAI, la clona maligna no suele ser la fuente de producción de autoanticuerpos, ya que estos habitualmente son policlonales, lo que expresa una disregulación inmune de carácter más global. Se supone que otros factores no conocidos de naturaleza genética y/o ambiental también pueden desempeñar algún papel en la formación de autoanticuerpos.¹⁻³

En general, los anticuerpos implicados producen una hemólisis de tipo extravascular en el sistema retículo-endotelial. Los hematíes recubiertos de anticuerpos IgG son eliminados de la circulación mediante la unión de la

porción Fc del anticuerpo (ac) y el receptor para el fragmento Fc de las células fagocíticas y citotóxicas del bazo y, en menor proporción, del hígado. Las inmunoglobulinas IgG1 e IgG3 pueden activar el complemento, pero las proteínas reguladoras como CD55 (DAF) y CD59 (MIRL) impiden la activación completa en cascada, excepto en el caso de anticuerpos IgM o IgG muy potentes, tal como sucede con las isohemaglutininas del sistema ABO. Por esta razón, la activación del complemento se detiene en el fragmento C3b que puede ser degradado al fragmento iC3b y, finalmente, C3dg. Los macrófagos poseen receptores para los fragmentos C3b (CR1/CD35) e iC3b (CD11/CD18), pero no para C3dg. La presencia simultánea de IgG junto a los fragmentos C3b o iC3b aumenta la fagocitosis de las células sensibilizadas y acelera la destrucción de los hematíes en el bazo. Los hematíes que portan exclusivamente C3b se eliminan de la circulación fundamentalmente por la acción de los macrófagos del hígado (células de Kupffer). Por el contrario, los hematíes portadores de C3dg no son reconocidos de forma eficiente por los macrófagos y son resistentes al mecanismo de hemólisis extravascular.

Los macrófagos esplénicos y hepáticos destruyen las células diana por fagocitosis, fragmentación o citotoxicidad directa. La fagocitosis consiste en la digestión completa de las células recubiertas de IgG y/o C3b. La fragmentación elimina progresivamente diferentes porciones de los hematíes convirtiéndolos en esferocitos o esquistocitos. La citotoxicidad directa se produce por la acción de enzimas

lisosómicas con capacidad hemolítica. Los esferocitos son más rígidos que los hematíes normales lo que los hace particularmente susceptibles a la lisis osmótica extravascular en los sinusoides esplénicos. En casos excepcionales, los anticuerpos calientes son capaces de producir la activación completa del complemento y de inducir una hemólisis intravascular.

Datos epidemiológicos

La AHAI *idiopática o primaria* se presenta en adultos en más de la mitad de los casos y, generalmente, después de la cuarta o quinta décadas de la vida. También se observa un ligero predominio del sexo femenino. En la AHAI *secundaria o asociada*, su distribución por edad y sexo es un reflejo de la distribución propia de los procesos con los que se asocia; por ejemplo, en mujeres suele darse entre las afectas de procesos autoinmunes (Lupus), y en los hombres es más característica entre los afectos de síndromes linfoproliferativos. Un 40% de adultos con AHAI suele presentar asociado un síndrome linfoproliferativo o una enfermedad autoinmune. La probabilidad de encontrar una enfermedad asociada está en función de lo extenso que sea el estudio efectuado en el paciente, del estadio en que se encuentre la enfermedad de base y del tiempo de seguimiento transcurrido desde el diagnóstico. Por ello, algunos casos inicialmente catalogados como idiopáticos pueden acabar relacionándose con procesos autoinmunes crónicos en el curso del seguimiento. En los niños, por el contrario, sólo en raras ocasiones se descubre una enfermedad crónica, y la mayoría de casos diagnosticados en edad pediátrica suelen ser idio-

páticos y de carácter transitorio. El pico de mayor incidencia se da antes de los 5 años y afecta por igual a ambos sexos. La probabilidad de encontrar un proceso autoinmune acompañante aumenta a partir de la adolescencia.

Los síndromes linfoproliferativos que se asocian con mayor frecuencia a AHAI caliente son la leucosis linfática crónica (LLC) y los linfomas de células B. Aproximadamente un 30% de adultos con AHAI secundaria sufren de LLC y, al contrario, entre un 4% y un 40% de pacientes con LLC desarrollan una AHAI caliente en el curso de la enfermedad. En algunos casos la AHAI puede constituir la única manifestación de un lupus eritematoso sistémico (LES) e incluso preceder en años al diagnóstico clínico. Cerca de un 8% de pacientes con AHAI caliente sufren de LES; en cambio, un 10% de los pacientes afectos de LES terminarán desarrollando una AHAI caliente. El impacto sobre el pronóstico de la AHAI caliente en los pacientes afectos de LLC o de LES es muy controvertido pero, en general, los estudios multivariantes apuntan a que no constituyen variables independientes en relación con la supervivencia a largo plazo. La presencia simultánea de anticuerpos de clase IgG e IgM supone un peor pronóstico para los pacientes con LLC. Otros procesos con los que es factible asociarse la AHAI caliente son las neoplasias de ovario, la artritis reumatoide, la colitis ulcerosa, la esclerodermia, las disfunciones tímicas y la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En los niños, a veces se detecta el antecedente de una infección aguda precediendo a la aparición de la AHAI, aunque la relación causal entre el agente infeccioso vírico

y el desarrollo de la AHAI no es clara y puede obedecer a una mera coincidencia. Lo mismo sucede en relación con la vacunación como agente desencadenante de un posible episodio de AHAI.

Datos clínicos

En algunos pacientes la presentación es insidiosa, con una aparición gradual de los síntomas propios de anemia, con frecuencia asociados a fiebre e ictericia. En otros pacientes, el inicio es brusco, con dolor lumbar y síntomas de anemización rápida. La presentación de orinas oscuras, por hemoglobinuria o pigmentos biliares en orina, es frecuente. En la AHAI idiopática un 50%-60% de casos presentan esplenomegalia, un 30% hepatomegalia y un 25% adenopatías.

Datos de laboratorio

La anemia suele ser importante, con frecuencia con cifras de Hb <7 g/dl al diagnóstico, que progresa hasta que el tratamiento empieza a ser efectivo. En general, los recuentos de leucocitos y plaquetas son normales, y en algunos casos existe una desviación a la izquierda en la fórmula leucocitaria. En los casos más típicos existe una reticulocitosis, y en la extensión de sangre periférica se observan esferocitosis y policromatofilia. Aunque no es necesario para el diagnóstico, si se realiza un estudio medular, suele observarse una hiperplasia eritroide. Los parámetros bioquímicos de hemólisis son constantes: aumento de la bilirrubina indirecta, disminución o ausencia de haptoglobina y aumento de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

En un pequeño porcentaje de casos, los pacientes pueden presentar una

trombopenia autoinmune, concomitante con la AHAI o a lo largo de la evolución y, en este caso, la asociación resultante se conoce como síndrome de Evans.

Datos inmunohematológicos

De forma característica, estos pacientes presentan una prueba de Coombs directo (CD) positiva (Figura 1). En más de un 90% de los casos el estudio es positivo por IgG aislada o en combinación con C3. En el 10% restante suele encontrarse, exclusivamente, C3. En un 1% y un 4% de casos el CD es negativo. Si el CD es positivo por IgG, los autoanticuerpos pueden ser eluidos de la membrana y examinar su reactividad frente a otros hematíes con una prueba indirecta de la antiglobulina o Coombs indirecto (CI). Generalmente el eluido se comporta como una panaglutinina, pero en algunos casos muestra una cierta especificidad relativa, a menudo frente a determinados antígenos del sistema Rh como sucede con el antígeno Rhe (autoanti-e). En la AHAI por anticuerpos calientes suele también encontrarse autoanticuerpo libre en el suero del paciente, que reacciona frente a todos los hematíes normales, dando un resultado positivo en el escrutinio y en la identificación de anticuerpos irregulares, así como en las pruebas cruzadas pretransfusionales.

En un pequeño porcentaje de casos (1%-4%) de AHAI caliente, el CD puede resultar negativo. Cuando la sospecha clínica es firme, es útil realizar el estudio del eluido que en ocasiones resultará positivo, investigar si la inmunoglobulina (Ig) implicada es de tipo IgA y/o IgM, y emplear técnicas o estrategias más sensibles.

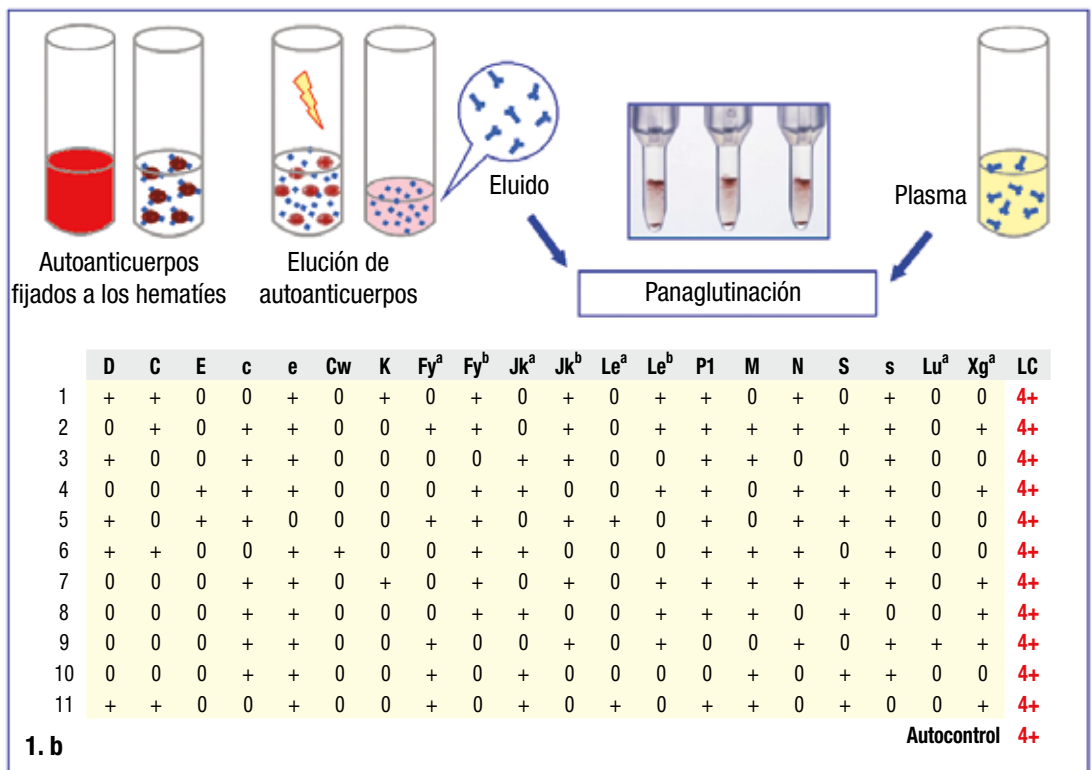
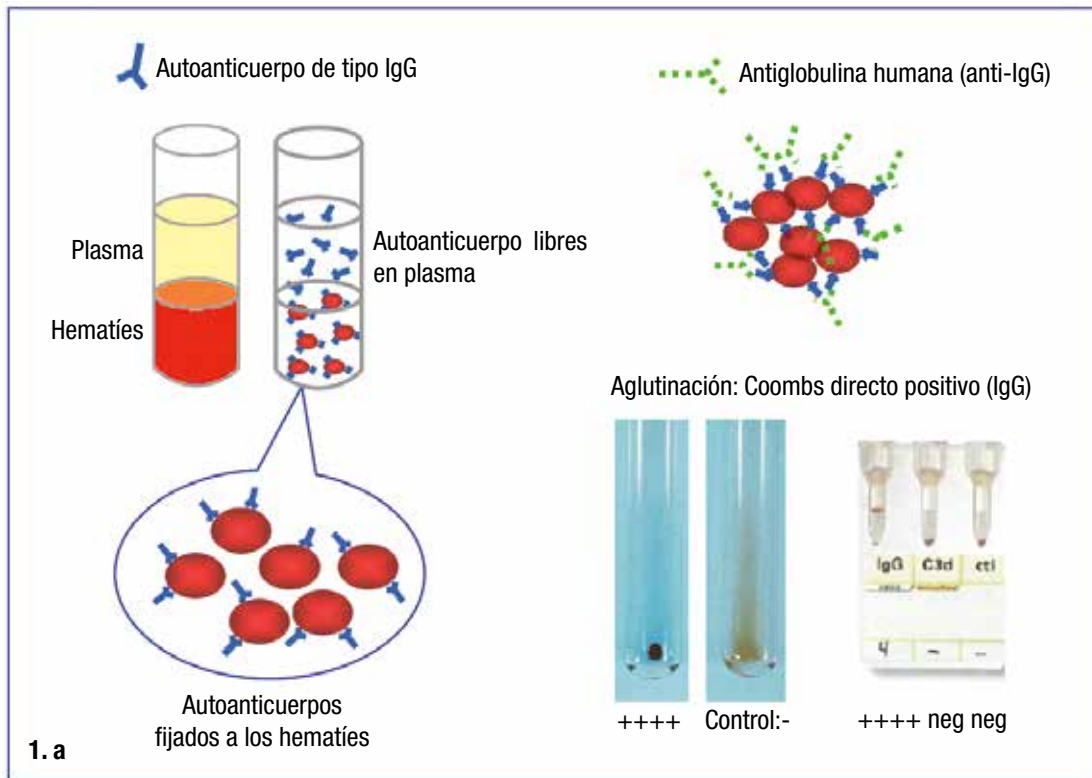


Figura 1. Hallazgos inmunohematológicos en la AHAI por anticuerpos calientes. En más del 90% de los casos el test de Coombs directo es positivo por IgG (1a). Habitualmente, el eluido se comporta como una panaglutinina (1b). Es frecuente que se encuentren autoanticuerpos libres en plasma

Pronóstico y tratamiento

La evolución para un paciente con AHAI es impredecible. En las AHAI secundarias, el pronóstico se relaciona con la respuesta al tratamiento de la enfermedad de base. Una minoría de pacientes alcanza una remisión completa, mientras que en otros casos el curso es crónico, y evoluciona a brotes. El tratamiento de primera línea en pacientes con signos clínicos de hemólisis consiste en esteroides por vía oral. En un 70%-80% de los casos se observa una buena respuesta; sin embargo, la mayoría de pacientes requerirá un tratamiento de mantenimiento. Cuando el tratamiento resulta ineficaz, como tratamiento de segunda línea se plantea generalmente la esplenectomía. Otros tratamientos a considerar son fármacos citotóxicos o inmunosupresores, como ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina A o micofenolato-mofetil. No obstante, estos tratamientos pueden conllevar efectos secundarios importantes. La utilidad de otras estrategias terapéuticas, como altas dosis de Igs ev, plasmaféresis o danazol es más controvertida. Recientemente se han publicado diversas experiencias sobre el uso de Rituximab® en AHAI, tanto en pacientes adultos como en pediátricos, especialmente en aquellos refractarios a esteroides o a otras terapias inmunosupresoras. Rituximab® es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 que produce una rápida depleción de células B que ha tenido un rol importante en el tratamiento de algunos linfomas. En casos de AHAI, el tratamiento ha sido bien tolerado, con pocos efectos adversos y buenas respuestas en un porcentaje considerable de casos. Es probable que

en el futuro se plantee el uso de Rituximab® como tratamiento de segunda línea, antes que otros tratamientos inmunosupresores, e incluso como paso previo a la esplenectomía.

Una de las complicaciones más graves descritas en los pacientes con AHAI es el tromboembolismo. El riesgo es mayor cuando la AHAI se asocia a la presencia de anticoagulante lúpico o anticuerpos anticardiolipina, pero se ha descrito también un riesgo aumentado de trombosis en casos de AHAI primaria. En los casos de mayor riesgo de trombosis debe considerarse la conveniencia de ofrecer un tratamiento profiláctico. Por otra parte, algunos estudios han demostrado que los pacientes diagnosticados de AHAI presentan un riesgo superior de desarrollar diferentes síndromes linfoproliferativos (LLC, linfomas no Hodgkin B o T), así como neoplasias mieloides.

AHAI por anticuerpos fríos

Hablamos de AHAI por anticuerpos fríos en aquellos casos de AHAI en los que los autoanticuerpos son reactivos a temperaturas bajas y preferentemente a 4 °C.^{2,6} En este grupo, según las características de los ac, podemos diferenciar las dos situaciones que se exponen a continuación:

AHAI mediada por aglutininas frías (Síndrome por aglutininas frías)

El síndrome por aglutininas frías (CAS *Cold agglutinin Syndrome*) supone cerca de un 15% de todas las AHAI diagnosticadas. Ocurre con mayor frecuen-

cia a partir de la quinta década de la vida y alcanza su pico máximo hacia los 70 años de edad, siendo muy excepcional en niños. La prevalencia es ligeramente superior en pacientes de sexo femenino. Las formas secundarias representan un 40% del total de casos, y suelen asociarse a síndromes linfoproliferativos B, especialmente linfomas y macroglobulinemia de Waldstrom, o a infecciones como las producidas por *Mycoplasma pneumoniae* o el virus de Epstein-Barr (mononucleosis infecciosa). La mayoría de casos pediátricos tiene un carácter transitorio y acontece en niños mayores o en adolescentes con infección. Está mediado generalmente por autoanticuerpos de tipo IgM.

Datos clínicos

Los síntomas varían mucho de un paciente a otro, dependiendo del rango térmico del anticuerpo, siendo más frecuentes los propios de una anemia crónica. Algunos pacientes pueden experimentar hemoglobinuria, particularmente cuando el clima es frío, y se quejan de acrocianosis cuando se exponen a bajas temperaturas. La exploración física suele revelar palidez e ictericia y, en una minoría de pacientes, puede evidenciarse hepatoesplenomegalia leve o moderada. La mayor parte de la hemólisis, en este caso, ocurre a nivel hepático.

Datos de laboratorio

En los casos más típicos, el grado de anemia depende del grado de exposición al frío. En general suele encontrarse una anemia leve o moderada, de forma crónica. Con frecuencia, las

muestras de sangre presentan autoaglutinación a temperatura ambiente, lo que dificulta la realización de la extensión de sangre y de los recuentos celulares. La autoaglutinación se intensifica a 4 °C y revierte al calentar la muestra a 37 °C. La morfología de los hematíes no suele estar tan alterada como en la AHAI por ac calientes, y existe reticulocitosis y policromatofilia. Si se realiza un estudio medular, se observa una hiperplasia eritroide y un cierto grado de proliferación linfoide.

Datos inmunohematológicos

La autoaglutinación de la muestra, cuando ocurre hace sospechar el diagnóstico de síndrome por aglutininas frías o crioaglutininas. Es necesario mantener la muestra de EDTA a 37 °C y lavar los hematíes con solución salina precalentada a 37 °C para dispersar las crioaglutininas antes de realizar la tipificación ABO y Rh, y el test de CD. El diagnóstico debe ser considerado en aquellos pacientes con una prueba (un test) de CD positiva por anti-C3 y negativo por anti-IgG. En la mayoría de pacientes con síndrome por aglutininas frías los anticuerpos son de tipo IgM, que inducen a la fijación de complemento sobre los hematíes. Los autoanticuerpos libres en el suero del paciente causan la aglutinación de los hematíes normales fundamentalmente a bajas temperaturas, con un título elevado a 4 °C, y reaccionando con una intensidad mucho menor a temperaturas de 30 °C. Es frecuente que el anticuerpo tenga una especificidad frente al sistema Ii. En los casos asociados a in-

fecciones por *Mycoplasma pneumoniae*, la especificidad suele ser anti-I, mientras que en la mononucleosis infecciosa, suele ser anti-i.

Pronóstico y tratamiento

El pronóstico en pacientes con síndrome por aglutininas frías es significativamente mejor que en los casos de AHAI por Ac calientes. En los casos secundarios a procesos infecciosos es frecuente tener una presentación clínica más aguda y se resuelven espontáneamente en el curso de varias semanas. En los casos idiopáticos es común que el curso sea crónico y bien tolerado. Debe aconsejarse a los pacientes que eviten la exposición al frío. Algunos pacientes pueden requerir tratamiento inmunosupresor. Recientemente ha sido ensayado también el tratamiento con Rituximab, con respuestas transitorias. La esplenectomía no se considera indicada en estos pacientes, ya que la hemólisis no se produce mayoritariamente a nivel esplénico, por lo que resulta ineficaz en muchos casos.

Aunque no existe el hábito de examinar la presencia de aglutininas frías en todos los pacientes que van a ser sometidos a *bypass* cardiopulmonar, es importante tomar ciertas precauciones en los pacientes que presentan antecedentes de síndrome por aglutininas frías, incluyendo un estudio de amplitud térmica. Esta información va a ser de utilidad para el equipo quirúrgico y ayuda a implementar estrategias que protejan al paciente de una complicación hemolítica en el curso de la intervención.

Hemoglobinuria paroxística *a frigore* (HPF)

La hemoglobinuria paroxística *a frigore* (PCH - *Paroxysmal cold hemoglobinuria*) es un trastorno muy infrecuente, que supone menos del 1% de casos de AHAI.^{2,7} Antiguamente se observaba después de la exposición al frío en pacientes con sífilis terciaria. En la actualidad es más habitual hallarla en niños que han sufrido una infección vírica o bacteriana entre una y dos semanas antes de iniciarse el cuadro clínico. Los pacientes generalmente presentan un episodio agudo de hemólisis transitorio, y muchas veces no relacionado con exposición al frío.

La hemólisis es de inicio agudo, y provoca una anemia rápidamente progresiva. El paciente puede presentar escalofríos, fiebre, dolor abdominal y lumbar, náuseas y malestar general. Con frecuencia existe hemoglobinemia y hemoglobinuria y anomalías en la morfología de serie roja características de hemólisis (esferocitosis, poiquilocitosis, reticulocitosis, etc). La eritrofagocitosis es relativamente frecuente en este síndrome y, por el contrario, muy rara en otros tipos de AHAI.

Los autoanticuerpos son de tipo IgG, pero reaccionan con los hematíes en las zonas más frías del organismo (partes acras de las extremidades) provocando la fijación irreversible del C3, dissociándose a temperaturas más elevadas. Un test de CD estándar resulta positivo únicamente por C3, y el eluido es negativo. En el suero de estos pacientes se puede demostrar la existencia de una hemolisina bifásica, mediante la prueba diagnóstica de Donath-Landsteiner.

Los autoanticuerpos se fijan a hematíes normales a bajas temperaturas (4 °C) y conducen a hemólisis cuando los hematíes son calentados a 37 °C en presencia de complemento (Figura 2). El autoanticuerpo suele tener especificidad anti-P, reaccionando con todos los hematíes normales excepto con aquellos de fenotipo excepcional p o P^k. Aunque el anticuerpo raramente alcanza un título superior a 64 es extraordinariamente potente y capaz de provocar la aparición súbita de una anemia grave por hemólisis

intravascular, dada su habilidad para iniciar ciclos repetidos de activación del complemento.

La enfermedad se autolimita de forma espontánea en el curso de pocas semanas y en general no recidiva. El tratamiento es fundamentalmente de soporte; los esteroides y la esplenectomía no son efectivos. Si la hemólisis es muy grave hay que mantener al paciente muy bien hidratado para conservar la perfusión y la función renal, y en algunos casos la transfusión puede ser necesaria.

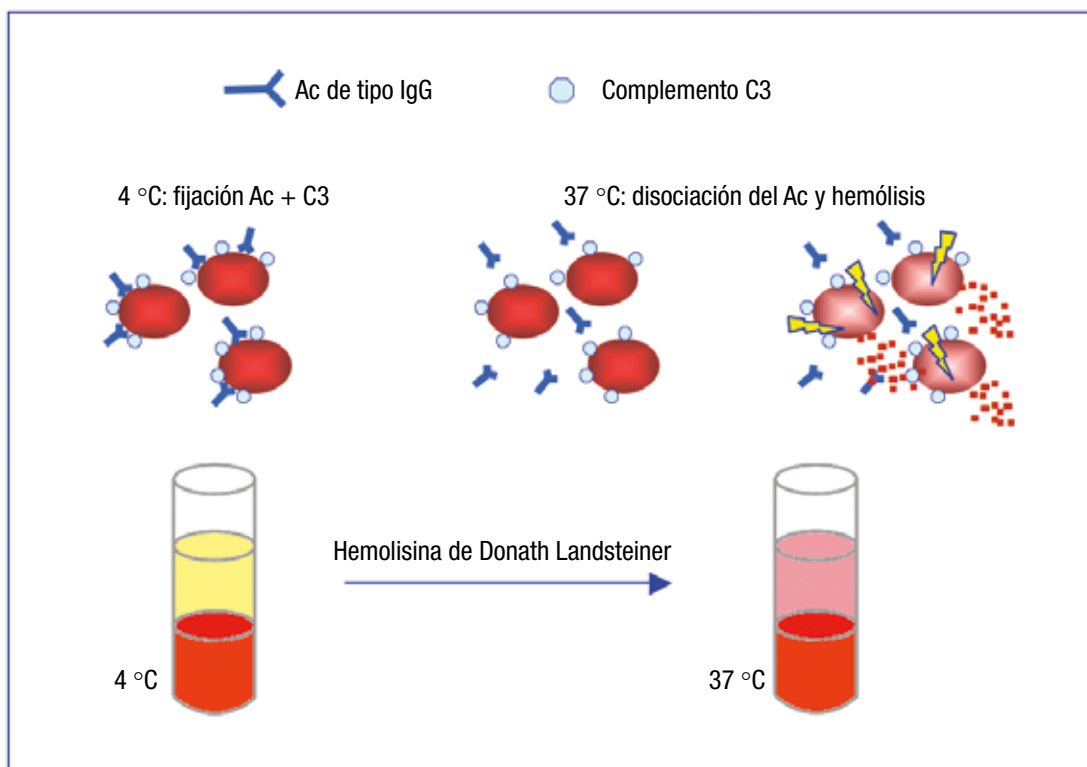


Figura 2. Hemolisina de Donath-Landsteiner: autoanticuerpos de tipo IgG que se fijan a los hematíes a bajas temperaturas (4 °C), provocando la fijación irreversible del C3, e inducen su hemólisis a 37 °C

Anemia hemolítica mixta

Se reserva este título para los casos en que ambos tipos de anticuerpos (IgG e IgM) coexisten en la etiopatogenia de la anemia.^{1,2,8} Representa aproximadamente un 10% de los casos de AHAI.

Entre el 25% y el 42% de los pacientes afectos sufren de Lupus eritematoso. Los síntomas y signos clínicos propios de la AHAI por anticuerpos calientes suelen predominar, aunque en algunos pacientes se hacen evidentes las carac-

terísticas propias de los dos tipos de AHAI. El inicio de la hemólisis puede ser brusco y la anemia muy intensa. En general, el tratamiento con esteroides resulta efectivo, pero el curso de la enfermedad normalmente es de carácter crónico con exacerbaciones intermitentes.

A diferencia del síndrome por aglutininas frías, es común que los anticuerpos IgM presenten un título \leq a 64 a 4°C, pero la amplitud se extiende hasta los 37 °C. El CD es positivo por IgG y C3, y el eluido contiene el autoanticuerpo IgG esperado.

Pruebas de compatibilidad transfusional y estrategia en el paciente con AHAI (Figura 3)

AHAI por anticuerpos calientes

El paciente afecto de AHAI “caliente” no debe, salvo en circunstancias excepcionales, ser transfundido. Las razones son varias: por una parte, el tratamiento de elección son los esteroides, que a dosis de 1-2 mg/kg/día resultan efectivos en la mayoría de pacientes, y por otra, cabe la posibilidad en los pacientes con antecedentes transfusionales u obstétricos de que tras el autoanticuerpo se oculte un aloanticuerpo que ocasione una grave reacción transfusional. A menudo se especula respecto a la supervivencia de los hematíes transfundidos, pero lo cierto es que ésta no debe ser menor que la correspondiente a los propios hematíes del paciente, por lo que no constituye una razón de peso para obviar la transfusión. Algunos autores comentan que los pacientes

transfundidos precozmente después del diagnóstico suelen tener un curso menos favorable y un peor pronóstico que aquellos tratados exclusivamente con esteroides.⁹ Al parecer, este nuevo estímulo antigénico podría favorecer un incremento de la producción de autoanticuerpo, una respuesta más irregular al tratamiento inmunosupresor y unas remisiones menos prolongadas. No obstante, existen situaciones en las que el estado clínico del paciente justifica la transfusión. En general, cuando el síndrome anémico no es bien tolerado, o aparecen signos de insuficiencia cardíaca o signos neurológicos de isquemia cerebral, debe indicarse la transfusión de hematíes con la mínima demora posible.

Para proporcionar una transfusión segura y eficaz al paciente afecto de AHAI que inevitablemente ha de ser transfundido, deben tomarse precauciones tanto en el ámbito del laboratorio como de la clínica.^{3,10-13} Las pruebas de compatibilidad exigen una serie de técnicas adicionales que tienen como objetivo primordial descartar la presencia de un aloanticuerpo oculto por el autoanticuerpo. Una vez preparadas las unidades se debe transfundir sólo la cantidad necesaria para mejorar la situación clínica del paciente, y siempre de forma lenta y bajo una estricta supervisión.

Información clínica

Es importante disponer de toda la información posible acerca de los antecedentes del paciente y a su estado clínico. Interesa saber si ha sido transfundido previamente, número de ges-

taciones, antecedentes patológicos, fármacos, etc. Por otra parte, el estado del paciente nos orientará en torno al tiempo que disponemos para preparar las unidades de hematíes más óptimas. Es importante que la comunicación en-

tre el laboratorio y el equipo clínico sea lo más fluida posible, y que este último entienda la complejidad y las dificultades técnicas que plantean las pruebas pretransfusionales del paciente.

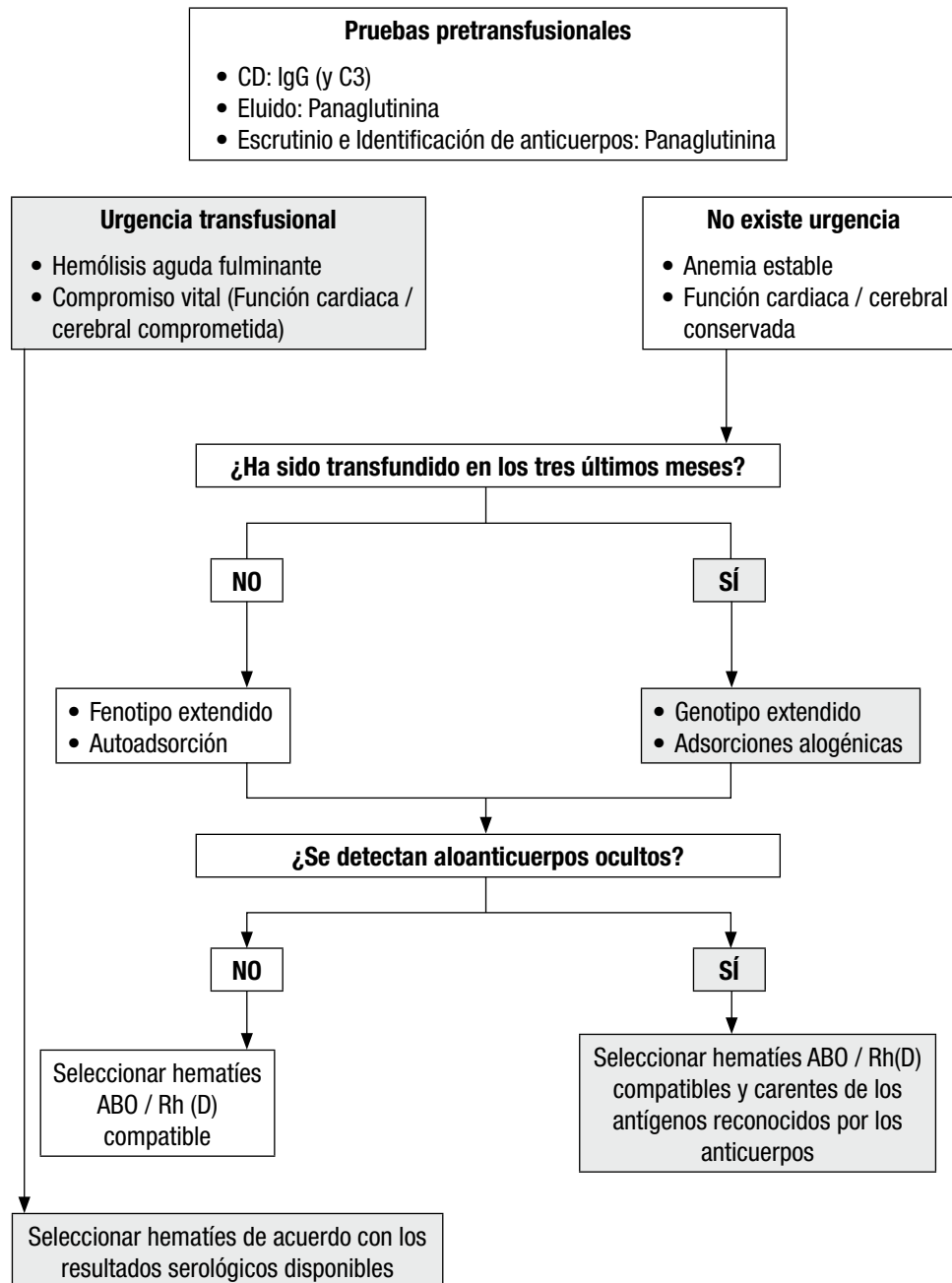


Figura 3. Esquema de trabajo para la transfusión de pacientes con AHAI por anticuerpos calientes (IgG)

Determinación del grupo ABO y Rh

La tipificación del grupo ABO no suele resultar problemática.

Para la determinación del grupo hemático, además de los sueros anti-A, anti-B (también anti-AB y anti-A₁, opcionalmente), debe emplearse un control negativo (albúmina bovina al 5% o, si se dispone de ello, la solución en la que va suspendido el anticuerpo monoclonal empleado).

Para el grupo sérico, además de los hematíes A₁ y B (también hematíes A₂, AB y O, opcionalmente), deben emplearse los hematíes del propio paciente en suspensión salina al 3%-5%.

Respecto al sistema Rh es importante realizar una tipificación extensiva, siempre que no existan transfusiones en los últimos tres meses, incluyendo los antígenos D, C, c, E, y e. Los reactivos monoclonales actualmente utilizados no suelen producir falsos resultados positivos, pero es recomendable un control de albúmina al 5%, o bien el diluyente en el que están suspendidos los anticuerpos.

Estudio completo de la prueba directa de la antiglobulina (Coombs directo)

El diagnóstico de AHAI se establece por la concurrencia de anemia, signos biológicos de hemólisis y CD positivo. Una vez obtenido el resultado positivo con la antiglobulina polivalente habrá que caracterizar la Ig implicada con la ayuda de las antiglobulinas monovalentes, habitualmente anti-IgG y anti-C3b,d. En caso de que fuera necesario, cabe el empleo de otras antiglobulinas monovalentes, anti-IgM o anti-IgA.

Aunque los autoanticuerpos calientes de clase IgG suelen detectarse aislados, estudios recientes, realizados con técnicas muy sensibles, demuestran que hasta en un 37% de casos también pueden estar presentes inmunoglobulinas de clase IgM o IgA, o ambas. No obstante, el perfil más común esperado en una AHAI “caliente” será el de anti-IgG positivo sola o acompañada de C3b,d. Una buena antiglobulina IgG debe ser capaz de detectar niveles entre 100 y 150 moléculas de IgG por hematíe.

En algunos pacientes que presentan las características clínicas y biológicas propias de la AHAI “caliente”, el CD puede resultar negativo. En estos casos, el empleo de técnicas más sensibles puede ser útil para demostrar la presencia de autoanticuerpo fijado a los hematíes del paciente. En algunas ocasiones, la baja afinidad del autoanticuerpo puede explicar la negatividad de la prueba y, en otras, la ausencia de antiglobulina IgM e IgA en el antisuero polivalente también puede justificar el resultado. Las alternativas para poner de manifiesto el autoanticuerpo incluyen cambios en las condiciones de reacción antígeno-anticuerpo del CD estándar, el uso de otras antiglobulinas o de técnicas más sensibles basadas en el principio de la antiglobulina.¹³

Estudio del eluido

La realización de un eluido, y el estudio posterior del mismo, nos permite confirmar la naturaleza autoinmune de las inmunoglobulinas IgG fijadas a la membrana del hematíe.¹⁴

Cuando el eluido contiene exclusivamente un autoanticuerpo, éste es reactivo con todas las células del panel, y en ocasiones muestra una especificidad relativa.

Un CD positivo, pero que cursa con un eluido no reactivo, puede sugerir la intervención de un fármaco. También es compatible con la presencia de inmunocomplejos, de paraproteína o de una proporción superior a la habitual de inmunoglobulinas que de forma inespecífica se han fijado a los hematíes del paciente.

La presencia de un aloanticuerpo en el eluido es sugestiva de una reacción transfusional retardada, de una enfermedad hemolítica del recién nacido o, más raramente, de un autoanticuerpo *mimicking* o de un fenómeno de Matuhasi-Ogata.

Existen múltiples métodos de elución, y cada uno de ellos posee ventajas e inconvenientes, si bien en los últimos años se han impuesto los reactivos comerciales de elución a pH ácido.

Autoanticuerpos con especificidad Rh o especificidad relativa

En ocasiones, algunos autoanticuerpos reaccionan con todos los hematíes del panel, pero muestran una reactividad superior (aglutinación de intensidad superior o título superior) frente a hematíes de un determinado fenotipo Rh, y más concretamente frente al antígeno e.

La actitud a adoptar en caso de que el paciente deba ser transfundido es controvertida. Algunos expertos abogan por no emplear aquellos hematíes que contengan el antígeno e, excepto en los casos en que respetar esta re-

gla implique transfundir sangre Rh(D) positivo a un individuo Rh(D) negativo, especialmente si se trata de una mujer en edad fértil. Igualmente, si un paciente posee un autoanti-e más un aloanticuerpo (anti-E), debe respetarse esta incompatibilidad prioritariamente y prescindir de la especificidad relativa del autoanticuerpo.

Otros expertos, por el contrario, recomiendan ignorar las especificidades relativas apoyándose en las siguientes consideraciones. Primero, los estudios de supervivencia de los hematíes compatibles frente a los incompatibles no son concluyentes, y en muchos de ellos el beneficio de respetar la especificidad relativa es mínimo. Y, en segundo lugar, contemplar la especificidad relativa implica utilizar hematíes en los que pueden estar presentes antígenos ausentes del fenotipo del paciente, con el consiguiente riesgo de inmunización.

Estudio del suero

En más de un 50% de los pacientes con AHAI por IgG, el autoanticuerpo se encuentra libre en el suero, lo que determina que tanto el escrutinio como la identificación de anticuerpos irregulares resulten positivos, al igual que las pruebas cruzadas. En esta situación, si el paciente tiene antecedentes transfusionales y/o de gestación, no es posible asegurar que la reactividad observada se deba únicamente a la presencia de un autoanticuerpo. El objetivo fundamental al abordar el estudio del suero es el de detectar la presencia de aloanticuerpos que pudieran quedar ocul-

tos por el autoanticuerpo libre. De acuerdo con las series publicadas, entre un 12% y un 40% de pacientes presentan aloanticuerpos ocultos por el autoanticuerpo, de manera que la práctica de una transfusión segura pasa por la búsqueda de estas especificidades ocultas clínicamente significativas.¹⁵⁻¹⁸

Las técnicas de elección para investigar la presencia de aloanticuerpos ocultos por el autoanticuerpo son las de adsorción: autoadsorción y adsorción alogénica o diferencial. No obstante, existen otras estrategias que resultan orientativas, pero nunca sustitutivas de los dos procedimientos de elección:

- Comparar la intensidad de la aglutinación del CD con la del CI. Si no existe aloanticuerpo, la intensidad de la aglutinación en el CD será superior a la del CI, ya que la mayoría del autoanticuerpo suele estar fijado a los hematíes. Por el contrario, en presencia de un aloanticuerpo, la aglutinación en el CD será superior a la del CI. Sin embargo, resulta peligroso ignorar en el primer caso la posibilidad de que además del autoanticuerpo exista un aloanticuerpo de título menor.
- Aglutinaciones de diferente intensidad con el panel de hematíes. Esta condición sólo se cumple cuando el aloanticuerpo acompañante posee un título notablemente superior al del autoanticuerpo. En este caso, la realización de diluciones seriadas del suero del paciente ayuda a clarificar la especificidad del aloanticuerpo.

Autoadsorción

En la actualidad, la mejor técnica disponible para detectar un aloanticuerpo en presencia de un autoanticuerpo es la autoadsorción del suero del paciente a 37 °C frente a sus propios hematíes, después de haber realizado la elución de al menos una fracción del autoanticuerpo. Tras las adsorciones, el suero es nuevamente enfrentado al panel de hematíes, de manera que una vez eliminada la interferencia creada por el autoanticuerpo, podremos determinar de forma clara la presencia de un aloanticuerpo y su especificidad.

La mayoría de autoanticuerpos posee un título inferior a 16 en el CI, de forma que 2-3 autoadsorciones resultan suficientes en la mayoría de casos. Si el título es superior, los hematíes se tratan con enzimas para incrementar la cantidad de autoanticuerpo adsorbido. Por el contrario, si el CD es muy débil se realiza la autoadsorción sin elución previa de los hematíes.

El principal inconveniente técnico de este método es la hemólisis que, en ocasiones, implica la elución de los hematíes del paciente e impide la reutilización de los mismos.

La técnica de autoadsorción es tan útil que merece la pena conservar hematíes del paciente obtenidos con ocasión de la primera transfusión, para realizar autoadsorciones en el caso de que en el futuro éste requiera más sangre. Los hematíes se conservan en ACD, CPD o congelados, si se dispone de los medios para efectuarlo.

El fenómeno de Matuhasi-Ogata teóricamente limita la utilidad de esta técnica, al igual que la de adsorción diferencial. Matuhasi y Ogata sugirieron

ron que algunos anticuerpos de una determinada especificidad pueden adherirse a complejos antígeno-anticuerpo de una especificidad distinta. Y así, potencialmente es factible que el aloanticuerpo se adhiera al complejo constituido por el autoanticuerpo y los hematíes del paciente empleados para la autoadsorción. No obstante, la experiencia acumulada indica que este fenómeno, en caso de producirse, no conlleva la total desaparición del aloanticuerpo que todavía permanece a título suficiente como para detectarlo.

Adsorción diferencial

Esta técnica constituye la alternativa ideal a la autoadsorción cuando el paciente ha sido transfundido recientemente. Consiste en la adsorción del autoanticuerpo empleando hematíes alogénicos de diferente fenotipo. Por ejemplo, la adsorción de un suero que contenga un autoanticuerpo más un aloanticuerpo de especificidad anti-Jk^a con unos hematíes de fenotipo Jk(a-), resultará en la adsorción del autoanticuerpo y no en la del aloanticuerpo que podrá ser fácilmente detectado con el panel de hematíes (Figura 4).

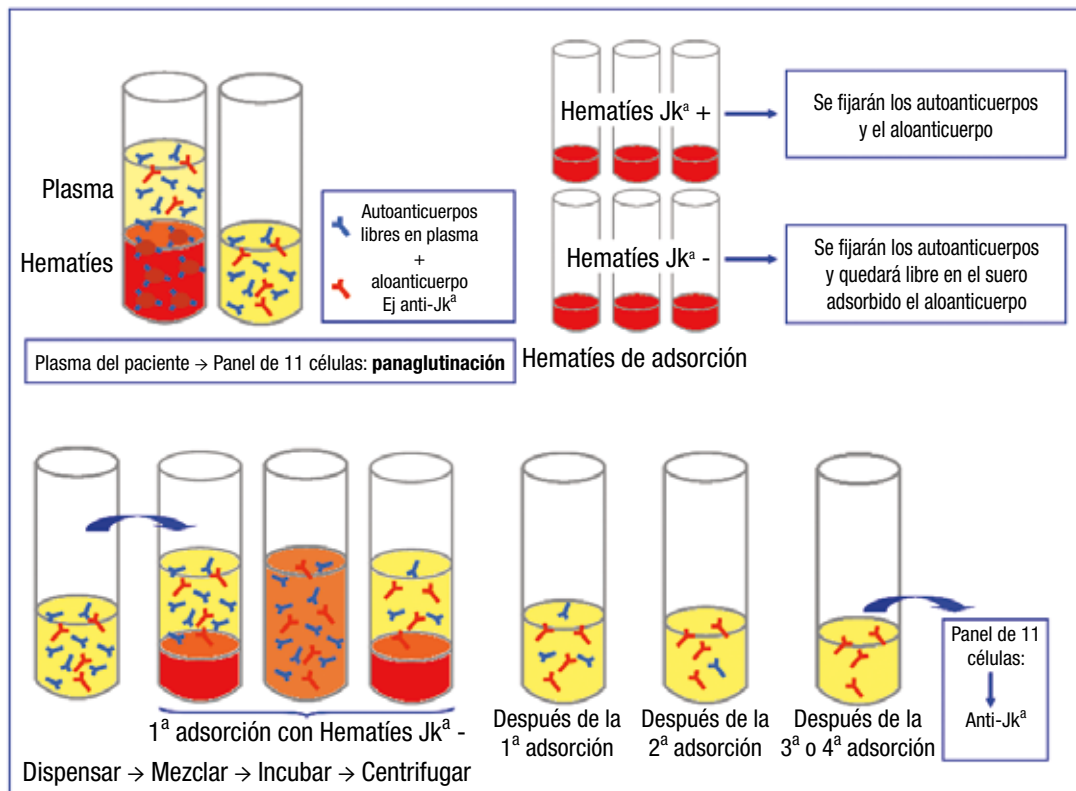


Figura 4. Las adsorciones alogénicas diferenciales permiten estudiar la presencia o no de aloanticuerpos en pacientes con AHAI y autoanticuerpos libres en plasma. En el ejemplo, podremos identificar el aloanticuerpo anti-Jk^a después de adsorber los autoanticuerpos con células Jk^a-

Al igual que con la autoadsorción, el tratamiento enzimático de los hematíes mejora el rendimiento de cada adsorción, aunque no es absolutamente necesario.

Como la mayoría de las reacciones transfusionales hemolíticas son causadas por un número limitado de anticuerpos (ABO, Rh, Kell, Kidd y Duffy), la complejidad de disponer de hematíes de diferente fenotipo se simplifica, especialmente si se conoce el fenotipo Rh del paciente.

Los anticuerpos del sistema ABO no representan ningún problema si la tipificación se ha realizado correctamente.

El antígeno Kell puede omitirse en la selección de los hematíes a utilizar para la adsorción, ya que sólo un 7%-8% de los hematíes son Kell positivo, por lo que no planteará mayores problemas al transfundir.

El tratamiento con enzimas de los hematíes implicará la desnaturalización de los antígenos M, N, S, Fy^a y Fy^b, de manera que los anticuerpos dirigidos contra estos antígenos no podrán adsorberse y permanecerán en el suero del paciente.

En definitiva, la mayoría de los anticuerpos potencialmente hemolíticos podrán detectarse realizando las ad-

sorciones con dos células que de forma complementaria resulten Jk^a(-) y Jk^b(-).

Si no se detecta ningún aloanticuerpo en el suero adsorbido, bastará con seleccionar hematíes del mismo fenotipo Rh que el paciente y Kell (-) para poder transfundirlo.

Aunque con esta estrategia se ignoran algunos aloanticuerpos con capacidad hemolítica, la probabilidad de que produzcan una reacción transfusional es mínima.

Cuando no se conoce el fenotipo Rh del paciente, y existe una transfusión reciente que no permite determinarlo de una manera objetiva, la selección de los hematíes para las adsorciones conlleva mayor complejidad. En esta situación se debe investigar escrupulosamente la posibilidad de que algún anticuerpo de especificidad Rh quede oculto por el autoanticuerpo, y por ello se requieren tres células de fenotipo R₁R₁, R₂R₂ y rr, respectivamente. Las tres células serán Kell negativo, una de ellas Jk^a negativo, otra Jk^b negativo. Si se utilizan hematíes tratados con enzimas podemos ignorar el sistema Duffy, o de lo contrario una célula deberá ser Fy^a negativo y otra, como mínimo, S negativo.

Fenotipo de los hematíes					Permanecen en el suero
R ₁ R ₁	kk	ss	Jk(a+b-)	Fy(a+b-)	anti-c, -E, -K, -S, -Jk ^b , -Fy ^b
R ₂ R ₂	kk	SS	Jk(a+b-)	Fy(a+b-)	anti-C, -e, -K, -s, -Jk ^b , -Fy ^b
rr	kk	ss	Jk(a-b+)	Fy(a-b+)	anti-C, -D, -E, -S, -Jk ^a , -Fy ^a

La desventaja potencial de la adsorción diferencial obedece a la posibilidad de que un anticuerpo dirigido contra un antígeno de alta frecuencia también sea adsorbido por las células

empleadas, pero en la práctica estos anticuerpos son poco frecuentes.

Si los hematíes empleados en la adsorción son tratados enzimáticamente y el título del anticuerpo es inferior a

16 en la (PIATG), dos o tres adsorciones son suficientes para eliminar el autoanticuerpo.

Para disponer de los hematíes necesarios, cuando se plantee la necesidad de realizar adsorciones diferenciales, es muy útil conservar estos hematíes en una solución de conservación a 4 °C.

La autoadsorción o la adsorción diferencial del eluido también es útil para diferenciar si la reactividad observada obedece a la presencia de un autoanticuerpo o a la suma de éste más un aloanticuerpo, como podría suceder en el caso de un CD positivo como resultado de una reacción transfusional hemolítica.

Adsorciones diferenciales con Polietilenglicol (PEG)

El PEG es un polímero soluble en agua que actúa como potenciador de la reacción antígeno-anticuerpo y que, además, es muy apropiado para acortar el tiempo de cada adsorción. La incorporación de PEG a la mezcla de suero y de hematíes nos ahorra el tratamiento enzimático de los hematíes y nos permite reducir el tiempo de incubación de cada adsorción a un máximo de quince minutos. Para minimizar el riesgo de dilución de la muestra problema se aconseja emplear una proporción volumen a volumen de cada uno de los tres elementos.

Al realizar la prueba cruzada se empleará una mayor proporción del suero adsorbido del orden de 2-3 veces para compensar el efecto diluidor del PEG, y la lectura se efectuará con antiglobulina anti-IgG.

Recomendaciones finales

Obviamente, las unidades seleccionadas para transfusión deben carecer de los antígenos contra los que van dirigidos los anticuerpos detectados en el suero del paciente. En estos casos, las pruebas cruzadas continuarán siendo positivas a menos que se realicen con los sueros adsorbidos. Por esta razón, la selección de sangre con el fenotipo adecuado puede ser suficiente, o bien si decidimos cruzar las unidades cabe seleccionar las “menos incompatibles”, aunque no exista ninguna base evidente para presuponer que estos hematíes tendrán una vida más longeva que los hematíes más incompatibles.^{17,18}

Hay que procurar transfundir sólo la cantidad necesaria para compensar el estado hemodinámico del paciente, a ritmo lento (unas cuatro horas, si es factible) y con una vigilancia estricta, especialmente en los primeros minutos.

La frecuencia de repetición de las pruebas de compatibilidad debe ser la misma que para los pacientes con pruebas estándar, y por tanto, cada tres días habrá que examinar otra vez la posible presencia de nuevos aloanticuerpos ocultos.

AHAI por anticuerpos fríos

AHAI mediada por aglutininas frías (Síndrome por aglutininas frías)

Los autoanticuerpos fríos causan la aglutinación espontánea de los hematíes a temperatura ambiente y falsean los resultados en la determinación del grupo ABO y Rh(D).^{1,2,6} Por una parte, el paciente puede aparentar ser de gru-

po AB en la prueba hemática, pero en la prueba sérica las aglutininas frías potentes pueden simular un grupo O al aglutinar los hematíes A y B. Los hematíes del paciente deben mantenerse a 37 °C antes del análisis y emplear, si es necesario, solución salina precalentada (37 °C) para los lavados. Una alternativa es el tratamiento de los hematíes del paciente con DTT para desnaturalizar a los autoanticuerpos IgM y eliminar la autoaglutinación. Igualmente, los problemas generados por el suero se evitan con el calentamiento a 37 °C, o con técnicas de adsorción que nos ayuden a eliminar la aglutinina fría. Si el paciente no ha sido transfundido en los tres últimos meses es posible emplear la autoadsorción. Por el contrario, si no se cumple esta condición, se recurre a las técnicas de adsorción alogénica.

Los pacientes con síndrome de aglutininas frías suelen poseer autoanticuerpos IgM a título superior a 1000 a 4 °C. En los individuos asintomáticos, el título raramente excede de 64. La amplitud térmica es más importante que el título para predecir el comportamiento *in vivo* del anticuerpo, y las aglutininas que reaccionan por encima de 30 °C en medio salino o albuminoso se consideran patológicas. No obstante, no podemos predecir con absoluta certeza el comportamiento *in vivo* del autoanticuerpo frío con base en sus características serológicas. Habitualmente se detecta una especificidad anti-I, menos frecuente anti-i o contra otros carbohidratos como Pr, Gd, Sa, Lud, y Fl.¹⁹ La gran mayoría de adultos sólo expresa el antígeno I, y en los hematíes de cordón sólo encontramos el antígeno

no i. Las aglutininas anti-I reaccionan preferentemente con los hematíes I positivo, pero también pueden hacerlo con hematíes I negativo (hematíes de cordón o hematíes de adulto tratados enzimáticamente); por el contrario, los autoanticuerpos fríos no patológicos no reaccionan con hematíes I negativo.

La transfusión de unidades compatibles no garantiza siempre una correcta supervivencia de los hematíes, porque el autoanticuerpo frío también reaccionará con los hematíes transfundidos, y fijará complemento en la circulación sanguínea más periférica. Algunos pacientes pueden sufrir una cierta hemólisis hasta que los hematíes transfundidos adquieren resistencia a la lisis mediada por el complemento.⁶ La selección de unidades I negativo para los pacientes portadores de un auto anti-I no parece mejorar los resultados y, por otro lado, son difícilmente reclutables.²⁰

Hemoglobinuria paroxística a frigore (HPF)

Aunque la especificidad de los anticuerpos en la HPF suele ser contra el antígeno P, la rareza de las unidades P negativo (menos de 1 en 200.000) hace inviable su empleo sistemático. Afortunadamente, la mayoría de pacientes transfundidos con unidades P positivo muestra un incremento de hemoglobina postransfusional adecuado.²¹ Sólo en casos de hemólisis muy grave y persistente cabe plantearse la búsqueda de unidades de fenotipo P negativo. En la misma línea, algunos pacientes se han beneficiado de plasmaféresis para eliminar el anticuerpo de clase IgG implicado.

Aunque no hay datos evidentes que lo apoyen, parece razonable utilizar calentadores de hematíes y mantener abrigado al paciente durante la transfusión.

Referencias

1. Petz, L. D., Garratty, G. Immune hemolytic anemias. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, 2004: 61-115.
2. Eder, A. F. Transfusion therapy in autoimmune hemolytic anemia. En: Mintz PD. Transfusion Therapy. 3 ed. AABB Press, 2011: 55-85.
3. Packman, C. H. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. Blood Reviews, 2008; 22: 17-31.
4. Hoffman, P. C. Immune hemolytic anemia-selected topic. Hematology Am Soc Hematol Educ program, 2009; 80-83.
5. Lambert, J. F., Nydeger, U. E. Geoepidemiology of autoimmune hemolytic anemia. Autoimmunity reviews, 2010; 9: A350-A354.
6. Petz, L. Cold antibody autoimmune hemolytic anemias. Blood Reviews, 2008; 22: 1-15.
7. Heddle, N. M. Acute paroxysmal cold hemoglobinuria. Transf Med Rev, 1989; 3: 219-229.
8. Mayer, B., Yürek, S., Kiesewetter, H. and Salama, A. Mixed-type autoimmune hemolytic anemia: differential diagnosis and a critical review of reported cases. Transfusion, 2008; 48: 2229-2234.
9. Issitt, P. D., Anstee, D. Warm antibody induced hemolytic anemia (WAIHA). En: "Applied Blood Group Serology". 4 ed. Montgomery Scientific Publications, 1998: 939-983.
10. Petz, L. Review: evaluation of patients with immune hemolysis. Immunohematology, 2004; 20: 167-176.
11. Petz, L. Diagnostic complexities in autoimmune haemolytic anemias. Transfusion, 2009; 49: 202-203
12. Blackall, D. How do I approach patients with warm-reactive autoantibodies? Transfusion, 2011; 51: 14-17.
13. Sachs, U., Roder, L., Santoso, S. and Bein, G. Does a negative direct antiglobulin test exclude warm autoimmune haemolytic anaemia? A prospective study of 504 cases. British Journal of Haematology, 2006; 132: 651-661.
14. Yazer, M. H. and Triulzi, D. J. The role of the elution in antibody investigations. Transfusion, 2009; 49: 2395-2399.
15. Leger, R. M., Garratty, G. Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. Transfusion, 1999; 39: 11.
16. Engelfriet, C. P., Reesink HW. The detection of alloantibodies against red cells in patients with warm-type autoimmune haemolytic anaemia. Vox Sang 2000; 78: 200-207.
17. Petz, L. "Least incompatible" units for transfusion in autoimmune hemolytic anemia: should we eliminate this meaningless term? A commentary for clinicians and transfusion medicine professionals. Transfusion, 2003; 43: 1503-1507.
18. Shirey, R. S., Boyd, J. S., Parwani, A. V., Tanz, W. S., Ness, P. M. and King, K. E. Prophylactic antigen-matched donor blood for patients with warm autoantibodies: an algorithm for transfusion management. Transfusion, 2002; 42: 1435-1441.
19. Roelcke, D. Cold agglutination. Transfus Med Rev, 1989; 3: 140-146.
20. Woll, J. E., Smith, C. M., Nusbacher, J. Treatment of acute cold agglutinin hemolytic anemia with transfusion of adult i. JAMA, 1974; 299: 1779-1780.
21. Rausen, A. R., Levine, R., Hsu, T. C. S. Compatible transfusion therapy for patients with PCH. Pediatrics, 1975; 55: 275-278.

Anemia hemolítica inmune inducida por fármacos

CARMEN MARTÍN VEGA*

Introducción

Los medicamentos o fármacos inducen en algunos pacientes la formación de anticuerpos que pueden actuar contra el fármaco o contra los antígenos intrínsecos de la membrana celular. Snapper¹ describió en 1953 un paciente que había desarrollado una pancitopenia y una anemia hemolítica con prueba de la antiglobulina directa positiva tras la ingestión de mefentoina, condujo a pensar la posible intervención de los fármacos en la etiología de algunas anemias hemolíticas autoinmunes (AHI). Desde aquel caso se han descrito muchos pacientes con AHI inducida por diferentes fármacos (AHIF).

Pero la AHIF es bastante rara. Según Garratty,² aunque el 30% de las altera-

* Médico especialista en Hematología y Hemoterapia. Doctor en Medicina y Cirugía. Exjefe de Servicio del Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. cmartinvega@telefonica.net

ciones sanguíneas se deben a fármacos, y que un 5% se han descrito como AHI, la AHIF no es muy frecuente. Son mucho más comunes las trombocitopenias causadas por fármacos (10-18 casos por un millón), e incluso las neutropenias (2-15 casos por un millón). En cambio la AHIF se describe con mucha menor frecuencia. Según Petz y Garratty³ solo se da un caso de AHI de cada 100.000 personas, y concluyen que solo una por millón sería una AHIF. Casi todos los casos en la literatura presentan un grave episodio de anemia hemolítica, pero se podría concluir que existen muchos casos menos graves y que no han sido bien identificados.

Algunos experimentos más recientes han permitido una mejor comprensión de los mecanismos de producción de la AHIF. Pero los conceptos tradicionales son útiles para la identificación y clasificación de las mismas.

Conceptos tradicionales

Para que se produzca la hemólisis inmune tradicionalmente, se sugirieron los siguientes mecanismos:

Adsorción del fármaco

Garratty y Petz² denominaron adsorción del fármaco a los episodios hemolíticos en los que, como sucedía con la penicilina, el fármaco se adhería fuertemente a la membrana de la célula *in vivo*, y siempre que los anticuerpos anti-penicilina estuvieran presentes en el suero, reaccionarían solo con las células recubiertas por el fármaco.

La hipótesis del hapteno

En 1962, Ackroyd sugirió esta teoría para explicar una trombocitopenia in-

ducida por un fármaco.⁴ De acuerdo con ella, el fármaco forma una combinación lábil con las proteínas de la célula, que actúa como un hapteno y el anticuerpo solo reaccionaría con el fármaco fijado en la membrana

La hipótesis de los complejos inmunes

Shulman, en 1964,⁵ propuso la teoría sobre cómo los anticuerpos citolíticos inducidos por fármacos eran el resultado de la unión previa del anticuerpo con el fármaco y que el complejo fármaco-antifármaco reaccionaría con las células inespecíficamente.

Anemia hemolítica autoinmune inducida por fármacos

En 1966, Worlledge⁶ demostró que algunos fármacos (el primero descrito fue la alfa-metildopa) pueden inducir la producción de verdaderos autoanticuerpos, y en ocasiones se desarrolla una anemia hemolítica autoinmune de tipo IgG indistinguible de una AHI no inducida por fármacos.

La respuesta inmune a los fármacos

Actualmente se acepta que, sea o no capaz de fijarse mediante una unión covalente, el medicamento puede fijarse, aunque sea con una débil unión, a la membrana de los hematíes, dando lugar a anticuerpos dirigidos contra el propio fármaco solo, contra el fármaco unido a las proteínas de la membrana o sólo a las proteínas de la membrana. Además los anticuerpos pueden estar dirigidos contra los metabolitos del

fármaco y reaccionar *in vitro* solo con ellos y no el fármaco propiamente. Este dato es muy importante en los estudios serológicos de un paciente en el que se sospecha una AHIF.

Los anticuerpos producidos por un fármaco pueden ser dependientes (**AD**) o independientes (**AI**). Se presentan solos o los dos conjuntamente. Los AD son aquellos que precisan la presencia del fármaco o su metabolito para que las pruebas *in vitro* den resultados positivos. Los AI no requieren la presencia del fármaco para que las pruebas serológicas sean positivas.

Los AD, según sus características de actuación tanto clínicas como serológicas se subdividen en dos tipos: los de adsorción firme y los de complejos inmunes.

El tipo conocido como de **adsorción firme** fue denominado así por Petz y Garraty³ cuando se da la unión firme del fármaco a la membrana celular y el anticuerpo correspondiente reacciona solo cuando las células están recubiertas por el mismo. El más conocido es la penicilina; en la época en que se describió era el antibiótico más utilizado, pero en la actualidad se han descrito otros fármacos que producen este tipo de AHIF, aunque de forma infrecuente. Algunos ejemplos, además de la penicilina, son ciertas cefalosporinas, la eritromicina, la tolbutamida, la estreptomina, entre otras (Figura 1).

El mecanismo, conocido como de **complejos inmunes**, fue sugerido por Miescher⁷, en Alemania, y Shulman,⁵ en los EEUU, para las plaquetas y se adoptó para los casos de AHIF en que el fármaco supuestamente implicado no se adhiere firmemente a la mem-

brana del hematíe, pero desarrolla anticuerpos contra algunos componentes del plasma. Se forma entonces un complejo estable fármaco-antifármaco que se une inespecíficamente a la membrana. A este mecanismo se le ha atribuido mayor número de compuestos que ocasionarían la AHIF (Figura 2).

No es conveniente dar una lista de los fármacos descritos por este mecanismo, ya que se han reseñado más de cien que podrían producir la AHI, algunos sin pruebas concluyentes de que se hubiera detectado el anticuerpo en presencia del fármaco y porque gran parte de las publicaciones están hechas en EEUU, lo que da lugar a diferencias de nomenclatura en los distintos países. Con mayor frecuencia son anti-microbianos como el cefotetan, antibióticos como la estreptomina, o anti-inflamatorios como el diclofenaco. Otros fármacos se han descrito con menor frecuencia.

Durante más de veinte años se aceptó este mecanismo sin discusión, pero actualmente es el más controvertido.

Los **AI** no requieren la presencia del fármaco en las pruebas serológicas, para que éstas sean positivas. Cuando fue descrito en 1966, por Worlledge, constituyó uno de los hallazgos más interesantes de la literatura relacionada con las AHIF. El fármaco causante era la metildopa, que se utilizaba mucho como antihipertensivo. En la actualidad el más frecuentemente citado y capaz de producir este tipo de AIA es la fludarabina.²

Los AI se presentan como autoanticuerpos y son indistinguibles de los

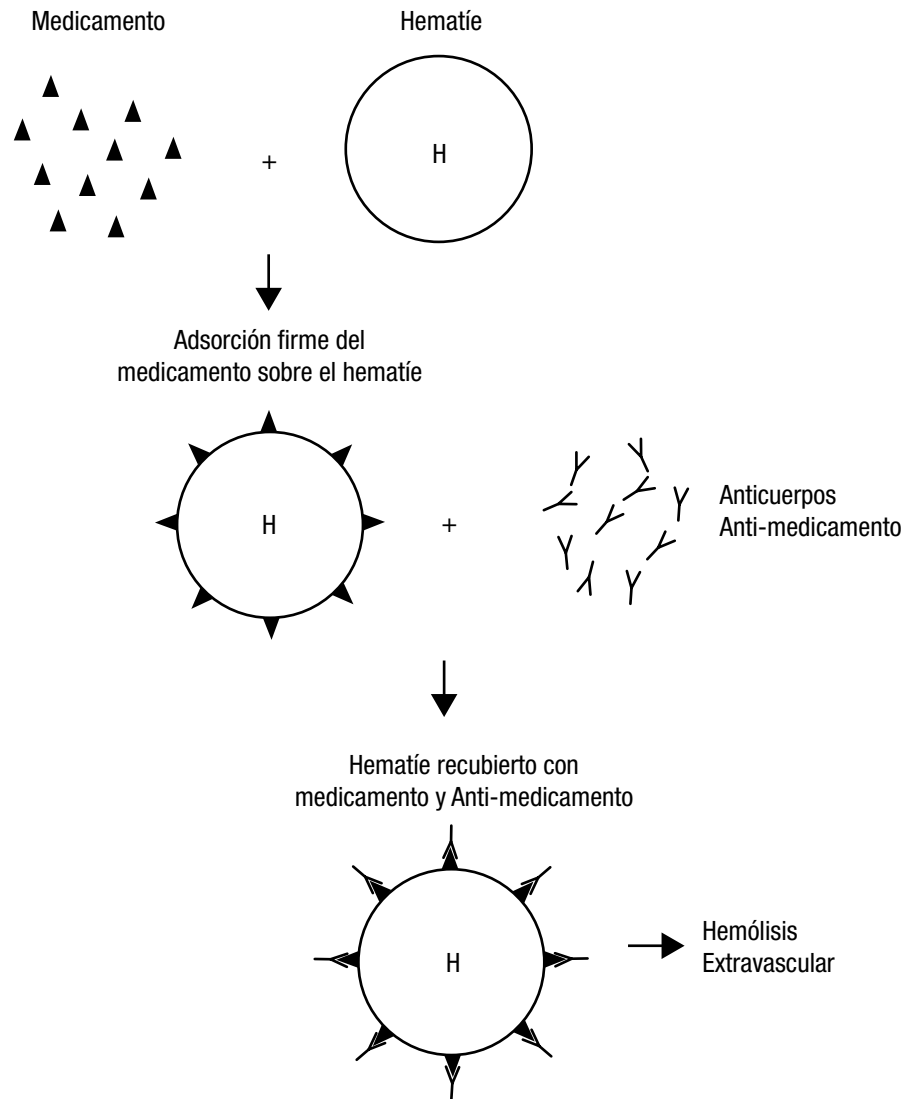


Figura 1. Anticuerpos dependientes. Adsorción firme del fármaco

que se asocian con la anemia hemolítica autoinmune. *In vitro* no es necesaria la presencia del fármaco para que las pruebas directa e indirecta de la anti-globulina sean positivas. Además de la alfa-metildopa, se han descrito como responsables de este mecanismo, el ácido mefenámico, la procainamida, la nomifensina y la fenacetina. Se reseñan algunos más, pero el papel

del fármaco no ha quedado suficientemente claro.

Se han postulado diversas teorías para explicar esta producción de autoanticuerpos por los fármacos:

1. Los fármacos alteran la membrana celular de tal forma que se desarrollan nuevos epítomos no reconocidos como propios por el sistema inmune (Figura 3).

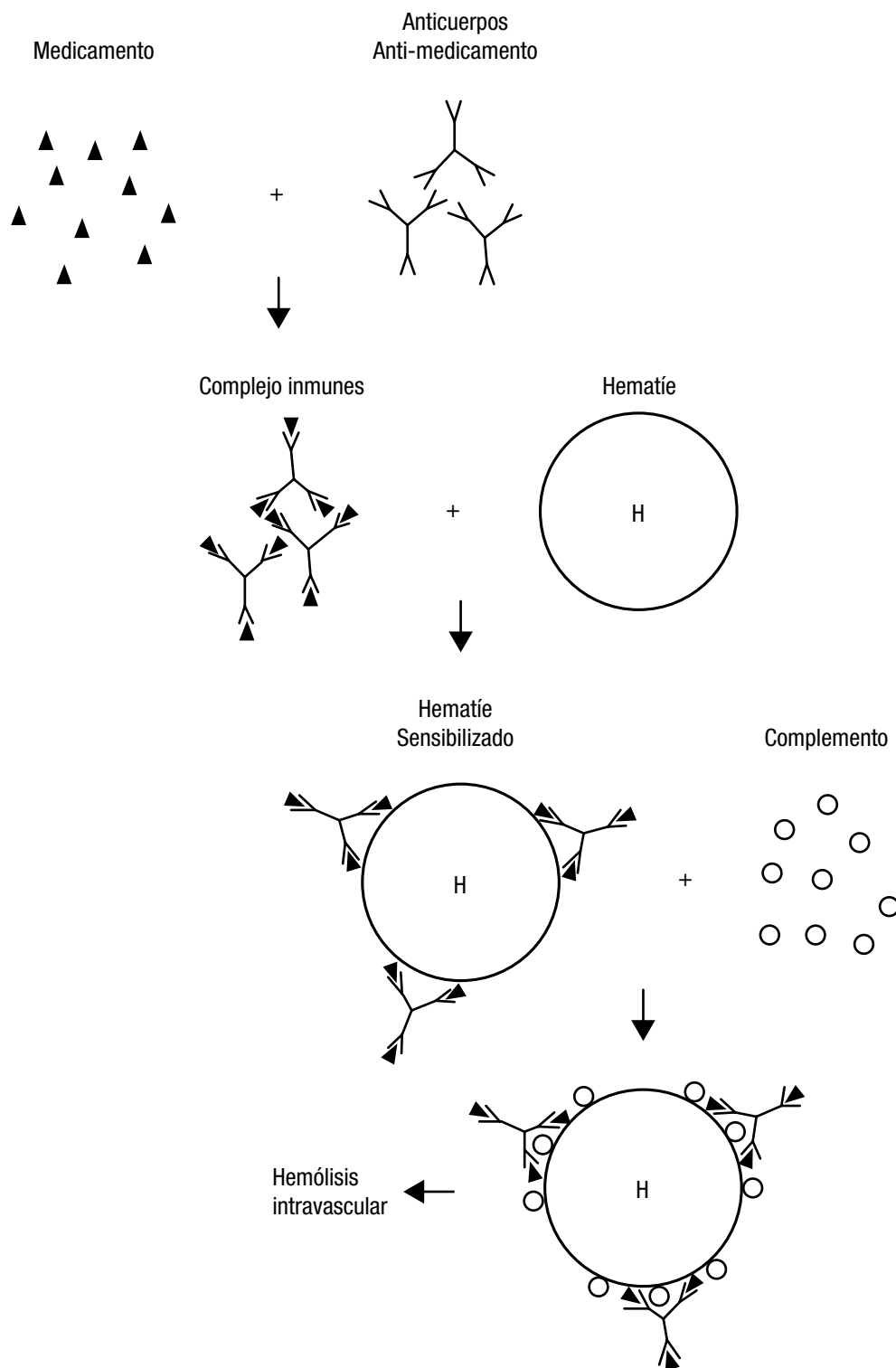


Figura 2. Anticuerpos dependientes. Formación de complejos inmunes

- De manera alternativa se ha sugerido que el fármaco produce Inmunoglobulinas G (IgG) que agregan y se adhieren sobre los hematíes.
- El fármaco altera el sistema inmune, inhibiendo las células supresoras T lo que da lugar a una producción incontrolada de autoanticuerpos (Figura 4).

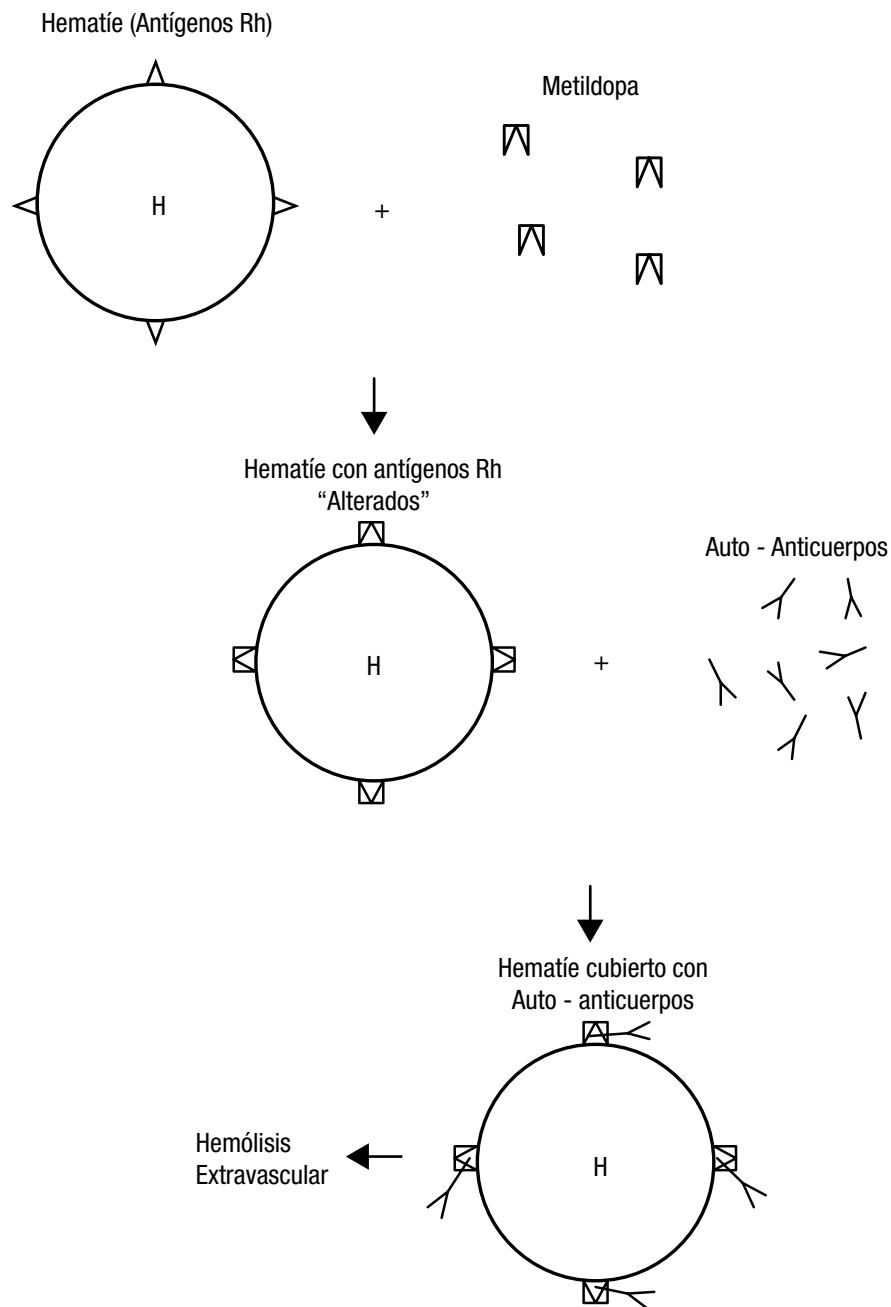


Figura 3. Anticuerpos independientes. Alteración de la membrana

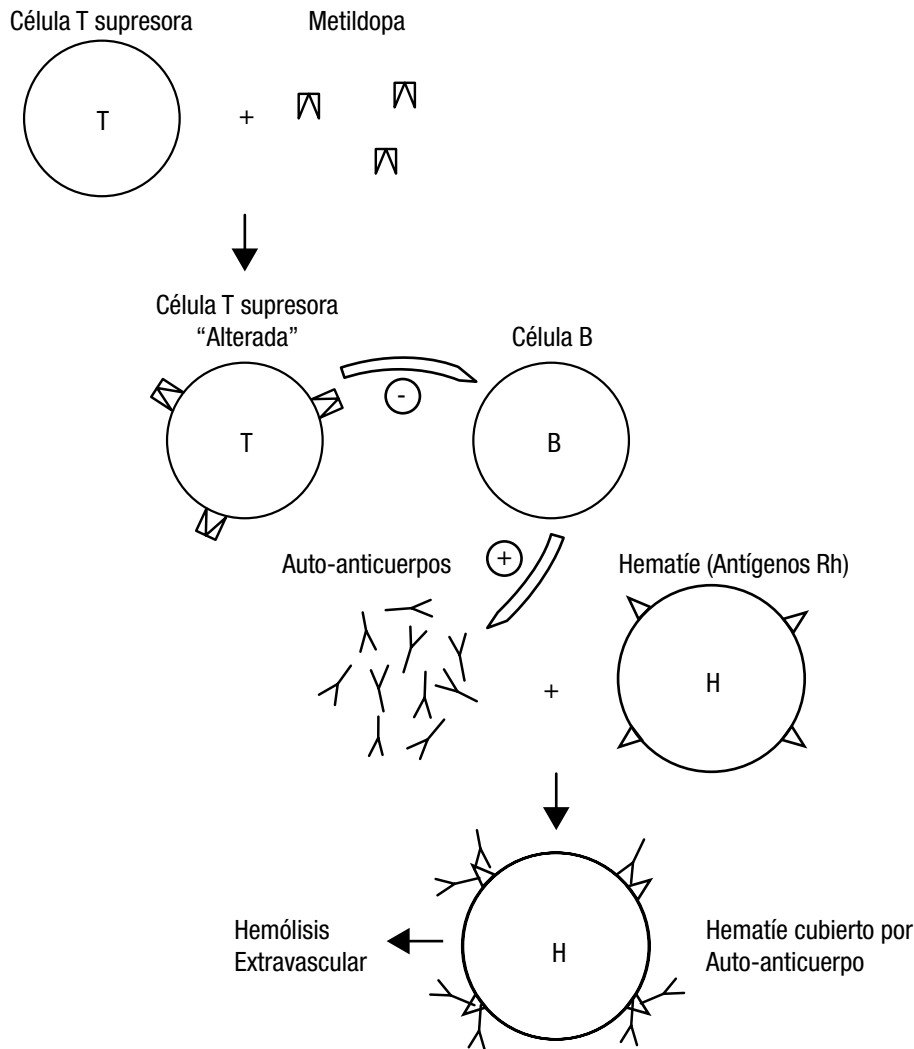


Figura 4. Anticuerpos independientes. Alteración de las células supresoras

Diferentes autores arguyen que no se han podido comprobar hechos suficientes que sustenten estas teorías.

En un mismo paciente actúa más de un mecanismo, aun cuando no sea lo más frecuente. También parece aceptarse que los AI causan una AHIF con un curso clínico más moderado que la producida por los anticuerpos dependientes, sobre todo los que producen el mecanismo de los complejos inmunes.

Adsorción no inmunológica de proteínas

Se ha descrito que algunos fármacos como las cefalosporinas alteran la membrana del hematíe, de modo que se adsorben inespecíficamente proteínas del plasma, lo cual genera una prueba de antiglobulina directa (PAD) positiva. Durante años se pensaba que esta adsorción no inmunológica era simplemente un fenómeno *in vitro*^{6, 8, 9} (Figura 5).

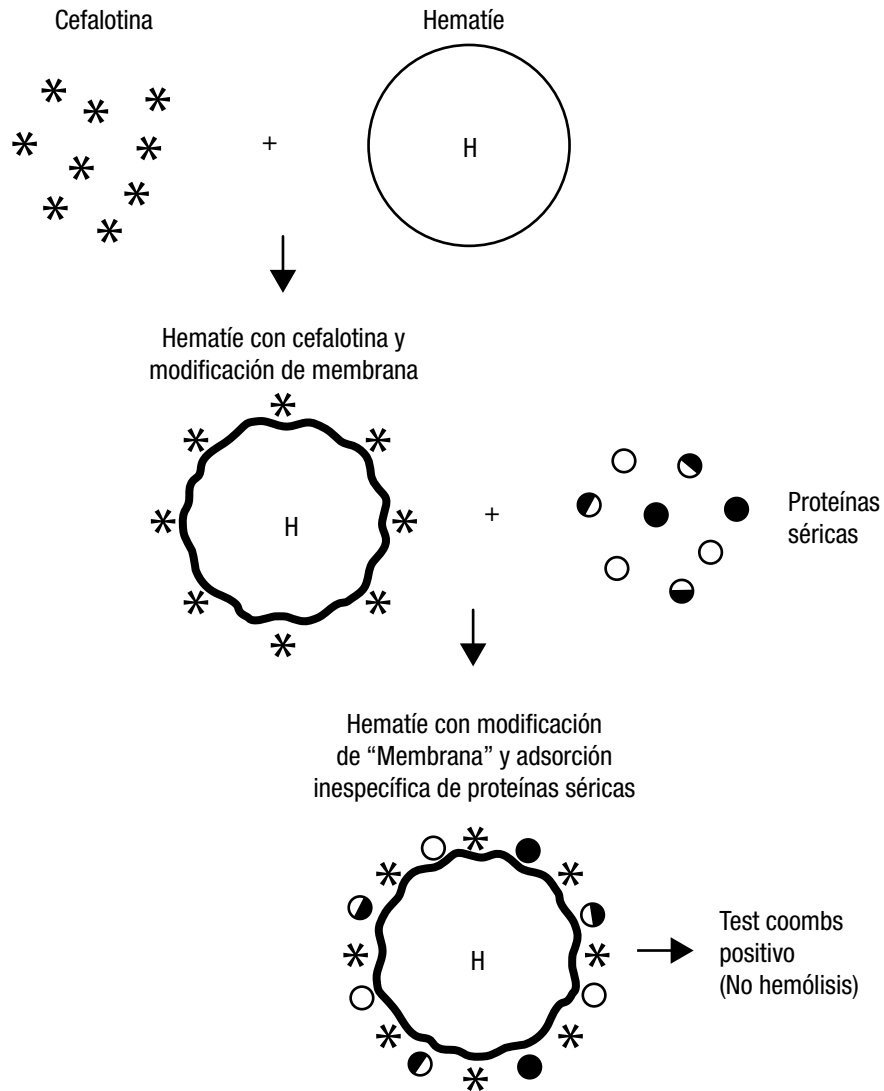


Figura 5. Adsorción inespecífica de proteínas

Actualmente se acepta que, en algunos casos, esta adsorción no específica es causa de acortamiento de la vida media del hematíe.^{10,11}

Conceptos actuales

El mecanismo de producción de anticuerpos por un fármaco más discutido

es el conocido como de formación de “complejos inmunes”. Otros mecanismos propuestos han generado controversia.⁸

1. Algunos anticuerpos tienen una especial afinidad por ciertas líneas celulares e incluso por algunos epítomos en el mismo individuo. Durante años se consideraba al he-

matíe como un “espectador inocente” sobre el cual actuaban los anticuerpos inducidos por el fármaco. Pero se han publicado numerosos trabajos que relacionan los anticuerpos dependientes con antígenos de grupo sanguíneo en la membrana del hematíe.

2. Los anticuerpos inducidos por fármacos se absorben y eluyen como otros anticuerpos específicos.

Debido a las deficiencias en la hipótesis de los “complejos inmunes”, Mueller-Eckardt y Salama¹² propusieron una teoría unificadora que explicara la respuesta inmune a los fármacos. Según ella, el proceso inmune se inicia siempre por una interacción primaria del fármaco o sus metabolitos con determinados constituyentes de la membrana celular. El nivel de interacción está condicionado por múltiples factores: composición química del fármaco o sus metabolitos, estructura de

las proteínas que constituyen la membrana celular, susceptibilidad de las proteínas del paciente para asociarse al fármaco. En este último factor a su vez influyen otros tales como el pH, la temperatura, la fuerza iónica e incluso y quizá más importante, factores genéticos del receptor. En aquellos casos en que la fijación a la membrana es débil, se produce una alteración de la membrana celular.

Los anticuerpos que se produzcan podrían estar dirigidos: a) contra los complejos fármaco-antifármaco, b) contra los antígenos celulares, c) contra ambos en el mismo paciente. En el caso

- a) las reacciones *in vitro* se asemejarían a los conocidos como de “complejos inmunes” o de adsorción firme. Son los anticuerpos dependientes (**AD**).
- b) mecanismo autoinmune. Anticuerpos independientes (**AI**).
- c) concurrirían ambos mecanismos.

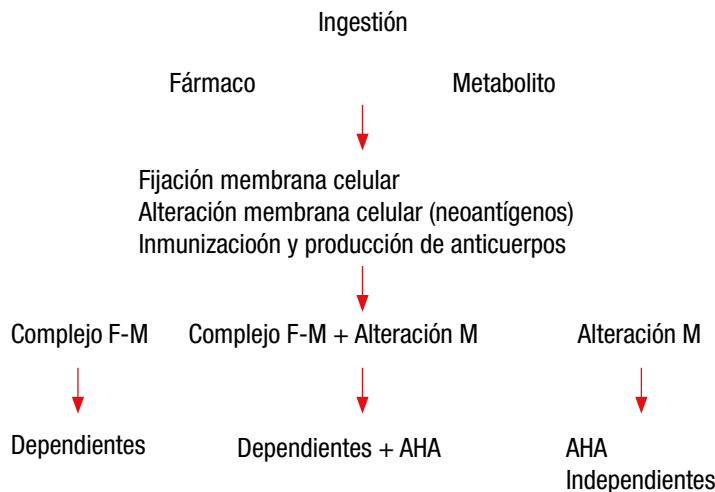


Figura 6. Teoría unificadora de Mueller-Eckhardt y Salama

Cuando esta teoría unificadora (Figura 6) fue expuesta en 1990, algunos autores no estaban conformes. Se postulaba una mayor profundidad en el estudio de los mecanismos inmunes. Pero en la actualidad todavía no se han propuesto otras hipótesis para sustituir esta teoría.²

Manifestaciones clínicas y datos de laboratorio de las AHIF

La anemia hemolítica inducida por fármacos por un mecanismo inmune se debe a:

1. Hemólisis intravascular por mediación del complemento.
2. Hemólisis extravascular mediada por interacción entre los macrófagos y los hematíes con el complemento o la IgG fijada a la membrana.

A pesar de las controversias y dudas sobre los mecanismos de producción, desde un punto de vista académico es adecuado utilizar las denominaciones anteriormente propuestas. El mecanismo de los complejos inmunes y de la adsorción firme dan lugar a los anticuerpos dependientes, y el mecanismo de autoanticuerpos, a los anticuerpos independientes. En el mecanismo de complejos inmunes la hemólisis suele ser intravascular, y en los otros dos predomina la hemólisis extravascular.

En los estudios serológicos de la AHIF se debe tener en cuenta que algunas veces es necesario el uso de los metabolitos del fármaco para demostrar la presencia de anticuerpos dependientes. Los metabolitos se obtienen o bien del proveedor del fármaco o bien con técnicas *ex vivo* utilizando la orina del paciente.

Como ya se señaló, el grupo en el que mayor número de fármacos se ha descrito es el de “**complejos inmunes**”.

Clínicamente se caracterizan por una hemólisis intravascular aguda. El paciente habría ingerido previamente el fármaco, y a veces una pequeña dosis posterior desencadena el cuadro clínico. En el 30%-50% de los casos se establece una insuficiencia renal aguda. El cuadro clínico suele mejorar rápidamente al suspender la administración del fármaco.

El TDA a veces sólo es positivo con los componentes del complemento. En ocasiones es positivo también con la anti-IgG y más raramente con la anti-IgM.

El suero del paciente reacciona con los hematíes testigo en presencia del fármaco o de sus metabolitos. Se observa aglutinación, hemólisis o sensibilización de la prueba de la antiglobulina indirecta.

En los casos de la **adsorción firme** del fármaco, en general los pacientes han sido tratados con altas dosis del fármaco. Si hay hemólisis, es menos grave que en el caso anterior, y en general es una hemólisis extravascular.

Son fármacos muy bien fijados a la membrana eritrocitaria, y su fijación persiste después de muchos lavados. Para detectar los anticuerpos es necesario preparar los hematíes testigo con el fármaco supuestamente implicado. Las condiciones de pH, concentración del fármaco, temperatura de incubación etc. varían de uno a otro fármaco. Una vez revestidos los hematíes se enfrentan con el suero del paciente y se observa la aglutinación, hemólisis o si el test de antiglobulina indirecto es positivo.

Los fármacos que actúan produciendo **autoanticuerpos** suelen ocasionar un perfil clínico muy similar al que se observa en los pacientes con AHAI. Son los AI.

En el caso de la alfa-metildopa, un 30% de pacientes que recibían el fármaco daban un TDA positivo, pero la hemólisis solo se producía en un 1% de ellos. Al ser un AI, la interrupción de la medicación permitía la hemólisis y confirmaba la implicación del fármaco en la AHIF. Cuando se describió por primera vez, se observó que la PAD positiva podía persistir incluso hasta dos años después de ser suprimido.⁶

El estudio serológico revela una PAD de tipo IgG, aun cuando alrededor del 17% presenta una débil sensibilización al complemento.

Un nuevo mecanismo de AHIF

Garratty y colaboradores¹⁰⁻¹¹ han publicado que los hematíes con IgG en su membrana pueden dar positivo en las pruebas de monocitos en monocapa, esto sugiere que los macrófagos podrían interactuar con estos hematíes recubiertos de IgG, lo cual los lleva a una disminución de su supervivencia. Otro fármaco, además de los diferentes tipos de cefalosporinas, sería el cisplatino. Ahora parece claro que los pacientes crean anticuerpos contra el fármaco y que la adsorción inespecífica de proteínas estaría implicada en el proceso hemolítico.

Conclusiones

Actualmente los llamados mecanismos tradicionales solo se utilizan con fines

didácticos. Los anticuerpos que producen AHIF se clasifican en dependientes e independientes.

Algunos fármacos que inicialmente fueron los más frecuentemente hallados en el estudio de las AHIF, ya no se utilizan en la práctica clínica. Es el caso de la alfa-metildopa o la penicilina.

La AHIF causada por anticuerpos independientes puede ser fácilmente confundida con la AHA. La prueba definitiva es suspender la administración del fármaco supuestamente implicado.

Aun cuando la AHIF es rara, es muy posible que haya más casos de los descritos y que no se diagnostiquen correctamente.

Es necesario un estudio serológico apropiado, efectuado por un laboratorio experimentado, para establecer la relación existente entre reacción inmune y el fármaco implicado.

Referencias

1. Snapper, I., Marks, D., Schwartz, L., Hollander, L. Hemolytic anemia secondary to Mesantoin. *Ann Intern Med*, 1953; 39:619-23.
2. Garratty, G. Immune hemolytic anemia associated with drug therapy. *Blood Reviews*, 2010; 24:143-150.
3. Petz, L. D., Garratty, G. *Acquired immune hemolytic anemias*. New York; Churchill Livingstone; 1980.
4. Ackroyd, J. F. The immunological basis of purpura due to drug hypersensitivity. *Proc R Soc Med*, 1962; 55 30-36.
5. Shulman, N. R. A mechanism of cell destruction in individuals sensitized to foreign antigens and its implications in auto-immunity. *Ann Int Med*, 1964; 60:506-20.
6. Worledge, S. M., Carstairs, K. C. Dacie, J. V. Autoimmune haemolytic anaemia associated with alpha methyl dopa therapy. *Lancet*, 1966; 2:135-139.

7. Miescher, P. A., Gorstein F. Mechanisms of immunogenic platelet damage. In: Johnson SA, Monto RW, Rebuck JW, et al, eds. *Blood Platelets*. London: Churchill, 1961:671.
8. Petz, L. D., Garratty, G. *Immune hemolytic anemias*. 2nd. ed. Philadelphia. Churchill and Livingstone, 2004.
9. Spath, P., Garraty, G., Petz, L. Studies on the immune response to penicillin and cephalotin in humans. *Immunohematological reactions to cephalotin administration*, *J. Immunol.*, 1971; 107: 860-869.
10. Garratty, G., Arndt, P. A. Positive direct antiglobulin tests and haemolytic anaemia following therapy with beta-lactamase inhibitor containing drugs may be associated with nonimmunologic adsorption of protein onto red blood cells. *Br J Haematol.*, 1998; 100:777-783.
11. Arndt, P., Garratty, G., Isaak, E. Bolger, M., Lu, Q. Positive direct and indirect antiglobulin tests associated with oxaliplatin can be due to drug antibody and/or drug-induced nonimmunologic protein adsorption. *Transfusion*, 2009; 49:711-718.
12. Salama, A. *Drug induced immune haemolytic anaemias*. *New Concepts in Immune hemolytic anemia* edited by Garraty G and Martin Vega C. ESTM. Sitges Barcelona, 1996.

Reacciones hemolíticas transfusionales

ARMANDO CORTÉS BUELVAS*

Introducción

Las consecuencias de una transfusión incompatible abarcan un amplio espectro: en algunos casos, el paciente sólo queda inmunizado con aloanticuerpos teniendo un riesgo potencial para las transfusiones posteriores o embarazos. A veces, las pruebas serológicas (por ejemplo, la prueba de antiglobulina directa - PAD) se convierten en positivas después de la transfusión, sin síntomas clínicos. En otros casos, el efecto terapéutico de la transfusión (por ejemplo, el aumento esperado del valor de la hemoglobina del paciente) no se produce o es solo transitorio, pero en un número de casos se producen trastornos graves o potencialmente mortales.

* *Especialista en Anatomía Patológica y Patología Clínica. Profesor titular y Jefe del Departamento de Patología de la Universidad del Valle. Director del Hemocentro del Valle del Cauca. Director del Servicio de Transfusión del Hospital Universitario del Valle. Cali, Colombia. acortes59@gmail.com*

Epidemiología

La frecuencia de la reacción hemolítica transfusional aguda (RHTA) no es fácil de determinar. El índice de error en las compatibilidades ABO/Rh es de 1:6.000 a 1:20.000.^{1,2} Los sistemas de hemovigilancia en varios países han presentado unos índices de riesgo de RHTA de 1:76.000, reacción hemolítica fatal $1:1.8 \times 10^6$, evidencia clínica o de laboratorio de hemólisis de 1:80.000 y transfusión ABO incompatible de 1:40.000.^{3,4}

Es sabido que las reacciones hemolíticas transfusionales tardías (RHTT) son más comunes que las agudas, y se calculan en aproximadamente 1:2.500 transfusiones.^{2,5} Se ha considerado que la RHTT es probablemente la reacción menos reconocida y menos reportada por la disociación temporal de causa y transfusión.⁶⁻⁸

En un informe de la FDA de los Estados Unidos sobre las muertes por reacción hemolítica aguda asociada a la transfusión, entre 1976 y 2008, se observa una disminución de los casos atribuibles a incompatibilidad ABO del 13,1% a 5,5%, mientras que se han incrementado las debidas a anticuerpos diferentes del sistema ABO de 2,7% a 8,5%, al punto que durante el período 2005-2008 los anticuerpos no-ABO fueron implicados en el 60,7% de todas las RHT fatales, involucrando a los siguientes anticuerpos: anti-Jk^b, -Jk^a, -Kell, -Fy^a -Fy^b, -E, -Js^a, -I y múltiples.⁹ De las muertes informadas a la FDA desde 2005 al 2009, el 27% (68 pacientes) fue causado por reacción hemolítica transfusional.¹⁰

Etiología

Las razones para que ocurra una reacción hemolítica transfusional (RHT) puede ser error humano (por ejemplo, la identificación incorrecta de un paciente, producto de la sangre, o la muestra de sangre) o son inevitables (por ejemplo, RHTT causada por un anticuerpo muy débil que no pudo ser detectado en el momento de la compatibilidad cruzada), mientras que las fallas técnicas parecen ser menos frecuentes.¹¹

La RHTA es causada por la transfusión de glóbulos rojos incompatibles (a partir de concentrados de glóbulos rojos, concentrado de granulocitos, e –históricamente– de sangre entera) dados a un receptor con anticuerpos regulares, es decir, isoanticuerpos anti-A y/o anti-B, en el caso de un error ABO, o con aloanticuerpos irregulares inducidos por transfusiones o embarazos previos que se dirigen hacia antígenos distintos de ABO en los glóbulos rojos del donante.

Con menor frecuencia, una RHTA puede ser causada por anticuerpos presentes en el plasma donado del plasma fresco congelado (PFC), concentrado de plaquetas (CP), concentrado de inmunoglobulina, rara vez por concentrados de factores de la coagulación no recombinantes (F VIII), o –históricamente– sangre entera) que se dirigen contra los antígenos ABO de los glóbulos rojos del paciente. Los anticuerpos irregulares del donante son menos importantes debido a que su título es generalmente bajo y a la dilución en el plasma del receptor. Este tipo de hemólisis aunque poco frecuente puede ser grave si los donantes tienen títulos altos de anticuerpos ABO,

en especial cuando las plaquetas grupo O de donantes con altos títulos de anticuerpos anti-A son transfundidas a pacientes de grupo A.¹² Los isoanticuerpos presentes en el sobrenadante de los concentrados de glóbulos rojos no producen efectos adversos debido a que la cantidad de plasma donado que se conserva en los CGR con solución aditiva es pequeño (aproximadamente 30 ml), y los anticuerpos se diluyen en la solución aditiva y después de la transfusión en el plasma del paciente. Por otra parte, en el caso de una transfusión masiva –incompatibilidad menor ABO–, los hematíes del receptor son sustituidos cada vez más por los glóbulos rojos del donante. También es poco probable que una incompatibilidad entre los donantes (por ejemplo, si RBC concentrados de GR del grupo original de sangre del paciente se da después de una transfusión de intercambio con el grupo O GR) cause un RHTA si los concentrados GR tienen solución aditiva y pequeño volumen de plasma residual.

Es posible que se presente una situación especial en pacientes después de trasplante de células madre o de médula ósea, y a veces también después del trasplante de órganos sólidos.

Si los linfocitos B de los donantes han sido transferidos junto con el trasplante, pueden producir isoanticuerpos, y en casos raros también anticuerpos irregulares en el receptor.^{13,14} En el caso de “incompatibilidad menor” a los glóbulos rojos del receptor, este síndrome del linfocito pasajero causa hemólisis, y en el caso de la incompatibilidad (inter-donador) de los glóbulos rojos transfundidos también produce RHT.

Las RHTT son particularmente ocasionadas por una respuesta inmune secundaria a un antígeno en los glóbulos rojos del donante: si un paciente había sido inmunizado hace mucho tiempo, es probable que haya disminuido el título del aloanticuerpo irregular, de modo que no se encuentre con la detección de anticuerpos o prueba cruzada en el momento de la transfusión. En contraste a una respuesta inmune primaria que dura varias semanas o meses con producción inicial de anticuerpos de la clase IgM, una respuesta inmune secundaria produce anticuerpos de la clase IgG en altas cantidades entre los 3 y los 7 días. En este momento aún, una gran cantidad de glóbulos rojos del donante está presente en la sangre del receptor. Estos glóbulos rojos son destruidos por los anticuerpos. La RHTT puede ser causada por aloanticuerpos irregulares contra una gran cantidad de antígenos de GR, más comúnmente de los sistemas Rhesus, Kidd, Duffy, Kell, y MNSs.

En algunos casos de RHTT la DAT es positiva por un tiempo más largo de lo que se esperaría de acuerdo con la supervivencia de los glóbulos rojos transfundidos, o la magnitud de la caída en el valor de la hemoglobina del paciente puede ser superior a la cantidad de los glóbulos rojos de donantes aún presentes en la sangre¹⁵ del paciente, especialmente en aquellos con anemia de células falciformes (síndrome de reacción transfusional hemolítica falciforme).¹⁶ Hay varias explicaciones posibles para este fenómeno: hemólisis de glóbulos rojos transeúntes autólogos del paciente que pueden ser causados por aloanticuerpos de reacción cruzada

o por autoanticuerpos inducidos por la respuesta inmune, o la supresión de la eritropoyesis en combinación con la reacción hemolítica.¹⁷

Fisiopatología

Las RHT implican destrucción intravascular y extravascular de glóbulos rojos.¹⁸ Después de la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, se puede iniciar la vía clásica de la activación del complemento. Si la activación del complemento en la superficie de glóbulos rojos es completa, el complejo de ataque de membrana resultante (C5b6789) provoca hemólisis intravascular. Si la activación del complemento se detiene antes a nivel de C3b, los glóbulos rojos cubiertos con IgG y C3b serán destruidos por los macrófagos, principalmente en el hígado. La destrucción de los glóbulos rojos cubiertos con solo C3b es mucho menos eficaz.

Si no hay ninguna activación del complemento y los glóbulos rojos están recubiertos sólo con IgG, se eliminan de la circulación principalmente en el bazo, siendo destruidos por los macrófagos. Otro mecanismo de destrucción se da por contacto directo célula-célula con grandes linfocitos (células K) y liberación de perforinas (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ADCC).

Se puede presentar tanto hemólisis intravascular como extravascular en la RHTA y RHTT. En la mayoría de los casos, estarán ambas presentes, pero predominan de manera diferente.

La vía y el alcance de la hemólisis están influenciados por varios aspectos: la clase y la subclase de inmunoglobulina del anticuerpo involucrado, siendo

importante para los mecanismos de destrucción de glóbulos rojos antes mencionados (IgM, IgG3 e IgG1 son capaces de iniciar la vía clásica de la activación del complemento, IgG3 e IgG1 también inician el aclaramiento extravascular de GR sin la activación del complemento).¹⁸

Además, la clase de inmunoglobulina es importante por la temperatura óptima de unión del anticuerpo: la mayoría de los anticuerpos IgM prefiere temperaturas inferiores a la del cuerpo para la unión a eritrocitos. En consecuencia, no activan el complemento (o sólo en un nivel muy bajo), y por tanto, no son relevantes para RHT, mientras que los anticuerpos IgG se unen muy bien a 37°C a los glóbulos rojos. La especificidad del anticuerpo es importante porque la densidad del antígeno correspondiente en la superficie de GR influye en la activación del complemento, como la distancia entre las moléculas de IgG unidas en la membrana de GR debe ser lo suficientemente pequeña para que la molécula C1q del complemento se una a dos partes Fc de inmunoglobulina para iniciar la vía clásica de la activación del complemento.

Cuando los complejos antígeno-anticuerpo se forman en la superficie de los glóbulos rojos, la mayoría de los sitios para la activación del complemento resultan en complejos de ataque a la membrana. Esta puede ser una razón para la gravedad clínica de muchas de las incompatibilidades ABO, como el número de antígenos ABO de los glóbulos rojos (excepto para algunos subgrupos débiles de A) es mucho mayor que la de muchos otros antígenos (por ejemplo, antígenos Rh). Por último, el

título del anticuerpo y la cantidad de glóbulos rojos incompatibles son relevantes para las secuelas clínicas de RHT: por ejemplo, en el caso de una incompatibilidad ABO mayor, un bajo número de glóbulos rojos del donante es atacado por una gran cantidad (alto título) de anticuerpos preexistentes en el plasma del paciente, mientras que en la situación de una incompatibilidad ABO menor, los anticuerpos del donante se diluyen en el plasma del receptor y se distribuyen en un gran número de glóbulos rojos. Por lo tanto, incluso un pequeño volumen de glóbulos rojos ABO incompatibles (tan poco como 10 mL) puede causar síntomas clínicos.¹⁹ Un mayor volumen de sangre incompatible intensificará la gravedad de la enfermedad hasta el punto de consecuencias mortales.

Como la RHTT es causada por anticuerpos distintos de los anticuerpos anti-A o anti-B, y la cantidad del anticuerpo irregular aumenta durante varios días, la hemólisis es generalmente más lenta y los síntomas clínicos a menudo más leves. Sin embargo, en raros casos, el curso clínico puede ser grave. Las consecuencias clínicas de RHT se producen a través de varias vías fisiopatológicas.¹⁸⁻²¹

En principio, pueden ser la misma para RHT aguda y retardada, pero menos grave en esta última, como se mencionó anteriormente. Por la destrucción intravascular de los glóbulos rojos, la hemoglobina se libera en el plasma y es ligada por la haptoglobina, hemopexina y albúmina. Si se excede su capacidad de absorción, la hemoglobina libre pasa a través de los glomérulos y es reabsorbida por los túbulos renales. Si también

se supera esta capacidad de reabsorción, la hemoglobina libre se presenta en la orina. Pero en contraste con las ideas anteriores, la excreción de hemoglobina libre por los riñones no parece ser la principal causa de la insuficiencia renal en RHT. La hemoglobina liberada por la hemólisis intravascular y unida a la haptoglobina se descompone en el sistema retículo-endotelial, así como la hemoglobina liberada de los glóbulos rojos al ser destruidos por fagocitosis en la hemólisis extravascular. Esto es seguido por un aumento de la bilirrubina indirecta e ictericia prehepática. En el caso de la hemólisis intravascular masiva, se puede producir hiperpotasemia, especialmente si la función renal está perturbada.

En la activación del complemento por la vía clásica, las anafilotoxinas C3a y C4a, y en el caso de la activación completa del complemento también se forma C5a, en la RHT. Ellas inducen la liberación de histamina y serotonina de mastocitos causando vasodilatación, extravasación de plasma a través del endotelio vascular y la consiguiente hipotensión. Una gran cantidad de citoquinas se liberan de los leucocitos estimulados por la hemólisis intravascular, así como la hemólisis extravascular, por ejemplo, IL-1, TNF, IL-6, IL-8 y MCP (Tabla 1). La fagocitosis de los glóbulos rojos revestidos por IgG produce la liberación de citoquinas, que tiene un papel importante en los efectos de la hemólisis aguda.²² La IL-8, IL-6, IL-1β y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) están relacionadas con la activación de neutrófilos, con el factor de necrosis tumoral alfa y con la activación de la cascada de la coagulación.^{23,24}

Tabla 1. Citoquinas implicadas en reacción hemolítica transfusional

Citoquina	Acción biológica
Citoquinas proinflamatorias	Fiebre
Interleuquina-1	Hipotensión, choque, muerte
Factor de necrosis tumoral (FNT)	Movilización de leucocitos a partir de médula ósea Activación de linfocitos T y B Inducción de citoquinas (IL-1, IL-6, FNT, CXCL8, CCL2) Inducción de moléculas de adhesión Inducción de procoagulantes
Interleuquina-6 (IL-6)	Fiebre Proteína de fase aguda Producción de anticuerpos por linfocito B Activación de linfocito T
Quimoquinas CXCL8 (Interleuquina 8; IL-8) CCL2 (Proteína quimioattractante de monocitos-1; MCP-1)	Quimiotaxis de neutrófilos Quimiotaxis de linfocitos Activación de neutrófilos Liberación de histamina por basófilos Quimiotaxis de monocitos Inductor de "burst" respiratorio Inducción de moléculas de adhesión Inducción de IL-1
Citoquinas antiinflamatorias (antagonista receptor de IL-1; IL-1ra)	Inhibición competitiva de IL-1 tipo receptores I y II

Ellos causan un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con fiebre, hipotensión, movilización de leucocitos de la médula ósea, inducción de moléculas de adhesión y liberación de factor tisular a partir de células endoteliales, así como la activación de los neutrófilos que conducen a la liberación de proteasa causando daño endotelial. La activación del factor XII (factor de Hageman) por complejos inmunes circulantes y por estroma de GR tiene varias consecuencias, tales como la activación del sistema de calicreína-quinina, la cascada de coagulación intrínseca y la fibrinólisis. La activación de la calicreína a partir de precalicreína conduce a la generación de bradiquinina y calidina de quininógeno de

alto y bajo peso molecular. Estas cininas aumentan la permeabilidad capilar y causan la dilatación de las arteriolas, lo que resulta en hipotensión y el deterioro de la microcirculación. La coagulación intravascular diseminada (CID) es desencadenada no sólo por la activación de la cascada de coagulación a través de FXIIa, sino también por el material tromboplástico liberado de los leucocitos activados, plaquetas y células endoteliales dañadas. En consecuencia, la CID provoca alteración de la microcirculación mediante la formación de microtrombos, y da lugar a la lesión isquémica de los tejidos. Además, hay consumo de factores de coagulación y plaquetas que en combinación con la activación del sistema fibrinolítico

tico por FXIIa, causan sangrado difuso. La hipotensión provoca una respuesta neuroendocrina incluyendo la liberación de catecolaminas y la activación del sistema nervioso simpático. Esto lleva a la vasoconstricción en órganos ricos en receptores alfa-adrenérgicos vasculares, tales como riñones, pulmones, tracto gastrointestinal y piel. La hipotensión, la vasoconstricción y la DIC pueden causar hipoperfusión de estos órganos, la perturbación de su función y la necrosis isquémica, si se prolonga. Esta es también la causa principal de insuficiencia renal en RHT graves. Al final, un choque progresivo con insuficiencia multiorgánica puede causar la muerte en RHT no tratada.

Manifestaciones clínicas

Al principio, los síntomas de una RHT aguda a menudo no son específicos.^{11,19} Si el paciente está consciente puede presentar agitación, escalofríos, sensación de ardor en el sitio de la perfusión, dolor en el pecho, el abdomen o en la espalda, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, taquipnea y/o disnea. Síntomas objetivos también se ven en un paciente inconsciente, por ejemplo, fiebre (aumento de la temperatura corporal > 1 °C), cambios en la piel (por ejemplo, enrojecimiento, edema o palidez), taquicardia, hipotensión y/o cambio de color en la orina (coloración rojiza transparente). Por último, sangrado difuso como un signo de la CID o anuria como consecuencia de la insuficiencia renal. Especialmente en un paciente anestesiado, en quien los signos subjetivos faltan, el choque, la hemoglobinuria y el estado de hemorragia sistémica

pueden ser los primeros síntomas de una RHT aguda.

Los síntomas de una RHTT son similares a los de un RHTA, pero a menudo son menos graves. Malestar, fiebre de origen desconocido y signos clínicos de la anemia están presentes. Una caída inexplicable en el nivel de la hemoglobina del paciente e ictericia leve alrededor de una semana después de la transfusión de sangre son síntomas de RHTT. A veces la hemoglobinuria se ve en la RHTT, pero la insuficiencia renal es poco común. La muerte causada por una RHTT es muy rara, pero en un paciente en estado crítico la RHTT puede añadir otras restricciones graves que en conjunto conducen a un resultado letal. En varios casos, sin embargo, una RHTT después de la transfusión de glóbulos rojos incompatible no muestra síntomas clínicos en absoluto, siendo sólo reconocida –a menudo por casualidad– en investigaciones de laboratorio como un DAT positivo o un anticuerpo irregular hasta el momento desconocido. En estos casos, tal vez sería mejor llamarla una reacción serológica transfusional tardía (RSTT).^{5,8}

Como otras complicaciones potencialmente mortales de la transfusión (el choque séptico debido a un componente de la sangre contaminada con bacterias, la reacción anafiláctica en un paciente con deficiencia de IgA, o la lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión) también puede comenzar con síntomas similares a los de una RHTA. Es muy importante verificar o descartar la hemólisis si la condición del paciente ha empeorado en relación con la administración de un producto sanguíneo. Por otro lado, no hay que

olvidar que los síntomas que surgen durante o poco tiempo después de la transfusión de sangre también pueden ser causados por otra condición totalmente independiente de la transfusión de sangre (una coincidencia, pero no causalidad). Por lo tanto, la hemólisis aguda en un paciente es causada no sólo por una transfusión de sangre incompatible, sino también por una gran variedad de razones.²⁵ Igualmente, el proceso de enfermedades subyacentes del paciente hace que el diagnóstico de RHTA sea difícil. Los pacientes con déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa pueden sufrir hemólisis después de una transfusión. En la transfusión de pacientes con anemia hemolítica autoinmune o drepanocitosis es de difícil diagnóstico ante la presencia de fiebre e hipotensión. En estos pacientes, los alo y auto-anticuerpos múltiples pueden retrasar el diagnóstico de una RHTA y la identificación del anticuerpo ofensor.

Es probable que la hemólisis aguda sea el resultado de mecanismos no inmunes. Síntomas similares a una RHTA también se ven en el caso de administración de sangre hemolizada. Esto ocurre cuando los glóbulos rojos se dañan en la bolsa de sangre, por ejemplo, por congelación o calentamiento, químicamente mediante la adición de fármacos o soluciones incompatibles, mecánicamente por la preparación incorrecta de componentes, por contaminación bacteriana, o por exceder el tiempo de almacenamiento (Tabla 2). En tal caso, la hemoglobina libre está elevada en la bolsa de sangre. La hemólisis puede ocurrir también cuando la sangre pasa a través del dispositivo de administra-

ción, por ejemplo, calentando con un calentador de sangre defectuoso, mecánicamente mediante el paso a través de un lumen estrecho bajo presión, o químicamente por infusión simultánea de una solución incompatible. En estos casos, la hemoglobina libre elevada sólo se encuentra en el tubo de la administración, pero no en la bolsa de sangre. En contraste con la RHT causada inmunológicamente, en ambos casos de administración de sangre hemolizada, el DAT del paciente es negativo (o no ha variado entre antes y después de la transfusión).¹⁹

Una hemólisis rápida de tan solo 10 mL de sangre incompatible puede producir síntomas de una RHTA. El síntoma más común es la fiebre con o sin escalofríos. En el caso de una reacción leve se pueden presentar dolores abdominales, torácicos o dorsolumbares. En los casos graves el paciente presenta hipotensión, disnea y dolor lumbar, y en algunos casos se presenta con choque, con o sin CID. La orina roja u oscura es el primer signo de hemólisis intravascular. Particularmente en el paciente anestesiado o inconsciente, además puede presentar oliguria o raras veces CID. La gravedad de los síntomas de la reacción está relacionada con la cantidad de sangre incompatible transfundida. El reconocimiento a tiempo de dicha reacción y el cese inmediato de la transfusión evita consecuencias graves. La aparición de fiebre o anemia días o semanas después de una transfusión es característica de la RHTT. La hemólisis no es abrupta, pero algunos pacientes desarrollan ictericia y leucocitosis. La hemólisis es principalmente extravascular, aunque puede haber he-

moglobinuria, no se observa falla renal ni CID. En algunos casos la hemólisis sucede sin síntomas clínicos. Estos pacientes se presentan con anemia, sin explicación o su hemoglobina no aumenta después de la transfusión. También se presenta fiebre con hemólisis cuando el componente se ha contaminado

con un parásito intra-eritrocitario como malaria o babesia; para lo cual debe efectuarse un examen de gota gruesa y la búsqueda de anticuerpos contra el parásito para confirmar el diagnóstico. La fiebre sin hemólisis se puede dar en una enfermedad infecciosa transmitida por transfusión o en la EIVH.

Tabla 2. Diagnóstico diferencial de reacciones hemolíticas transfusionales

Hemólisis de causa inmunológica	Hemólisis de causa no inmunológica
Anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes Enfermedad por aglutininas frías Hemoglobinuria paroxística al frío Anemia hemolítica inmune inducida por drogas Hemoglobinuria paroxística nocturna Síndrome de linfocito pasajero después de trasplante de células madres u órganos sólidos Administración de globulina inmune Rh Enfermedad hemolítica del recién nacido Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas incompatible Poliaglutinación	Defectos enzimáticos de glóbulos rojos (ej. déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) Anemia esferocítica congénita Hemoglobinopatías (ej. enfermedad de células falciformes, talasemia) Porfiria eritropoyética congénita Infecciones bacterianas (ej. bartonelosis, <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i>) Infección por protozoarios (malaria, babesiosis) Hemólisis mecánica por válvula artificial o por circulación extracorpórea Fluidos incompatibles Inapropiado almacenamiento Mal funcionamiento de calentadores Agujas pequeñas, hematocrito alto Inapropiada desglicerolización Bombas de infusión Trombectomía Shunt portosistémicos Púrpura trombocitopénica trombótica Síndrome hemolítico urémico Síndrome de HELLP Intoxicaciones Ahogamiento o sofocación

Investigación de laboratorio

En cada caso de reacción transfusional aguda se debe excluir o demostrar la hemólisis inmediatamente. La forma más fácil es centrifugar una muestra de sangre anticoagulada del paciente extraída tan pronto como sea posible después del evento, y revisar el sobrenadante para ver el color rojo. Para evitar

la hemólisis artificial, la extracción de la muestra de sangre se debe hacer con mucho cuidado, sin una fuerte succión. La hemoglobina libre > 50 mg/dL por lo general es reconocida por el color rojizo del plasma. Para una mayor investigación, la hemoglobina libre en el plasma del paciente es medida cuantitativamente en el laboratorio. Si la orina es

de color rojo, la hemoglobinuria se debe distinguir de la hematuria con la centrifugación inmediata de una muestra de orina recién extraída. Si el sobrenadante es transparente y de color rojizo, se sospecha la excreción de hemoglobina libre y probar en el laboratorio mediante el uso de una tira reactiva. Como la mioglobina también puede causar un color rojizo del plasma y la orina, la hemoglobina se debe distinguir de la mioglobina por medio de filtración de moléculas o electroforesis en pacientes con lesiones musculares graves. La reducción de la concentración de haptoglobina en el plasma es un marcador muy sensible de hemólisis, pero en la medida en que se produce en el hígado, también se reducen en los pacientes con daño hepático, y debido a que es una proteína de fase aguda, una hemólisis ligera puede pasar desapercibida en pacientes con inflamación aguda. También se reduce la haptoglobina en el plasma por la hemólisis, pero su reducción es menos sensible que la de haptoglobina. Un aumento de la lactato deshidrogenasa (LDH) en el plasma también es indicativo de hemólisis, pero como está contenida en muchos otros tejidos, por ejemplo, el miocardio, el riñón, el tejido linfático, las plaquetas, el hígado y el músculo esquelético, la actividad elevada de LDH siempre se debe interpretar junto con otros signos de hemólisis. A partir de una hora después de la hemólisis aguda, el nivel de bilirrubina también se eleva en el plasma, con un pico a las 5-7 horas, y la normalización en aproximadamente un día después del evento. A diferencia de la ictericia intra e poshepática, en la hemólisis, la bilirrubina indirecta se eleva en el plas-

ma. En la orina, la excreción de urobilinógeno suele estar aumentada, pero sin excreción de bilirrubina.

Adicionalmente, en el caso de un RHTT, se puede encontrar aumento de la bilirrubina, reducción de la haptoglobina, y la hemoglobina libre a veces ligeramente elevada en el plasma del paciente. En algunos casos también puede ocurrir hemoglobinuria. El nivel de la hemoglobina del paciente caerá de nuevo alrededor de 1 a 2 semanas después de la transfusión de sangre, sin sangrado u otra causa conocida. El recuento de reticulocitos también se eleva.

Para ampliar la investigación de una RHTA, debe extraerse una muestra de sangre del paciente después de la transfusión y la bolsa con la sangre restante del donante (y el dispositivo de administración) tienen que ser enviados al laboratorio. Además, se requiere para una evaluación completa la muestra de sangre pretransfusional del paciente y la muestra de sangre del donante (segmento del tubo) utilizados para la prueba de compatibilidad antes de la transfusión. La evaluación de una sospecha de reacción transfusional no debe ser realizada por el mismo técnico que había hecho el grupo sanguíneo y las pruebas cruzadas antes de la transfusión (para evitar la repetición de los errores).

Realizar DAT en la sangre extraída del paciente antes e inmediatamente después de la transfusión y de la sangre de la bolsa. Si la DAT del paciente se ha convertido en positiva (o es significativamente más fuerte) después de la transfusión, se debe sospechar una incompatibilidad de GR como la ra-

zón para RHT, a condición de que los glóbulos rojos del donante muestren una DAT negativa. El siguiente paso es comprobar la identidad (por lo menos para las pruebas ABO y D) de las muestras pre y postransfusionales del paciente, así como de la sangre de la bolsa de sangre donada y la muestra utilizada para la prueba de compatibilidad (en el caso de una transfusión de glóbulos rojos). Si ha habido un error en la identificación del paciente o una confusión de muestra o etiquetado incorrecto de la unidad de sangre, se debe verificar de inmediato si otro paciente también está en riesgo de ser transfundido con un producto sanguíneo equivocado.

Todos los resultados o registros falsos deben ser revisados de inmediato para evitar más errores. Se debe dar a los médicos un informe escrito sobre todos los resultados de la evaluación de una sospecha de reacción transfusional.

Una evaluación más profunda de una RHT causada por la transfusión de un concentrado de glóbulos rojos incluye las pruebas de detección de anticuerpos del receptor antes y después de la transfusión, así como la repetición de las pruebas cruzadas con el plasma del paciente (antes y después de la transfusión) y los glóbulos rojos de la bolsa de sangre. Si un PFC o un CP ha causado la RHT, se deben realizar ABO y una prueba de detección de anticuerpos del plasma del donante, así como una prueba de compatibilidad con los glóbulos rojos del paciente (antes y después de la transfusión) y el plasma de la bolsa de sangre. Si la DAT poliespecífica es positiva, se debe examinar con DAT monoespecíficos

(para inmunoglobulinas y factores del complemento C3c y C3d), y hacer una elución de anticuerpos de los glóbulos rojos para identificar el anticuerpo. Además, si una prueba de detección de anticuerpos en el plasma y/o la prueba cruzada es positiva, la identificación de anticuerpos tiene que ser llevada a cabo. Si un anticuerpo ha sido identificado en el paciente, la ausencia del antígeno correspondiente en la muestra pretransfusional indica un aloanticuerpo. Para probar que la RHT ha sido causada por la bolsa de sangre en sospecha, debe demostrarse el antígeno correspondiente en los glóbulos rojos del donante.

Como la transfusión de sangre hemolizada puede presentar los mismos síntomas que una RHTA, se debe medir la hemoglobina libre en el sobrenadante de la bolsa de sangre y, en caso de resultar negativo, también en el tubo de la administración, si no se encuentra ninguna incompatibilidad con GR.

Además, se deben realizar pruebas de esterilidad del producto, y cultivos de sangre del paciente, porque la contaminación bacteriana del producto puede causar síntomas similares a una RHT así como la sepsis bacteriana del paciente independiente de la transfusión de sangre. Si se sospecha de un RHT, pero no se detectó ningún anticuerpo con la prueba de detección de anticuerpos y la prueba de compatibilidad, estas pruebas se deben repetir con más muestras de sangre extraídas del paciente durante las próximas dos semanas, pues el anticuerpo podría hacerse evidente más tarde. En el caso de un RHTT, una DAT positiva y/o prueba de detección de anticuerpos pueden

surgir algunos días después de la transfusión de sangre, en este caso se realiza la identificación del 'nuevo' anticuerpo en el plasma del paciente o en el eluido. Para distinguir un aloanticuerpo que causa una RHTT de un autoanticuerpo recién formado, debe investigarse el antígeno correspondiente en la muestra pretransfusional del paciente. Por lo tanto, es necesario mantener la muestra de sangre utilizada para compatibilidad cruzada durante al menos diez días en el laboratorio (almacenada a 4 °C). Si esta muestra no está disponible, es útil una prueba de ADN del paciente en algunos casos. La evaluación a fondo de un caso sospechoso de un RHTT es importante porque los aloanticuerpos se deben tener en cuenta en futuras transfusiones de sangre para evitar una RHTA.^{18,19}

Tratamiento

Independientemente de la causa de una reacción adversa aguda grave a la transfusión, en un primer momento la transfusión debe ser suspendida y mantener el acceso venoso con infusión de solución salina normal (cloruro de sodio 0,9%). El paciente tiene que ser examinado y evaluado de inmediato por el médico responsable. La identidad del paciente y del producto sanguíneo se debe comprobar, y realizar una repetición de la prueba ABO del paciente y la bolsa en la cabecera del paciente. La hemólisis tiene que ser excluida o demostrada por centrifugación, y efectuar la inspección de una muestra de sangre recién extraída del paciente tan pronto como sea posible. La muestra de sangre postransfusión del paciente y la bolsa de sangre con el

resto de su contenido debe ser enviada al laboratorio para investigaciones adicionales. Para evaluar el estado del paciente, es necesario monitorear varios parámetros de laboratorio durante los próximos días: electrolitos (Na +, K +), el estado de los gases en sangre arterial (pH, pO₂, pCO₂, HCO₃-), coagulación (TTPa, tiempo de protrombina, fibrinógeno, antitrombina, monómeros de fibrina y dímero D), recuento de células sanguíneas (glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, glóbulos blancos y plaquetas) y creatinina sérica.^{11,19} Independientemente del tipo de reacción transfusional adversa, se dan por vía endovenosa esteroides (por ejemplo, prednisolona) y antihistamínicos (por ejemplo, clemastina o dimetiden) para aliviar los síntomas; y si son necesarios, analgésicos sin aspirina y antipiréticos (por ejemplo, paracetamol), antieméticos y/o sedantes.¹⁹ En el caso de una reacción transfusional grave, el soporte vital básico tiene que empezar de una vez. El paciente debe ser trasladado a una unidad de cuidados intensivos, donde sus parámetros vitales (presión arterial, frecuencia cardíaca, respiración) y la producción de orina se pueden monitorizar de forma continua.

La hipotensión se debe tratar enérgicamente con la sustitución de volumen (bajo el control de la presión venosa central o la presión capilar pulmonar) y dar catecolaminas (por ejemplo, adrenalina si la presión arterial sigue siendo baja a pesar de la sustitución de volumen). Hay conceptos diferentes en cuanto al uso de dopamina en dosis bajas (2-5 g/kg/min), que no disminuyen el flujo sanguíneo renal.¹⁹

La acidosis debe ser equilibrada con cautela por NaHCO₃ IV, evitando la hi-

pernatremia en el caso de la función renal reducida.

La aplicación de O₂, si la ventilación artificial es necesaria y la sustitución de los glóbulos rojos compatibles en el caso de persistir la anemia, puede ayudar a evitar daños en los tejidos hipóxicos.

El tratamiento de la CID se realiza de acuerdo con los valores reales de laboratorio. La heparina es controversial, debido al riesgo de aumentar las hemorragias. Los que están a favor del uso de heparina señalan que los pacientes más inestables (con reacciones más graves) son quienes recibieron volúmenes mayores de sangre incompatible y tienen más probabilidad de desarrollar CID.²⁶ La sustitución de antitrombina se debe basar en una evaluación individual de riesgos y beneficios, si su nivel se reduce significativamente. La administración de PFC, fibrinógeno y plaquetas son necesarios para detener el sangrado difuso. La proteína C activada ha mostrado algún beneficio en pacientes sépticos con CID; sin embargo, no se han agregado nuevos agentes terapéuticos para tratar la CID asociada con RHTA.^{27,28}

La insuficiencia renal puede ser prevenida y tratada mediante un manejo adecuado del choque y el mantenimiento del flujo sanguíneo renal adecuado. La administración de diuréticos (es decir, furosemida) en combinación con la sustitución iv de solución salina normal puede mejorar la perfusión y la producción de orina.²⁹ Si no hay respuesta diurética a las pocas horas, esta terapia no se debe continuar, y debe iniciarse pronto la hemofiltración o hemodiálisis.

En un caso de RHTA que amenaza la vida se puede considerar la exangui-notransfusión con sangre compatible como un último intento de eliminar los productos de la desintegración de los glóbulos rojos dañados y los glóbulos rojos cubiertos con anticuerpos, pero aún no destruidos, y para sustituir al mismo tiempo a los hematíes compatibles como transportadores de oxígeno.^{11,19}

Las RHTT no suelen necesitar medidas terapéuticas. Sin embargo, se debe monitorizar el estado de coagulación, la función renal, y un recuento de células de la sangre. A veces, es necesaria la transfusión de glóbulos rojos concentrados compatibles si la hemoglobina del paciente sigue cayendo. El tratamiento en general es sintomático (por ejemplo, antipiréticos)¹⁹.

Prevención

Como a menudo las RHTA son causadas por errores de identificación (del paciente o del producto de la sangre), es importante comprobar la identidad del paciente cuando se toma o emplea una muestra de sangre para la determinación de grupos sanguíneos o pruebas cruzadas, así como cuando la unidad de sangre se administra. En el laboratorio, las muestras de sangre de todos los pacientes también deben ser identificadas correctamente. Al menos el grupo sanguíneo ABO de cada muestra de sangre para pruebas de compatibilidad tiene que ser probado y comparado con los resultados anteriores del paciente. Por lo tanto, tal vez sería mejor llevar a cabo la primera determinación del grupo sanguíneo y pruebas cruzadas con

dos muestras de sangre extraídas por separado del paciente. Cuando los productos sanguíneos son emitidos, deben ser claramente asignados al receptor.

Inmediatamente antes de que se inicie la transfusión, es fundamental que la identidad del paciente sea nuevamente comprobada, y efectuar una prueba ABO a la cabecera ABO del paciente y comparar su resultado con el grupo sanguíneo ABO del concentrado de glóbulos rojos. También pueden ocurrir errores de identificación en la administración de productos sanguíneos autólogos. Es indispensable que la prueba ABO en la cabecera se realice antes de la retransfusión no sólo con la sangre del receptor, sino también con la del concentrado de glóbulos rojos.

Se debe hacer un examen visual del producto sanguíneo (por ejemplo, para ver cambio de color) antes de iniciar la transfusión.

Al principio de la transfusión, el paciente tiene que ser controlado por un médico. Después de algunos minutos, el control del receptor lo puede continuar una enfermera. El control se realiza durante toda la transfusión y al menos aproximadamente una hora después. La administración de productos sanguíneos en situaciones de emergencia implica un mayor riesgo de errores que en situaciones de rutina, y debe limitarse a las indicaciones realmente urgentes. Al igual que en los pacientes inconscientes, el riesgo de errores de identificación es mayor, estos pacientes deben ser identificados con mucho cuidado. Esto se aplica de la misma manera para situaciones en las que varios pacientes tienen que ser transfundidos al mismo tiempo, por ejemplo en el caso

de un accidente en masa. Para todos los aspectos de la administración de hemoderivados, se deben elaborar procedimientos escritos, y todo el personal debe ser entrenado en su ejecución.

Como las RHTT son causadas por dosis crecientes de un anticuerpo no detectable en el momento de la compatibilidad cruzada, los anticuerpos irregulares de un paciente que se han encontrado en épocas anteriores se deben tener en cuenta para la selección de CGR, incluso si la prueba de detección de anticuerpos y las pruebas cruzadas son negativas en el momento. La muestra de sangre para pruebas cruzadas no debe ser mayor de tres días, si el paciente ha sido transfundido o ha tenido embarazos en los últimos meses, con el fin de encontrar anticuerpos irregulares inducidos previamente. Una tarjeta de alerta médica debe ser emitida a todos los pacientes a quienes se les encontraron anticuerpos irregulares, con el propósito de que presenten esta información en el momento de una transfusión en un centro médico diferente. Para evitar que los pacientes produzcan nuevos anticuerpos irregulares, se deben seleccionar para la transfusión CGR sin esos antígenos que no están presentes en el receptor. Como este principio no puede ser seguido por el gran número de antígenos debido a razones logísticas, los antígenos a considerar se seleccionan por su inmunogenicidad y su frecuencia en la población. Esta última es responsable de la probabilidad de que un receptor antígeno negativo se transfunda con sangre de un donante antígeno positivo, si el antígeno no se ha probado y considerado, y por la oportunidad de encontrar un concentrado

de glóbulos rojos-antígeno negativo en un momento posterior, si el paciente ha producido un anticuerpo irregular contra este antígeno. El RhD es el antígeno más inmunogénico (alrededor del 20%-30% de probabilidad de inmunización, si un concentrado de glóbulos rojos - D positivo se da a un paciente D negativo).³⁰ Por lo tanto, debe ser considerada para todas las transfusiones de glóbulos rojos, excepto en situaciones especiales de emergencia, tales como una transfusión urgente en un hombre o una paciente posmenopáusica, si los concentrados de hematíes D-negativos no están disponibles en el momento. Otros antígenos como K y antígenos C, c, E, y e del Rh son menos inmunogénicos, y normalmente sólo se consideran en grupos especiales de pacientes, como las niñas y las mujeres antes de la menopausia, los pacientes que serán transfundidos por largo tiempo (por ejemplo, con la enfermedad de células falciformes o talasemia) y los pacientes con aloanticuerpos irregulares o con autoanticuerpos contra GR, porque, además, los anticuerpos irregulares complicarían la búsqueda adecuada de CGR en el futuro.³¹

Los resultados revelan un índice de etiquetado incorrecto de 1:71 a 1.165, con un índice de colocación de la sangre en el tubo incorrecto de 1:2000 a 1.2.800.³³ En 1:15.000 transfusiones se suministra sangre incorrecta y el riesgo de una equivocación es de 1:1000.³ En otro estudio todas las transfusiones ABO y D incompatible fueron debidas a error, con 62% de ellas ocurridas en la cabecera del paciente.³⁴ Aunque estas políticas ayudan a reducir los errores, no hay un método que sea infalible.

Entre las soluciones más prometedoras basadas en tecnología están los chips de identificación por radiofrecuencia, los escáneres manuales de códigos de barras y las neveras “inteligentes”.

El empleo de las soluciones aditivas para plaquetas también es un enfoque prometedor, al igual que la titulación de anti-A y anti B de los productos. A los pacientes que han recibido transfusiones o que están embarazadas se les debe extraer una muestra para compatibilidad en los tres días que preceden a la transfusión programada para identificar cualquier nuevo anticuerpo.³²

Un estudio retrospectivo de cinco años sobre aloinmunización con casi 3.000 pacientes reveló que el 0,4% de ellos desarrolló nuevos anticuerpos dentro de los tres días siguientes a la transfusión, incluyendo anti-E, -K y anti-Jk^a.³⁵ Los anticuerpos relacionados con reacciones serológicas o hemolíticas tardías postransfusionales son en orden de frecuencia de los sistemas Kidd, Duffy, kell y MNS.¹¹

Referencias

1. Linden, J. V., Wagner, K., Voytovich, A. E. et al. Transfusion errors in New York State: an analysis of 10 years' experience. *Transfusion*, 2000; 40:1207-13.
2. Spiess, B. D. Risks of transfusion: outcome focus. *Transfusion*, 2004; 44 (Suppl): S4-14.
3. Vamvakas, E. C., Bajchman, M. A. Transfusion related mortality: the ongoing risks of allogenic blood transfusion and the available strategies for their prevention. *Blood*, 2009; 113:3406-3417.
4. Alter, H. J., Klein, H. G. The hazards of blood transfusion in historical perspective. *Blood*, 2008 Oct 1;112(7):2617-26.
5. Vamvakas, E. C., Pineda, A. A., Reisner, R., Santrach, P. J., Moore, S. B. The differen-

- tiation of delayed hemolytic and delayed serologic transfusion reactions: incidence and predictors of hemolysis. *Transfusion*, 1995; Volume 35 (1):26-32.
6. Pineda, A. A., Vamvakas, C. E., Gorden, D. L., Winters, L. J., Moore, B. S. Trends in the incidence of delayed hemolytic and delayed serologic transfusion reactions. *Transfusion*, 1999; 39:1097-1103-44.
 7. Heddle, N. M., Soutar, R. L., O'Hoski, P. L., Singer, J., McBride, J. A., Ali, M. A., Kelton, J. G. A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post-transfusion. *Br J Haematol*, 1995; 91:1000-5.
 8. Ness, P. M., Shirey, R. S., Thoman, S. K., Buck, S. A. The differentiation of delayed serologic and delayed hemolytic transfusion reactions: incidence, long-term serologic findings and clinical significance. *Transfusion*, 1990; 30:688-93.
 9. Vamvakas, E. C., Blajchman, M. A. Blood Still Kills: Six Strategies to Further Reduce Allogeneic Blood Transfusion-Related Mortality *Transfusion Medicine Reviews*, Vol 24, No 2 (April), 2010: pp 77-124.
 10. Fatalities Reported to FDA Following Blood Collection and Transfusion: Annual Summary for Fiscal Year 2010. <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/UCM254860.pdf>
 11. Mollison, P. L., Engelfriet, C. P., Contreras, M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, Tenth edition. Oxford: Blackwell Science, 1997.
 12. Josephson, C. D., Mullis, N. C., Van Demark, C., Hillyer, C. D. Significant numbers of apheresis-derived group O platelet units have "high-titer" anti-A/A,B: implications for transfusion policy. *Transfusion*, 2004 Jun; 44(6):805-8.
 13. Leo, A., Mytilineos, J., Voso, M. T., Weber-Nordt, R., Liebisch, P., Lensing, C., Schraven, B. Passenger lymphocyte syndrome with severe hemolytic anemia due to an anti-Jk(a) after allogeneic PBPC transplantation. *Transfusion*, 2000; 40:632-636.
 14. Ramsey, G. Red cell antibodies arising from solid organ transplants. *Transfusion*, 1991; 31:76-86.
 15. Salama, A., Mueller-Eckhard, C. Delayed hemolytic transfusion reactions. Evidence for complement activation involving allogeneic and autologous red cells. *Transfusion*, 1984; 24:188-193.
 16. Petz, L. D., Calhoun L, Shulman IA, Johnson C, Herron RM: The sickle cell hemolytic reaction syndrome. *Transfusion*, 1997;37:382-392.
 17. Petz, L. D. Bystander immune cytolysis. *Transfus Med Rev*, 2006; 20:110-140.
 18. Issitt, P. D., Anstee, D. J. *Applied Blood Group Serology*. Durham, Montgomery, 1998, pp. 115-163, 907- 937.
 19. Roback, J. D. *Technical Manual*. 17th ed. Bethesda (MD): AABB, 2012.
 20. Davenport, R. D., Kunkel, S. L. Cytokine roles in hemolytic and non-hemolytic transfusion reactions. *Transfus Med Rev*, 1994; 8:157-168.
 21. Capon, S. M., Goldfinger, D. Acute hemolytic transfusion reaction, a paradigm of the systemic inflammatory response: new insights into pathophysiology and treatment. *Transfusion*, 1995; 35:513-520. (Erratum in *Transfusion* 1995; 35:794).
 22. Davenport, R. D. Hemolytic transfusion reactions. In Popovsky MA, editor: *Transfusion reactions*, ed, Bethesda, Md, 2012, AABB Press.
 23. Davenport, R. D., Standiford, T. J., Streiter, R. M. and Kumkel, S. L. Interleukin-8 production in red blood cell incompatibility. *Blood*, 1990; 76:2439-42.
 24. Hod, E. A., Cadwell, C. M., Liepkains, J. S. et al. Cytokine storm in a mouse model of IgG-mediated hemolytic transfusion reactions. *Blood*, 2008; 112: 891-894.
 25. Strobel, E. Diagnostic importance and difficulties in testing of T-antigen activation. *Infus Ther Transfus Med*, 2002; 29:249-252.
 26. Goldfinger, D. Acute hemolytic transfusion reactions--a fresh look at pathogenesis and considerations regarding therapy. *Transfusion*, 1977; 17:85-98.

27. Toh, C. H., Dennis, M. Disseminated intravascular coagulation: old disease, new hope. *BMJ*, 2003;327:974-977.
28. Norman, K. E. Alternative treatments for disseminated intravascular coagulation. *Drug News Perspect*. 2004; 17: 243-50.
29. Ludens, J. H., Hook, J. B., Brody, M. J. et al. Enhancement of renal blood flow by furosemide. *J Pharmacol Exp Ther*, 1968; 163:456.
30. González-Porras, J. R., Graciani, I. F., Pérez-Simon, J. A., Martín-Sánchez, J., Encinas, C., Conde, M. P., Nieto, M. J., Corral, M. Prospective evaluation of a transfusion policy of D+ red blood cells into D- patients. *Transfusion*, 2008; 48:1318-1324.
31. Giblett, E. A critique of the theoretical hazard of inter-racial transfusion. *Transfusion*, 1961; 1:233-238.
32. Carson, T. H. Standards for blood banks and transfusion services, ed 27, Bethesda, MD, 2011, AABB.
33. AABB Association Bulletin #06-05: Monitoring and Preventing the Occurrence of Deviations and Near-Miss Events in Pretransfusion Testing: Mislabeling/Wrong Blood in Tube, Aug. 31, 2006.
34. Janatpour, K. A., Kalmin, D., Jensen, H. M., Holland, P. V. Clinical outcomes of ABO-incompatible RBC transfusions. *Am J Clin Pathol*, 2008; 129:276-281.
35. Schonewille, H. 16. Red cell alloimmunization in multi-transfused chronic renal failure patients undergoing hemodialysis. *Transfusion*, 2006; 46:250-256.

Importancia clínica del sistema HLA en la transfusión y el trasplante

CRISTINA NAVARRETE*

Sumario

La mayoría de las células en la sangre y los tejidos expresan moléculas polimórficas, denominadas aloantígenos, entre los cuales están los antígenos del sistema HLA. Las moléculas HLA, en las que residen estos antígenos, también están envueltas en la presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T, y por consiguiente en la inducción y regulación de la respuesta inmune. Sin embargo, cuando células o tejidos se transfunden o trasplantan de un individuo genéticamente distinto a otro, los antígenos HLA son reconocidos como foráneos por el sistema inmune del receptor, lo que lleva al desarrollo de anticuerpos (aloanticuerpos) y células efectoras responsables de algunas de las más graves reacciones inmunológi-

* *PhD., FRCPath. Directora nacional de los Servicios de Histocompatibilidad e Inmunogenética, National Health Service Blood and Transplant, Inglaterra. Profesora asociada en Inmunología, División de Infecciones e Inmunidad, University College London. Londres, Reino Unido. Cristina.Navarrete@nhsbt.nhs.uk*

cas postransfusionales y del rechazo de células y órganos trasplantados. En este capítulo se describirá la relevancia clínica de los antígenos del sistema HLA en la transfusión y el trasplante con referencia a algunas de las reacciones inmunológicas más frecuentes mediadas por estos antígenos y anticuerpos, y también cubrirá algunos aspectos sobre su diagnóstico y prevención. Igualmente se describirá el rol de los genes HLA en la susceptibilidad a una variedad de enfermedades autoinmunes e infecciosas asociadas a estas moléculas.

Introducción

Aunque el rol principal de las moléculas de HLA es presentar péptidos antigénicos a las células T, éstas pueden ser reconocidas como extrañas (antígeno) por las células T del huésped por un mecanismo conocido como alorreconocimiento. Se han identificado dos vías de alorreconocimiento, directa e indirecta. En la vía directa, las células T del huésped reconocen los antígenos HLA (de clase II DR principalmente) expresados en las células y tejidos de donantes. En la vía indirecta, las células T del huésped reconocen péptidos antigénicos derivados de los antígenos HLA clase I y II del donante, y mostrados por sus propias células presentadoras de antígenos (APC). Esta capacidad de las moléculas HLA de ser reconocidas como antígenos a través de dos vías distintas, unida a su alto nivel de polimorfismo, hace que la incompatibilidad a nivel HLA sea una de las barreras para el éxito de los trasplantes de órganos sólidos o de células progenitoras hematopoyéticas (CPH).^{1,2}

Los antígenos HLA son también capaces de inducir anticuerpos (Acs) y células efectoras responsables de serias reacciones postransfusionales. Algunas de estas reacciones son mediadas por Acs o células ya presentes (o inducidas) en el receptor y que reaccionan con el producto transfundido u órgano trasplantado (inmunidad activa), mientras que otras están mediadas por células o Acs presentes en el producto transfundido y que reaccionan con células del receptor (inmunidad pasiva).

Reacciones inducidas por Acs o células HLA restringidas presentes en el receptor

Entre las reacciones postransfusionales o postrasplante mediadas por Acs o células presentes (o inducidas) en el receptor se encuentran las reacciones transfusionales febriles no hemolíticas (FNHTRs), la refractariedad plaquetaria inmunológica (RPI) o Immunological Platelet Refractoriness (IPR) y el rechazo agudo y crónico de órganos sólidos. Acs presentes en el receptor también se han asociado con el injerto tardío en los trasplantes de CPH.

Reacciones transfusionales febriles no hemolíticas (FNHTRs)

Esta es una de las reacciones postransfusionales más frecuentes y se caracteriza por fiebre, escalofríos y un aumento en la temperatura de más de 1°C o 2 °C que ocurre durante los primeros 30 a 60 minutos de iniciada la transfusión. Otros síntomas, tales como el rigor, en-

rojecimiento, taquicardia, náuseas y vómitos también pueden estar presentes. El diagnóstico diferencial de esta reacción es con las reacciones febriles hemolíticas, la contaminación bacteriana de los productos transfundidos y TRALI. Aunque estas reacciones pueden ser desencadenadas por una variedad de factores, los Acs en contra de los glóbulos blancos se encuentran en un 70% o más de los pacientes que sufren estas reacciones. Acs HLA y en menor medida Acs de título alto en contra de los granulocitos (HNA) o plaquetas (HPA), son los principales responsables de estas reacciones, las cuales también se han asociado con reacciones febriles hemolíticas de glóbulos rojos cuando los Acs son en contra de antígenos HLA residuales en los glóbulos rojos, como por ejemplo en contra del grupo Bg.

Es probable que complejos antígeno/anticuerpo también sean capaces de activar directamente las células para producir citocinas pirogénicas que conducen a la reacción febril.^{3,4,5}

Desde la introducción de la leucodepleción universal (Universal Leucodepletion, ULD) en algunos países se ha reportado una menor incidencia de FNHTR. Se ha descrito una disminución del 47,1% después de transfusiones de glóbulos rojos (pre ULD 0,34%, después de ULD 0,18%), y un 93,1% de disminución luego de la transfusión de plaquetas (pre-ULD 2,18%, post- ULD 0,15%).⁶

El reducido número de leucocitos presentes después de la ULD, no solo reduce las dianas de estos Acs, sino que además disminuye la probabilidad de sensibilización en pacientes no sensibilizados previamente.

La reacción FNHTR también puede ocurrir después de la primera exposición a plaquetas incompatibles en pacientes no inmunizados previamente, lo que indica que en estos casos es probable que la reacción no sea mediada por Acs sino por mediadores solubles, como por ejemplo IL-8. La edad y la temperatura de almacenamiento del producto transfundido también parece tener importancia, ya que se ha demostrado una correlación lineal entre los niveles de citocinas, el contenido de leucocitos y la duración de almacenamiento con una mayor acumulación de citoquinas en plaquetas mantenidas a 22 °C en comparación con los glóbulos rojos mantenidos a 4 °C.⁷

El uso de productos leucodepletados y frescos debería evitar la mayoría de estas reacciones, incluidas aquellas mediadas por la acumulación de citoquinas, ya que la eliminación de leucocitos por debajo de 5×10^6 evita la acumulación de IL-8 y citocinas inflamatorias como la IL 1, IL-6 y TNF en los glóbulos rojos y plaquetas. La presencia de CD40L soluble también ha estado implicada en este tipo de reacción.^{8,9}

Refractariedad Plaquetaria Inmunológica (RPI)

La terapia con transfusiones de plaquetas juega un papel importante en el manejo clínico de pacientes con trastornos hematológicos y oncológicos y con trombocitopenia de duración intermitente o a largo plazo. Sin embargo, aproximadamente el 30%-50% de estos pacientes se convierten refractarios a las transfusiones plaquetarias, definida la refractariedad como la falta

de un aumento adecuado de plaquetas ($<10 \times 10^9 / L$), una hora o hasta veinticuatro horas después de la transfusión. La refractariedad plaquetaria se atribuye a causas inmunológicas o no inmunológicas, aunque en la mayoría de los casos es difícil separar estas dos causales debido a la naturaleza de los pacientes afectados. Los factores no inmunológicos incluyen plaquetas viejas o mal almacenadas, sepsis, coagulación intravascular diseminada en el paciente y ciertas drogas como la anfotericina B y ciprofloxacina. La refractariedad inmunológica es normalmente debida a la presencia de Acs HLA de clase I, aunque Acs HPA y ABO de alto título también han sido implicados. La mayoría de los casos reportados debido a Acs HPA han sido en pacientes que también tienen Acs HLA, así mismo existen reportes de IPR debido a la presencia exclusiva de Acs HPA.^{10,11}

Sin embargo, la presencia de estos Acs no siempre resulta en RPI, ya que estos Acs pueden ser de bajo título o en contra de antígenos HLA de baja frecuencia y no comúnmente expresados en las plaquetas transfundidas. Además, como la destrucción de plaquetas se produce a través de los monocitos/macrófagos que expresan FcR que se una preferentemente a las IgG3 y IgG1, la presencia de esta clase de Acs podría ser más relevante.

Hoy día se usan varias estrategias para proveer plaquetas compatibles a pacientes con RPI incluidas:

a) El uso de plaquetas con pruebas cruzadas compatibles y en estos casos el suero del paciente se investiga con una muestra de todas las plaquetas disponibles.

b) La provisión de plaquetas compatibles basadas en el perfil de los Acs HLA presentes en el paciente. Estos dos métodos son útiles si el paciente no está muy sensibilizado, pero tienen la desventaja de inmunizar al paciente contra antígenos incompatibles y no es recomendado para pacientes dependientes de las transfusiones plaquetarias y que requieren de estos productos en el largo plazo.

c) La transfusión con plaquetas HLA compatibles seleccionadas en función de los antígenos HLA en el paciente y el donante. En nuestra institución los criterios de compatibilidad son los siguientes: a) Grado A, en el cual los cuatro antígenos (HLA-A y HLA B) son compatibles; b) Grado B, en el cual el paciente y el donante son incompatibles para uno o más antígenos (B1-B4)² (Tabla 1).

Una de las limitaciones de este método es que requiere un panel de donantes de aféresis previamente tipificado para los antígenos HLA- A y B. El Servicio Nacional de Sangre Inglés cuenta con un panel de más de 12.000 donantes de plaquetas por aféresis que están tipificados para los HLA-A,B y C, lo que facilita la posibilidad de ofrecer estos productos compatibles.

Las investigaciones de laboratorio en aquellos pacientes en los cuales se sospecha IPR, debería comenzar después de no obtener incrementos con plaquetas frescas, ABO idénticas y, si es posible, colectadas por aféresis de donantes individuales. Si éstas fallan en inducir incrementos, se debería proceder a investigar la presencia de Acs HLA específicos. Si estos Acs están presentes se tipifica al paciente para los antígenos HLA y luego se recomienda

transfusiones con plaquetas HLA compatibles. Aunque las plaquetas expresan antígenos HLA-A, B y C, la mayoría de los laboratorios sólo investigan los

Acs HLA-A y HLA-B, ya que la significación clínica de los Acs HLA-C en la refractariedad inmunológica está aún por establecerse.

Tabla 1. Selección de plaquetas HLA compatibles

A match = No incompatibilidad	
Paciente:	A*01-A*02 / B*08-B*44
Donante:	A*01-A*02 / B*08-B*44
Donante*	A*01-A*01 / B*08-B*08
Donante*	A*02-A*02 / B*44-B*44
*Donante homocigótico	
B match (B1-B4) = Incompatibles	
Paciente:	A*01-A*68 / B*08-B*27
B1 Donante:	A*01-A*02 / B*08-B*27
B2 Donante:	A*01-A*02 / B*08-B*07

Además de lo anterior se han descrito, y en algunos casos utilizado, otros métodos alternativos como por ejemplo las transfusiones masivas de plaquetas ABO idénticas, la inmunoglobulina intravenosa (IVIg) y el intercambio de plasma. Más recientemente, se ha descrito el uso de plaquetas tratadas con ácido que ha resultado en incrementos adecuados en un paciente aloinmunizado.¹² De estos diferentes enfoques, la transfusión masiva de plaquetas parece ser la más exitosa.

Rechazo hiperagudo, agudo y crónico de órganos sólidos

La compatibilidad a nivel de los antígenos HLA-A,-B y -DR es un factor importante que influye en el resultado del trasplante de órganos sólidos y trasplantes renales en particular. La aplicación de las técnicas basadas en la PCR ha permitido la identificación de diferencias moleculares entre los tipos de HLA, en especial los antígenos y

alelos HLA-DR, que de otro modo aparecen como serológicamente idénticos entre pares de donantes y receptores. La correlación de estos resultados con la supervivencia del injerto ha mostrado una tasa mayor de supervivencia del injerto renal cuando los receptores y donantes son HLA-DR idénticos por técnicas serológicas y moleculares, que cuando son HLA-DR idénticos por métodos serológicos, pero no molecular (87% frente a 69%).¹³

La presencia de Acs HLA circulantes dirigidos contra antígenos del donante en receptores de trasplantes renales y cardiacos se ha asociado con el rechazo hiperagudo del injerto. El rechazo hiperagudo se produce en minutos u horas cuando hay un daño irreversible en el órgano trasplantado, debido a la presencia de Acs circulantes preformados, dirigidos principalmente contra antígenos de grupos sanguíneos ABO o antígenos HLA clase I en las células endoteliales del injerto. La interacción antígeno-anticuerpo también puede re-

sultar en la activación del sistema del complemento, que conduce a la lisis celular y a la formación de coágulos, lo que lleva a la isquemia de miocardio y del injerto.

La incidencia de rechazo hiperagudo puede ser limitada por la realización de una rigurosa caracterización de suero del paciente para detectar la presencia de anticuerpos específicos del donante en el período pretrasplante, y por la realización de una prueba cruzada con el suero del paciente contra los linfocitos del donante. Una prueba cruzada positiva, debido a los anticuerpos IgG específicos en contra del donante, normalmente sería una contraindicación para el trasplante de órganos como los riñones y el páncreas. Sin embargo, hoy día existen protocolos que permiten remover estos Acs, en conjunción con un régimen de inmunosupresión, para realizar trasplantes incompatibles en algunos pacientes. Trasplantes incompatibles de anticuerpos ABO o HLA específicos (iABO o iHLA) requieren la supervisión cuidadosa de los niveles de anticuerpos y especificidad, en conjunción con un protocolo para reducir los niveles de anticuerpos.^{14,15}

La aparición postrasplante de Acs HLA específicos en contra del órgano trasplantado también se ha asociado con el rechazo del injerto, el cual puede ser agudo o crónico dependiendo de la prontitud en la aparición de estos Acs luego del trasplante.

El rechazo agudo se produce por lo general dentro de los tres primeros meses después del trasplante, pero puede ocurrir en cuestión de días, y estar limitado por compatibilidad HLA y el

uso de fármacos inmunosupresores. Aunque el rechazo agudo es principalmente un evento celular, en el cual las moléculas HLA incompatibles presentes en el injerto sirven como diana para los linfocitos T citotóxicos, los Acs HLA específicos también están asociados con rechazo agudo. Los Acs donante-específicos (*donor specific Acs or DSA*) se forman de nuevo después del trasplante y pueden dañar el injerto.¹⁶

El rechazo crónico puede ser causado por factores inmunológicos y no inmunológicos y resulta en un deterioro lento en la función del injerto, que ocurre meses o años después del trasplante. Acs y linfocitos T específicos en contra del órgano trasplantado han sido implicados en el deterioro crónico de la función del injerto. En los trasplantes renales el rechazo crónico se caracteriza por un engrosamiento de la íntima de las arterias, fibrosis intersticial y atrofia de los túbulos renales. Estudios publicados han demostrado que un aumento en el número de rechazos agudos es un factor de riesgo para el desarrollo del rechazo crónico. Otros factores no inmunológicos incluyen la preservación y perfusión del órgano y factores relacionados con el receptor como la hipertensión y la toxicidad del fármaco, la edad del donante y la calidad del tejido u órgano.¹⁷

Acs MICA y HLA DP también parecen influir en el resultado del injerto, lo que sugiere la posible necesidad de investigar estos Acs en pacientes en la lista de espera para un trasplante con la consiguiente tipificación de los posibles donantes.

Reacciones transfusionales inducidas por Acs o células HLA restringidas presentes en el producto u órgano trasplantado

Entre estas reacciones se encuentran el daño pulmonar agudo mediado por la transfusión (Transfusion Related Acute Lung Injury or TRALI) y la enfermedad injerto contra huésped asociada a los trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas (EICH) o a la transfusión (EICH-AT).

Daño pulmonar agudo mediado por la transfusión o TRALI

Este tipo de reacción postransfusional es rara, pero cuando ocurre puede ser fatal. TRALI se desarrolla más comúnmente dentro de las primeras dos a seis horas luego de la administración de componentes sanguíneos en general con alto contenido plasmático. Los síntomas incluyen fiebre, hipotensión, escalofríos, cianosis, tos no productiva, disnea e hipoxia a veces graves. La radiografía de tórax muestra grave edema pulmonar bilateral y perihiliar e infiltración pulmonar sin cardiomegalia de los vasos afectados. El diagnóstico diferencial incluye la sobrecarga circulatoria asociada a la transfusión (TACO), la reacción anafiláctica transfusional y la contaminación bacteriana. Más del 80% de los casos confirmados de TRALI se asocian con la presencia en el producto transfundido de Acs HLA de clase I o de clase II con especificidades correspondientes al antígeno HLA presente en el receptor. Las especificidades de Acs HLA que se encuentran

con más frecuencia en los casos confirmados de TRALI son HLA-A2, DR4 y DR52.¹⁸ Todos estos antígenos están expresados regularmente en pacientes de origen étnico caucásico europeo, aunque la frecuencia de antígeno no parece ser el único factor que influye en el desarrollo de TRALI. Acs HNA específicos como por ejemplo HNA-1, HNA-2 y HNA-3 también han sido identificados.¹⁸ Los Acs HLA y HNA se hallan más comúnmente en las donaciones de mujeres multíparas. Algunos casos de TRALI han sido atribuidos a Acs presentes en los pacientes y que reaccionan con las células o posiblemente con antígenos solubles transfundidos.

La mayoría de los casos de TRALI implican transfusiones de productos que contienen volúmenes significativos de plasma, tales como sangre entera, plaquetas y plasma fresco congelado (fresh frozen plasma o FFP), pero existen reportes de algunas reacciones debidas a la transfusión de glóbulos rojos resuspendidos en solución aditiva, lo que indica que pequeños volúmenes de plasma que contiene anticuerpos son todavía capaces para mediar TRALI.

Modelos animales han demostrado que TRALI es iniciada por la activación de granulocitos por Acs (HLA o HNA) transfundidos, y esta activación induce la liberación de anafilotoxinas, citocinas y quimiocinas que promueven la quimiotaxis de neutrófilos y su agregación en los pulmones. La reacción resultante induce un daño endotelial y el aumento de la permeabilidad vascular pulmonar y la pérdida de líquido en los alvéolos causando edema pulmonar no cardiogénico. En los casos clínicamente diagnosticados de TRALI, en los

cuales no se detectan Acs, la activación de granulocitos parece estar mediada por sustancias liposolubles que se acumulan durante el almacenamiento de los productos. Como resultado, se ha postulado la existencia de dos posibles mecanismos envueltos en el desarrollo de TRALI, uno mediado por Acs y otro mediado por sustancias solubles. Ambos mecanismos implican la activación de los granulocitos y el desencadenamiento de un proceso inflamatorio que lleva a la captura de los neutrófilos en el pulmón y el resultante edema pulmonar. Además, estudios retrospectivos han demostrado que productos de donantes implicados en las reacciones TRALI, han sido transfundidos en otros pacientes sin consecuencias clínicas graves, lo que sugiere que otros factores, tales como la condición clínica predisponente del paciente, TTP o la cirugía cardiovascular pueden influir en el desarrollo de TRALI. Estas observaciones han llevado a la propuesta de la teoría de los “dos golpes” para explicar el desarrollo de TRALI, el primer golpe involucra Acs o mediadores solubles, y el segundo, el estado clínico del paciente.^{19,20}

Es probable que además existan otros factores que determinen la respuesta clínica de un paciente, como por ejemplo las características de los Acs, la naturaleza y la frecuencia del antígeno involucrado, el grado de activación del complemento (en particular, la liberación de C5a) y el estado inmunológico del receptor.

Nuestro protocolo para la investigación de los casos de TRALI requiere de una evaluación inicial de cada caso por un panel de expertos, incluidos un

especialista en cuidados intensivos y uno en medicina transfusional. Una vez evaluados los casos se procede a las investigaciones de laboratorio que incluyen una prueba cruzada serológica entre el suero/plasma de los donantes y los granulocitos y/o linfocitos del paciente. Aunque esta prueba es esencial para confirmar el diagnóstico, es logísticamente difícil de realizar, y por lo tanto, en la mayoría de los casos los donantes implicados son investigados para la presencia de Acs HLA y HNA y si estos son positivos se procede a tipificar el paciente para confirmar la especificidad de los Acs en su contra y así apoyar el diagnóstico (Figura 1).

El tratamiento de TRALI incluye terapia respiratoria intensiva y apoyo circulatorio. En casi todos los casos, la suplementación con oxígeno es necesaria, aunque la ventilación mecánica no siempre es requerida. Algunos informes sugieren que la administración de corticosteroides es beneficiosa, y que los antibióticos profilácticos también ayudan. Sin embargo, y a pesar de estas medidas, la mortalidad en estos pacientes sigue siendo del 6%. La mayoría de los pacientes mejora clínica y fisiológicamente en dos o tres días con tratamiento de apoyo y sin daño residual.

En el año 2003, el Servicio Nacional de Sangre Inglés implementó una serie de medidas para reducir el riesgo de TRALI, incluidas:

- a. La producción de PFC (FFP) de las donaciones recogidas de donantes masculinos.
- b. El uso de plasma de un donante único varón para resuspender los pools de plaquetas.

- c. La captación preferencial de los donantes varones por aféresis, de tal manera que a partir de 2008 el 80% del total de las plaquetas por aféresis se obtuvo de donantes masculinos.
- d. La investigación de Acs HLA y HNA en todos los donantes mujeres por aféresis.

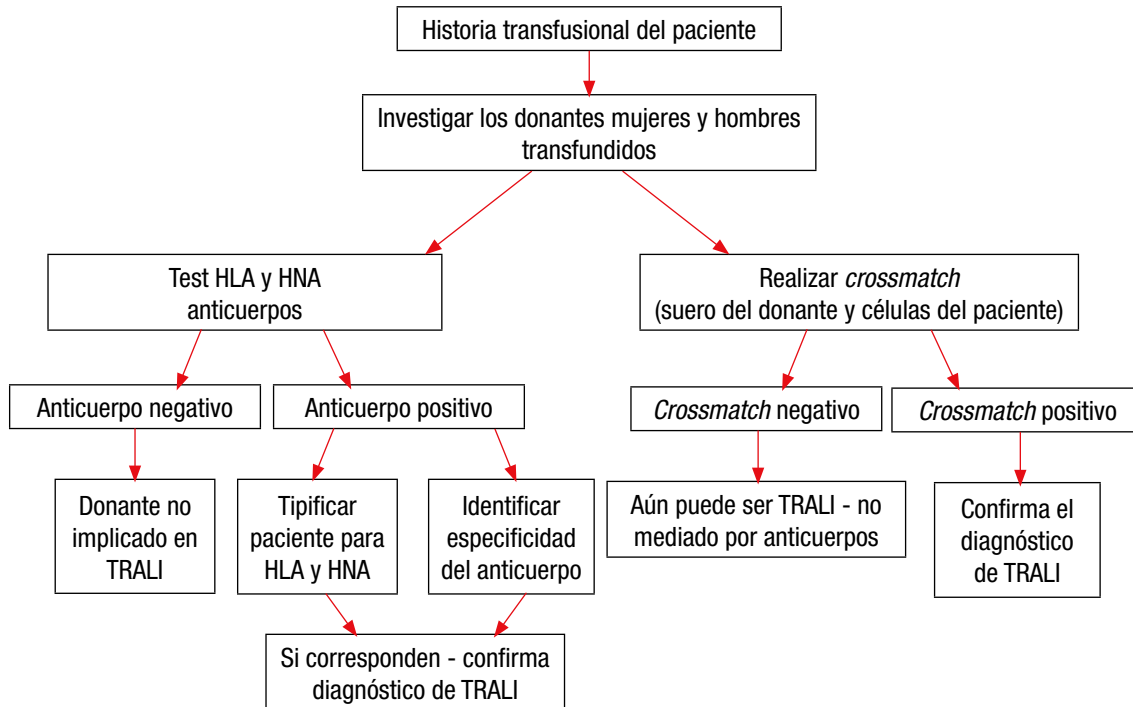


Figura 1. Estrategia para la investigación de casos de TRALI

Desde entonces se ha observado una disminución en los casos reportados. El resumen de reacciones transfusionales reportadas al sistema de hemovigilancia en el Reino Unido (Severe Hazards of Transfusions, SHOT) está descrito en la Figura 2.²¹

Enfermedad injerto contra huésped (EICH) asociada al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH)

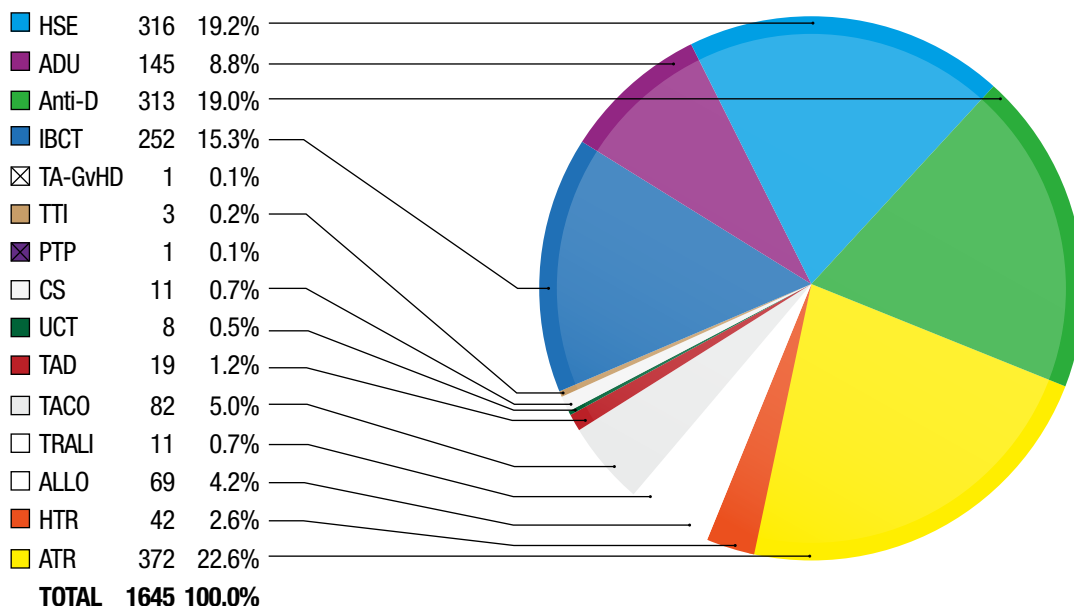
La incompatibilidad a nivel de los antígenos/alelos HLA-DR es uno de los principales factores asociados con el

desarrollo de la enfermedad de injerto contra huésped aguda (EICH), aunque la incompatibilidad en los alelos HLA-A, -B, -C es también un factor de riesgo especialmente cuando se utilizan donantes no emparentados.²²

La EICH es inducida por el reconocimiento de los antígenos HLA y de los antígenos menores de histocompatibilidad (miH) en el paciente, por los linfocitos T presentes en el injerto. Este reconocimiento, en el contexto de un ambiente inflamatorio producto del régimen de preparación del paciente, lleva a la activación y diferenciación de células efectoras y a la secreción de

moduladores solubles como citocinas capaces de producir un daño significativo en el paciente. El síndrome clínico es fiebre, diarrea, alteraciones de

las pruebas de función hepática y una erupción característica que afecta especialmente las palmas de las manos y el sistema gastrointestinal bajo.



⊠ = The number of cases for TA-GvHD and PTP are too small to be represented on this figure.

Figura 2. Casos revisados en 2012

Aunque el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) entre hermanos HLA idénticos para todos los genes HLA-A,-B,-C,-DR-DQ, es la mejor opción clínica, EICH aguda aún se desarrolla en alrededor del 20%-30% de estos pacientes. Esto es probablemente debido al efecto de los antígenos HLA que normalmente no se tipifican, tales como HLA-DP, o los miH, en la activación de las células T del donante. Los pacientes que reciben injertos HLA compatibles, pero de donantes no emparentados, tienen un mayor riesgo de desarrollar EICH que aquellos pacientes trasplantados con un hermano HLA idéntico.

El uso de métodos basados en la identificación de los alelos HLA en el

ADN, proporciona una oportunidad única para mejorar la compatibilidad HLA entre los pacientes y los donantes no relacionados, y por consiguiente, reducir el riesgo del desarrollo de la EICH. Sin embargo, se ha demostrado que el desarrollo de la EICH está asociado con unas menores tasas de recaída, probablemente debido a una respuesta de injerto contra la leucemia (ICL) asociado con la respuesta de injerto contra el huésped. Por otro lado, cuando los trasplantes se realizan usando médula ósea depletada de células T, hay una reducción en la aparición de EICH y un aumento en la incidencia de la recaída de la leucemia. Por lo tanto, células T presentes en el injerto (en este caso médula ósea), responsables de la EICH, es-

tán también implicadas en la eliminación de células leucémicas residuales.

Los trasplantes de CPH que utilizan sangre del cordón umbilical de donantes HLA idénticos y HLA-compatibles se asocian con una reducción del riesgo y la gravedad de la EICH y sin aumento de las tasas de recaída. Es posible que la falta de madurez de los efectores inmunológicos presentes en la sangre del cordón contribuya a la reducción en el desarrollo de la EICH, sin deterioro del efecto ICL.²³

Con respecto al rechazo de los injertos, esto es significativamente mayor en los receptores de un trasplante de HLA incompatible, que en los que recibieron un trasplante de un hermano HLA idéntico (12,3% frente a 2,0%). En los trasplantes con células de sangre de cordón umbilical, Acs HLA donantes específicos están fuertemente asociados con el injerto tardío o no injerto.^{24,25} Por lo tanto, el rechazo es particularmente alto en los pacientes aloinmunizados para HLA. La presencia de Acs HLA es también relevante en el período postrasplante, ya que los pacientes altamente inmunizados pueden desarrollar refractariedad inmunológica a las transfusiones de plaquetas debido a la presencia de estos Acs. Estos pacientes requieren transfusiones de plaquetas HLA-compatibles.²

Enfermedad injerto contra el huésped asociada a la transfusión (EICH-AT)

Esta condición es clínicamente parecida a la que se produce después de los trasplantes de CPH, pero en estos casos las reacciones ocurren luego de

una transfusión que contiene productos celulares. La EICH-AT es provocada por la presencia de linfocitos viables en el producto transfundido capaces de reconocer antígenos HLA en un receptor/paciente inmunocomprometido. También se han documentado casos de TA-GVHD en huéspedes no inmunocomprometidos, particularmente en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular, cirugía abdominal y en mujeres embarazadas. El síndrome clínico es parecido al que ocurre después de un trasplante de CPH, pero aparecen normalmente de ocho a diez días después de la transfusión, con una aplasia medular y es casi siempre mortal; la muerte ocurre al mes siguiente en más del 90% de los casos.²⁶

Los principales requisitos para el desarrollo de esta reacción son: a) la presencia de linfocitos viables en el producto transfundido, b) la presencia de haplotipos HLA compartidos entre el paciente y el donante, pero con otras diferencias que hacen que el donante reconozca al receptor como foráneo, c) la incapacidad del receptor para rechazar los linfocitos del donante. En un recipiente normal, las células presentes en el producto son eliminadas por el sistema inmune del receptor.

La incidencia es desconocida, pero se estima que la EICH-AT ocurre en hasta un 1% de los pacientes con neoplasias hematológicas o enfermedades linfoproliferativas. Los casos de EICH parecen ser inferiores al número real esperado debido a la falta de reconocimiento o a la ausencia de estudios de diagnóstico definitivo.

El diagnóstico de EICH-AT depende en gran medida de la presencia de cé-

lulas o ADN del donante en la sangre y/o tejidos afectados del paciente. La detección de este quimerismo se puede realizar mediante análisis de citometría de flujo o a través del ADN con marcadores, incluidos los genes HLA u otros marcadores genéticos²⁷.

Idealmente, las muestras para la extracción de ADN se deben obtener del receptor (antes y después de la transfusión) y de los donantes implicados. Muestras posteriores a la transfusión son difíciles de obtener debido al estado de pancitopenia en el receptor. Tejidos alternativos para la extracción de ADN incluyen la piel (de las zonas afectadas y no afectadas), los folículos pilosos o recortes de uñas. Si hay muestras *post mortem*, tales como médula ósea o el bazo, también se pueden utilizar para extraer ADN.

No existe un tratamiento eficaz de la EICH y la tasa de mortalidad es extremadamente alta. Las terapias inmunosupresoras han sido utilizadas con poco éxito, incluyendo la terapia con esteroides, la globulina antitimocito, ciclosporina y ciclofosfamida y anticuerpos anti-T de células monoclonales. Estos tratamientos a veces son útiles en la EICH después del trasplante de células madre, pero no son efectivos en la EICH-AT. En ausencia de cualquier tratamiento eficaz, la prevención de esta enfermedad es esencial.

El número crítico de células T que causan la EICH postrasplantes está entre $1 \times 10^5/\text{kg}$ a $1 \times 10^6/\text{kg}$, no obstante, el número preciso de linfocitos necesarios para iniciar EICH-AT no se conoce. La introducción de leucodepleción universal (ULD) ha resultado en una reducción significativa en el número de casos. Sin

embargo, ULD no es un sustituto absoluto, ya que el número de linfocitos residuales todavía puede estar por encima de la dosis umbral. Esto ha conducido a la recomendación de que todos los productos sanguíneos celulares deben ser irradiados, en un mínimo de 25 Gy, antes de la transfusión a todos los pacientes en riesgo descritos^{28,29} (Tabla 2).

En la actualidad, debido a la baja incidencia de EICH-AT en pacientes inmunocompetentes que reciben las donaciones de sangre de donantes no emparentados, la irradiación gamma no se aplica a todos los componentes celulares de la sangre para transfusión. Esta decisión se basa en el riesgo extremadamente bajo en los receptores y los costos y la logística de la irradiación universal, más el efecto sobre otros parámetros medibles en los componentes, tales como contenido de potasio y vida útil de los productos irradiados.

Detección del quimerismo postrasplante

Existen varios métodos para evaluar el éxito del injerto o la recurrencia de la enfermedad después de un trasplante de CPH alogénico. Uno de los métodos más sensibles utiliza secuencias cortas de ADN que se repiten al azar o Short Tandem Repeats (STR) en distintos genes. Otros métodos usan marcadores específicos en contra de los alelos HLA que difieren entre el receptor y el donante, aunque la sensibilidad de este último método es menor y la mayoría de los laboratorios hoy usan STRs. Para esto se utilizan muestras tomadas antes y después del trasplante y se determina la presencia de material donante. Cuan-

do la muestra del receptor se compone 100% de ADN del donante se habla de quimerismo completo del donante. Como alternativa y dependiendo del porcentaje de ADN tanto del donante como del receptor se denomina quime-

rismo mixto. Ahora es posible separar las distintas poblaciones celulares presentes en sangre periférica, como por ejemplo B, T o NK, y hacer un análisis y un reporte específico para cada subpoblación celular.

Tabla 2. TA-GVHD - Pacientes con riesgo

Alto riesgo
Desórdenes de inmunodeficiencia congénitos Enfermedad de Hodgkin's Neonatos con eritroblastosis fetal Neonatos prematuros Receptores de transfusiones intra-uterina Pacientes con trasplantes de células hematopoyéticas Pacientes recibiendo donaciones de familiares de primer o segundo grado y que comparten antígenos HLA Pacientes recibiendo transfusión de plaquetas HLA compatibles Infantes recibiendo transfusiones de intercambio
Posible riesgo
Linfomas no-Hodgkin's Pacientes con tumores sólidos
Potencial riesgo
Receptores de trasplantes de órganos sólidos Pacientes con SIDA Pacientes tratados con antagonistas de la purina (fludarabine) Neonatos

Los trasplantes de CPH en una enfermedad maligna a menudo implican condicionamiento mieloablativo con irradiación corporal total y/o quimioterapia. En estos casos, el objetivo es conseguir quimerismo completo del donante, ya que la presencia de cualquier célula del receptor potencialmente resulta en una recurrencia de la enfermedad maligna.

El quimerismo mixto es satisfactorio si el trastorno hematológico no requiere quimerismo completo. Por ejemplo, en el caso de algunas hemoglobinopatías o deficiencias de enzimas, puede haber un número mínimo de células del do-

nante capaces de producir suficientes células que llevan a la corrección de la hemoglobina o de la enzima para contrarrestar los efectos del defecto.

Asociación entre los genes HLA y la susceptibilidad a enfermedades

Los genes HLA son conocidos por estar asociados con un número de enfermedades autoinmunes e infecciosas, y se han postulado diferentes mecanismos para explicar estas asociaciones, incluyendo: a) el desequilibrio de ligamiento con el gen de susceptibilidad a la en-

fermedad pertinente, b) la presentación preferencial del péptido patogénico por ciertas moléculas de HLA, y c) la mímica molecular entre ciertos péptidos patogénicos derivados del huésped. Más recientemente, estudios de asociación a nivel del genoma (GWAS), que utilizan más de un millar de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) localizados en el MHC, han identificado una serie de estos SNP en fuerte desequilibrio de unión con alguna de las enfermedades asociadas a HLA como la artritis reumatoidea y el lupus eritematoso sistémico.³⁰

Entre aquellas enfermedades asociadas con los HLA a través de un desequilibrio de unión con el gen de susceptibilidad con la enfermedad pertinente, se encuentra la hemocromatosis hereditaria (HH). Esta se debe a una sobrecarga de hierro provocada por un trastorno hereditario en los genes implicados en el metabolismo de hierro. HH es un trastorno genético común en el norte de Europa, donde entre 1 de cada 200 y 1 de cada 400 personas sufren de la enfermedad, con una frecuencia portadora estimada de 1 a 8 y de 1 a 10. Las manifestaciones clínicas de HH son cirrosis del hígado, diabetes y miocardiopatía. La detección de sobrecarga de hierro asintomática es importante, ya que la eliminación del exceso de hierro por flebotomía puede prevenir el daño de órganos.

HH fue originalmente asociada al antígeno HLA-A3, aunque esto no es muy específico, dado que la mayoría de individuos HLA-A3-positivos no tienen HH. Más tarde se descubrió que mutaciones en el gen HFE situado a 3 Mb telomérica del gen HLA-F eran en parte responsables de esta condición. Hoy día

se describe un número de mutaciones y los datos clínicos indican que al menos tres (C282Y, H63D y S65C) pueden predisponer y afectar la evolución clínica de esta condición. Más del 90% de los pacientes con HH en el Reino Unido son homocigóticos para la mutación que sustituye una cisteína (C) con una tirosina (Y) en el codón 282 del gen HFE. La segunda y la tercera (mutaciones H63D y S65C) se cree que son menos importantes, aunque puede tener un efecto aditivo si es heredada con la primera mutación. Los estudios recientes sobre los donantes de sangre han demostrado que aproximadamente 1 en 280 donantes son homocigotos para las mutaciones. En la actualidad se aplican técnicas basadas en ADN para detectar estas tres mutaciones simultáneamente lo que permite su definición simple, rápida y sin ambigüedades.³⁰

Entre aquellas enfermedades asociadas a través de la presentación preferencial de péptidos está la producción de Acs HPA1a específicos en pacientes con trombocitopenia aloinmune del recién nacido. En este caso, la producción de Acs está fuertemente asociada con la presencia del alelo DRB3*0101. Esta es una enfermedad grave y los Acs son producidos por mujeres que son homocigotas para el alelo HPA-1b en contra del antígeno HPA-1a del padre y presente en el feto. A diferencia de los Acs HLA, estos no solo cruzan la barrera placentaria, sino que también son capaces de destruir las plaquetas del feto e inducir una profunda trombocitopenia, que en algunos casos lleva a serias secuelas clínicas. Más del 80% de los casos ocurre en mujeres homocigotas para el alelo HPA-1b.

Aunque la producción de anticuerpos HPA-1a está fuertemente asociada con el archivo HLA-DRB3*0101, sólo aproximadamente el 35% de mujeres HPA-1a-negativo, DRB3*0101-positivo desarrollan anticuerpos después de la exposición al antígeno, lo que sugiere que otros genes o factores pueden estar implicados en el desarrollo de la aloinmunización contra HPA-1a.³² Enfermedades en las que se ha postulado el mecanismo de mimetismo molecular incluyen la espondilitis anqui-

losante y la infección por *Klebsiella* y HLA-B27. Sin embargo, los mecanismos patogénicos precisos involucrados siguen siendo desconocidos. Más recientemente se ha demostrado que los genes HLA también están implicados en la respuesta a ciertos medicamentos, tales como la asociación de HLAB-57 y Abacavir, un fármaco utilizado en el tratamiento del VIH.³³ Un número de enfermedades asociadas con alelos HLA de clase I y II se han descrito en la Tabla 3.

Tabla 3. Enfermedades asociadas o ligadas al sistema HLA

Enfermedades asociadas HLA
Birdshot chorioretinopathy: HLA-A29
Behçet's disease: HLA-B51
Ankylosing spondylitis: HLA-B27
Psoriasis: HLA-Cw6
Malaria: HLA-B53
Rheumatoid arthritis
HLA-DRB1*0401/0404/0405/0408
HLA-DRB1*0101/0102
HLA-DRB1*1402
HLA-DRB1*1001
Narcolepsy: HLA-DQB1*0602/DQA1*0102
Coeliac disease: HLA-DQB1*0201/DQA1*0501
Neonatal alloimmune thrombocytopenia: HLA-DRB3*0101
Malaria: HLA-DRB1*1302/DQB1*0501
Insulin-dependent diabetes mellitus: HLA-DQB1*0302/DQA1*0301
Abacavir hypersensitivity B*5701
Enfermedades ligadas al sistema HLA
Haemochromatosis: (HLA-A3) HFE gene C282Y, H63D and S65C
21-OH deficiency: (HLA-B47) 21-OH gene

Conclusiones

Los antígenos del sistema HLA juegan un rol importante en la inducción y desarrollo de la respuesta inmune, pero son también una de las principales barreras en el éxito de los trasplantes. Acs HLA y células efectoras son responsables de algunas de las reacciones posttransfusionales más graves y del rechazo de órganos sólidos. La aplicación de métodos moleculares para la identificación de estos alelos HLA ha llevado a una mejor selección de donantes HLA para pacientes que requieren trasplantes o transfusiones HLA compatibles y que no tienen un donante HLA idéntico. Esto ha llevado a una mejora significativa en los resultados clínicos, particularmente en aquellas en que el donante es HLA compatible, pero no relacionado.

Por otro lado, la introducción de ULD ha resultado en una disminución en las tasas de inmunización inducida por estos antígenos. Así mismo, el uso preferente de donantes varones para generar productos que contienen altos niveles de plasma también ha contribuido a la disminución en la incidencia de las reacciones postransfusionales. Sin embargo, estas reacciones aún ocurren principalmente en pacientes multitransfundidos o mujeres previamente sensibilizadas a través del embarazo. En estos casos, los niveles y clases de Acs producidos son generalmente IgG con relevancia clínica.

Una mejor comprensión de la base genética de las respuestas aloinmunes podría contribuir a identificar a aquellos pacientes de alto riesgo de sensibilización, los cuales se beneficiarían con transfusiones de productos compati-

bles. Si bien esto requiere la disponibilidad de donantes regulares previamente tipificados para estos sistemas y de técnicas de laboratorio que permitan una detección rigurosa del estado aloinmune de los pacientes. La implementación de estas estrategias precisa recursos importantes y tal vez deberían orientarse a apoyar selectivamente a grupos específicos de pacientes en riesgo.

Referencias

- 1 Afzali, B., Lechler, R. I., Hernández-Fuentes, M. P. Allorecognition and the allresponse: clinical implications. *Tissue Antigens*, 2007; 69:545-556.
- 2 Brown, C. J. & Navarrete, C. V. Clinical relevance of the HLA system. *Vox Sang*, 2011; 101:93-105.
- 3 Brubaker, D. B. Clinical significance of white cell antibodies in febrile nonhaemolytic transfusion reactions. *Transfusion*, 1990; 30:733-737.
- 4 Heddle, N. M. Febrile non-haemolytic transfusion reactions to platelets. *Curr Opin Hematol.*, 1995; 2:478-483.
- 5 Contreras, M. & Navarrete, C. Immunological complications of blood transfusion. In: Marcela Contreras (ed) *ABC of Transfusion*, 4th Ed. Wiley-Blackwell, 2009. pp 61-68.
- 6 Paglino, J. C., Pomper, G. J., Fisch, G. S., Champion, M. H., Snyder, E. L. Reduction of febrile but not allergic reactions to RBCs and platelets after conversion to universal pre-storage leukoreduction. *Transfusion*, 2004; 44:16-24.
- 7 Heddle, N. M. Pathophysiology of febrile non-hemolytic transfusion reactions. *Curr Opin Hematol*, 1999; 6:420-426.
- 8 Chudziak, D., Sireis, W., Pfeiffer, H. U., Henschler, R., Seifried, E., Bönig, H. Accumulation of soluble inflammatory mediators between blood donation and pre-storage leukocyte depletion. *Vox Sang*, 2009; 96:163-16.
- 9 Blumberg, N., Gettings, K. F., Turner, C., Heal, J. M., Phipps, R. P. An association of soluble CD40 ligand (CD154) with adverse

- reactions to platelet transfusions. *Transfusion*, 2006; 46:1813-1821.
- 10 Kiefel, V., König, C., Kroll, H., Santos, S. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion*, 2001; 41:766-770.
 - 11 McVey, M., Cserti-Gazdewich, C. M. Platelet transfusion refractoriness responding preferentially to single donor apheresis platelets compatible for both ABO and HLA. *Transfus Med*, 2010; 20:346-353.
 - 12 Vassallo, Jr. R. R. New paradigms in the management of alloimmune refractoriness to platelet transfusions. *Curr Opin Hematol*, 2007; 14:655-663.
 - 13 Opelz, G. & Dohler, B. Effects of human leucocyte antigen compatibility of kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation*, 2007; 84:137-143.
 - 14 Howell, W. M., Carter, V., Clark, B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and cross matching techniques. *J Clin Pathol*.
 - 15 Takahashi, K., Saito, K., Okuyama, A., Tanabe, K., Toma, H. et al. Excellent long-term outcome of ABO-incompatible living donor kidney transplantation in Japan. *Am J Transplant*, 2004; 4(7):1089-1096.
 - 16 Hidalgo, L. G., Campbell, P. M., Sis, B., Einecke, G., Mengel, M., Chang, J. et al. Do novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant*, 2009; 9:2532-41.
 - 17 Terasaki, P. I., Cai, J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation*, 86:377-383.
 - 18 Chapman, C. E., Stainsby, D., Jones, H., Love, E., Massey, E., Win, N. et al. Serious Hazards of Transfusion Steering Group: Ten years of haemovigilance reports of the transfusion-related acute lung injury in the UK, and the impact of preferential use of male donor plasma. *Transfusion*, 2009; 49:440-452.
 - 19 Silliman, C. C., Boshkov, L. K., Mehdi-zadehkashi, Z., Elzi, D. J., Dickey, W. O., Podlosky, L. et al. Transfusion-related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors. *Blood*, 2003; 101:454-62.
 - 20 Silliman, C. C., Ambruso, D. R., Boshkov, L. K. Transfusion related acute lung injury. *Blood*, 2005; 105:2266-2273.
 - 21 Annual SHOT Report 2012.
 - 22 Petersdorf, E. W. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Immunol*, 2008; 20:588-593.
 - 23 Ballen, K. K., Gluckman, E., Broxmeyer, H. E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*, 2013 doi:10.1182/blood-2013-02-453175.
 - 24 Ciurea, S. O., Thall, P. F., Wang, X. et al. Donor-specific anti-HLA Abs and graft failure in matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2011; 118:5974-64.
 - 25 Yoshihara, S., Taniguchi, K., Ogawa, H., Saji, H. The role HLA antibodies in allogeneic SCT: is the 'type and screen' strategy necessary not only for blood type but also for HLA? *Bone Marrow Transplant*, 2012; 47:1499-1506.
 - 26 Agbaht, K., Altintas, N. D., Topeli, A., Gokoz, O., Ozcebe, O. Transfusion-associated graft-versus-host disease in immunocompetent patients: case series and review of the literature. *Transfusion*, 2007; 47:1405-1411.
 - 27 Sage, D., Stanworth, S., Turner, D., Navarrete, C. Diagnosis of transfusion-associated graft-vs-host disease: the importance of short tandem repeat analysis. *Transfus Med*, 2005; 15:481-485.
 - 28 Williamson, L. M., Stainsby, D., Jones, H., Love, E., Chapman, C. E., Navarrete, C., Lucas, G., Beatty, C., Casbard, A., Cohen, H. The impact of universal leukodepletion of the blood supply on haemovigilance reports of post-transfusion purpura and transfusion-associated graft-versus-host-disease. *Transfusion*, 2007; 47:1455-1467.
 - 29 Chapman, J., Finney, R. D., Forman, K., Kelsey, P., Knowles, S. M., Napier, J. A. F., Phillips, P., Mitchell, R., Murphy, M. F., Waterse, A. H., Wood, J. K., Williamson, L. M., Baglin, T., Coppstone, A., Dendy, P., Forman, K., Gibson, B., Knowles, S., Morgan, G., Norfolk, D., Richards, A., Todd, A., Warwick, R., Webb, D. Guidelines on gamma irradiation of blood components for the prevention of transfusion-associated

- graft-versus-host-disease. *Tranfus Medicine*, 1996; 6:261-271. Navarrete, C. V. Clinical relevance of the HLA system in blood transfusion. *Vox Sanguinis*, 2011; 101:93-105.
- 30 Caillat-Zucman, D. Molecular mechanisms of HLA-association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens*, 2009; 73(1): 1-8.
- 31 Mura, C., Ragueneas, O. & Ferec, C. HFE mutations analysis in 711 haemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of haemochromatosis. *Blood*, 1999; 93: 2502-2505.
- 32 Kuijpers, R. W., von dem Borne, A. E., Kiefel, V. et al. Leucine33-proline33 substitution in human platelet glycoprotein IIIa determines HLA-DRw52a(Dw24) association of the immune response against HPA-1a (Zwa/PIA1) and HPA-1b (ZwbPIA2). *Human Immunology*, 1992; 34, 253-256.
- 33 Mallal, S., Phillips, E., Carosi, G., Molina, J-M., Workman, C., Tomazic, J., Jagel-Guedes, E., Rugina, S., Kozyrez, O., Cid, J. F., Hay, P., Nolan, D., Hughes, S., Hughes, A., Ryan, S., Fitch, N., Thorborn, D., Benbow, A. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *NEJM*, 2008; 358:568-79. Profaizer, T. & Eckels, D. HLA alleles and drug hypersensitivity reactions. *Int J Immunogenet*, 2011; 39: 99-105.

Reacciones alérgicas asociadas a transfusión

ARMANDO CORTÉS BUELVAS*

Aunque la anafilaxia potencialmente mortal ocurre raras veces, las reacciones alérgicas se producen con mayor frecuencia. Los informes revelan que las reacciones alérgicas asociadas con la transfusión de plaquetas y glóbulos rojos tienen una tasa de incidencia de 3,7% y 0,15%, respectivamente; sin embargo, las tasas varían considerablemente, debido a diferencias en el uso de premedicación, las características de los pacientes, los métodos de fabricación del producto, el tiempo de almacenamiento, los tipos de reportes, las definiciones de la reacción y el estándar de seguimiento.¹ Así, las transfusiones de plaquetas están aparentemente más asociadas con reacciones alérgicas que los otros componentes; aunque no se sabe si estas diferencias se deben a la naturaleza de cada com-

* *Especialista en Anatomía Patológica y Patología Clínica. Profesor titular y Jefe del Departamento de Patología de la Universidad del Valle. Director del Hemocentro del Valle del Cauca. Director del Servicio de Transfusión del Hospital Universitario del Valle. Cali, Colombia. acortes59@gmail.com*

ponente o a factores del paciente, incluyendo la enfermedad de base y los antecedentes de transfusiones previas.

La reacción anafiláctica ocurre más comúnmente durante la transfusión de plasma o plaquetas, y tiene una incidencia de 1:20.000 a 1:50.000 transfusiones.^{2,3} De las muertes asociadas a transfusiones informadas a la FDA, de

2005 a 2009, 3% (seis pacientes) fueron causadas por anafilaxia.⁴

Mecanismos

La Tabla siguiente lista los mecanismos que pueden generar reacciones anafilactoides o anafilácticas a la transfusión. Los principales mecanismos son comentados a continuación.

Mecanismos posibles de las reacciones anafilactoides y anafilácticas a la transfusión
1. Anticuerpos IgA clase específicos preexistentes en pacientes con déficit de IgA.
2. Anticuerpos IgA subclase o alotipos específicos preexistentes en pacientes con niveles séricos de IgA normales.
3. Anticuerpos preexistentes contra formas polimórficas de otras proteínas séricas (IgG, albúmina, haptoglobina, alfa-1 antitripsina, transferrina, C3, C4, etc.) en pacientes con deficiencias de las mismas.
4. Transfusión de alérgenos contra los cuales el paciente está presensibilizado, como drogas (penicilina, aspirina) y químicos (formaldehído, óxido de etileno, azul de metileno, etc.).
5. Transferencia pasiva de anticuerpo IgE (a drogas o alimentos) en pacientes transfundidos.
6. Reacción anafilactoide o anafiláctica coincidental a drogas (ej. aspirina, anestésicos, relajantes musculares, etc.) alimentos u otras sustancias a las cuales el paciente está expuesto antes o durante la transfusión.
7. Reacción anafilactoide o anafiláctica coincidental en un paciente atópico.
8. Activación de mastocitos inducida por incremento de los niveles de anafilatoxinas C3a y C5a o por oligómeros de IgE anormales en el componente sanguíneo transfundido.
9. Anticuerpos HLA preexistentes.
10. Transfusión de componentes que tienen altos niveles de histamina.

Mecanismos dependientes de alérgenos

Los alérgenos que causan reacciones transfusionales alérgicas son las proteínas del plasma, como la IgA⁵ y la haptoglobina (Hp).⁶ No existen estimaciones fiables sobre la incidencia de las reacciones transfusionales alérgicas mediadas por estas proteínas. Es desconocido el número de pacientes con deficiencias de IgA o Hp y anticuerpos

específicos, pero que nunca son diagnosticados debido a la ausencia de los síntomas después de la transfusión.

Aunque la mayoría de las reacciones anafilácticas relacionadas con IgA se producen en personas que tienen deficiencia de IgA (IgA sérica < 0,5 mg/L) y tienen anticuerpos séricos IgA específicos detectables, hay pacientes con concentraciones séricas normales de IgA y subclases de anticuerpos

IgA específicos (IgA1 o IgA2) o alotipo [IgA2m (1) o IgA2m (2)] que han experimentado reacciones agudas graves a la transfusión sanguínea.⁵

Se deben interpretar con cuidado los informes sobre niveles plasmáticos de Hp; se conoce que pueden disminuir por debajo de los niveles detectables en ciertos estados patológicos, como hemólisis y disfunción hepática.⁷ En estos casos, es útil el diagnóstico de la deficiencia de Hp con ADN.⁸

Aunque es raro, se ha reportado choque anafiláctico después de las transfusiones en pacientes con déficit del complemento C4⁹ y déficit del factor de von Willebrand.¹⁰ Los inhibidores del factor IX en pacientes con hemofilia B en ocasiones inducen un choque anafiláctico después de transfusiones con factor IX.¹¹

También se ha informado que el azul de metileno, utilizado para la inactivación viral del plasma fresco congelado, puede causar choque anafiláctico después de la transfusión de plasma;^{12,13} sin embargo, el riesgo parece ser muy bajo.

Recientemente, se ha sugerido que se puede producir anafilaxia relacionada con la transfusión después de la transferencia pasiva de alérgenos de cacahuete en una persona sensibilizada.¹⁴ Esto es consistente con el hecho de que cantidades sustanciales de antígenos de los alimentos se absorben hacia la circulación sanguínea en una forma digerida, pero retiene un cierto tamaño molecular y antigenicidad.¹⁵ No se conoce la verdadera incidencia de esta reacción.

Aunque generalmente se detectan anticuerpos IgG tanto en la anafilaxia

mediada por IgA como Hp, también se han detectado anticuerpos IgE en varios estudios.^{6,16} La IgE, receptores para Fc epsilon de la célula cebada (FCeR), mastocitos y la histamina juegan un papel importante en la anafilaxia. La anafilaxia sistémica mediada por IgG implica a receptores para Fc gamma de la célula cebada (FCgRs), basófilos y factor activador plaquetario (PAF) como actores principales. En esta reacción, el PAF, más que la histamina, es el principal mediador químico que induce anafilaxis sistémica.¹⁷

Se han detectado anticuerpos IgG específicos de alérgenos en lugar de los anticuerpos IgE en individuos que manifiestan anafilaxia sistémica contra sustancias de uso médico, como la protamina, dextrano e IgG recombinante, incluyendo antifactor de necrosis tumoral alfa.¹⁸⁻²⁰

La falla de la acetilhidrolasa PAF para inactivar el PAF contribuyen a la gravedad de la anafilaxia.²¹ Además, se sabe que los basófilos, neutrófilos^{22,23} y monocitos²⁴ también desempeñan papeles críticos en la aparición de la anafilaxia. Sin embargo, no se ha determinado con certeza el papel de estas células, clases de anticuerpos y mediadores químicos en el sistema humano.

Mecanismos independientes de alérgenos

Un supuesto mecanismo alternativo relacionado con las reacciones alérgicas a la transfusión lo constituyen los modificadores de la respuesta biológica (MRB), tales como citoquinas inflamatorias y quimiocinas que se acumulan en los componentes de la sangre du-

rante el almacenamiento y se infunden junto con la sangre transfundida. En el sobrenadante de los concentrados plaquetarios almacenados se acumulan niveles sorprendentes de MRB durante el almacenamiento, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular, ligando CD40 soluble, histamina, factor transformante de crecimiento- β 1 y RANTES.²⁵⁻²⁸ La infusión de estas moléculas es en dosis clínicamente significativas y es probable que alteren las funciones inmunitarias del receptor. Aunque el papel de los MRB en la aparición de reacciones alérgicas sigue siendo desconocido, es posible que estas y otras sustancias induzcan o modulen las reacciones alérgicas.

Factores del paciente que no son alérgenos y anticuerpos

Se sabe que en los sueros de algunos pacientes con urticaria crónica idiopática se detecta una actividad de liberación de histamina (ARH); una actividad similar capaz de inducir un flujo de Ca^{2+} en las células cebadas cultivadas (CaIA), se ha observado en los sueros pretransfusión de los pacientes con reacciones transfusionales.

Estos hallazgos sugieren que CaIA puede ser atribuida a reacciones adversas, en particular manifestaciones parecidas a la urticaria,²⁹ debido a que se conoce que un influjo de calcio precede a la liberación de histamina a partir de mastocitos,³⁰ postulándose que una muestra de suero con actividad CAIA potencialmente induce la liberación de histamina, aunque en pequeñas cantidades, y que los mastocitos pueden ser preactivados a un cierto grado, lo cual

genera una tendencia a la degranulación cuando se transfunde un componente sanguíneo alérgico.

Otra situación que demuestra la incidencia de factores propios del paciente es el caso de una reacción potencialmente mortal asociada a hipotensión producida después de la transfusión de plasma fresco congelado que contenía isoanticuerpos CD36 (Nak).³¹ Estos anticuerpos CD36 mostraron capacidad de activación plaquetaria mediada por FccRIIa, y, curiosamente, las plaquetas de personas sanas muestran un grado considerable de heterogeneidad en su capacidad de respuesta a este plasma. Los niveles de expresión en la superficie de las plaquetas de CD36 y FccRIIa y su grado de unión a estos anticuerpos se asociaron aparentemente con las grandes diferencias en la capacidad de respuesta de las plaquetas a este plasma.³²

Transferencia pasiva de anticuerpos y sensibilización pasiva

La transferencia pasiva de anticuerpos IgA puede no provocar una reacción transfusional.³³ Hasta la fecha no hay informes sobre los efectos de la transferencia pasiva de anticuerpos Hp. Por lo tanto, el riesgo de reacción alérgica tipo inmediato, provocada por la transfusión pasiva de anticuerpos contra proteínas del plasma, parece ser muy bajo.

Cuando los anticuerpos IgE contra ciertos alérgenos, por lo general alimentos, alérgenos inhalados o drogas, se infunden en un paciente como parte de una transfusión, las células cebadas y los basófilos del paciente capturan los anticuerpos IgE infundidos mediante

los FceRs expresados en las superficies de estas células. Las reacciones alérgicas ocurren después de que el paciente ingiere o inhala estos alérgenos.

Un estudio encontró que el 23% de los donantes tienen niveles significativos de anticuerpos IgE contra alérgenos comunes.³⁴ Por consiguiente, el riesgo de sensibilización pasiva por transfusión de sangre y plasma probablemente no es bajo.

En un estudio *in vivo* se transfundieron pacientes con dos unidades (cada una de aproximadamente 300 ml) seleccionadas con concentraciones conocidas de anticuerpos IgE contra un polen de hierba (8-205 unidades de antígeno/kilo (kUA)/l).³⁵ La IgE transfundida con el plasma se podía detectar en la circulación de los receptores a las tres horas de la transfusión, la vida media de la IgE fue de 1 a 13 días. La sensibilización de los basófilos fue evidente a las tres horas, y se incrementó rápidamente a un pico después de 3 a 4 días, y luego disminuyó durante días o semanas. Esto indica que los anticuerpos IgE a ciertos alérgenos pueden sensibilizar a los basófilos de los pacientes.

También se han reportado casos reales de sensibilización pasiva, y se tiene información sobre una urticaria generalizada en un receptor que recibió cefalotina dos días después de una transfusión de sangre de cuatro donantes. Uno de estos donantes era alérgico a la cefalotina y había desarrollado anticuerpos contra este antibiótico. Los anticuerpos contra cefalotina fueron identificados en la sangre del receptor después de la transfusión, pero no antes de la transfusión.³⁶ Se ha reportado también un caso de transferencia pasiva de alergia

a las nueces después de la transfusión de plasma fresco congelado.³⁷

Pruebas de laboratorio

Las reacciones transfusionales alérgicas generalmente se diagnostican sobre la base de los síntomas y su tiempo de inicio (inmediato o después de la transfusión). Las pruebas para la deficiencia de proteína del plasma y los anticuerpos no siempre se llevan a cabo. Incluso si se realizan estas pruebas, suelen ser negativas. Por lo tanto, en muchos casos de reacción alérgica no hay pruebas que determinen su verdadera naturaleza alérgica y la causalidad de la transfusión. Es recomendable que se examinen primero los niveles de proteína plasmática y anticuerpos tanto IgG como IgE contra las proteínas plasmáticas IgA y Hp. Existen pruebas comerciales para la detección de la deficiencia de IgA y anticuerpos IgA.³⁸

Es posible examinar con dos pruebas, incluso sin la identificación de los alérgenos y anticuerpos, si los productos sanguíneos para transfusión fueron causantes y si la reacción presentada es de naturaleza alérgica.

La triptasa es la más abundante proteína serina derivada de los gránulos secretorios contenidos en los mastocitos. Los niveles de triptasa elevados en suero, plasma y otros fluidos biológicos son consistentes con la activación de mastocitos en la anafilaxia sistémica y otras reacciones alérgicas de hipersensibilidad inmediata.³⁹ La prueba de la triptasa es útil en el diagnóstico de reacciones alérgicas a la transfusión.⁴⁰ Sin embargo, tiene un par de inconvenientes. En primer lugar, a menudo es

difícil obtener una muestra de suero de un paciente para una prueba de triptasa debido a su vida media muy corta, sólo dos horas después de su liberación en la circulación.⁴¹ En segundo lugar, sólo una pequeña cantidad de triptasa es producida por los basófilos, el otro mediador de las reacciones alérgicas.^{42,43}

En contraste, la prueba de activación de basófilos (PAB) no tiene restricciones en cuanto al momento para la recolección de la muestra del paciente y evalúa la activación de basófilos. En esta prueba, la muestra de sangre completa de un paciente se incuba con un alérgeno. Posteriormente, la activación de basófilos se evalúa mediante citometría de flujo sobre la base de la regulación de los marcadores de desgranulación/activación de células, CD63 o CD203c.⁴⁴ Estos datos sugieren que la PAB es una herramienta útil para examinar las reacciones transfusionales alérgicas. Sin embargo, se requieren estudios a mayor escala para hacer una evaluación final de la utilidad de la PAB.

Prevención

Medicamentos pretransfusión

El acetaminofen y la difenhidramina son ampliamente utilizados como medicamentos pretransfusión para prevenir las reacciones transfusionales, a pesar de la falta de pruebas con respecto a sus efectos preventivos. Un estudio grande prospectivo, aleatorizado, doble ciego controlado compara el uso de acetaminofén y difenhidramina como medicamentos pretransfusión para prevenir reacciones transfusiona-

les contra un placebo.⁴⁵ Se incluyeron 315 pacientes con patología hemato/oncológica. La frecuencia de las reacciones en pacientes que recibieron el fármaco activo (1.44/100 transfusiones) y (1.51/100 transfusiones) en los pacientes que recibieron el placebo. La mayoría de estas reacciones fueron de naturaleza urticarial y se produjo en la misma proporción entre los dos grupos. No obstante, hubo una limitación para este estudio: no se supo si la difenhidramina es útil para la prevención de reacciones recurrentes porque fueron excluidos los pacientes con historia de reacciones alérgicas.

Otro estudio retrospectivo con 7.900 transfusiones administradas a 385 pacientes pediátricos con cáncer o que requirieron trasplante de células madres hematopoyéticas, mostró una incidencia de reacciones alérgicas de 0,75%. Las reacciones alérgicas se presentaron en 0,9% de las transfusiones en los pacientes que se les administró difenhidramina en comparación con 0,56% en aquellos pacientes que no se les administró el medicamento.⁴⁶

Estos dos informes apoyan la práctica común de la medicación previa a la transfusión, en especial para los pacientes transfundidos crónicamente. Un inconveniente es que la difenhidramina puede no ser suficiente para evitar reacciones alérgicas. Sin embargo, esta hipótesis no se ha confirmado, como tampoco el efecto de los esteroides.

Plaquetas plasma-reducidas (o concentradas) y plaquetas lavadas

Aunque aún se desconoce si las reacciones alérgicas después de las transfu-

siones de plaquetas son causadas por proteínas del plasma y sus anticuerpos o asociadas a MRB, se ha observado que la disminución de las cantidades de plasma reduce el riesgo de reacciones alérgicas. La disminución de la cantidad de plasma en preparaciones plaquetarias se puede conseguir de tres maneras:

1. Plaquetas obtenidas a partir de varias capas leucocitarias, que se reúnen y se suplementan con una solución distinta al plasma. Lo que disminuye el contenido de plasma residual a 30%-40 % del volumen total (plaquetas reducidas de plasma).
2. Plaquetas obtenidas por aféresis, en la cual se preparan plaquetas altamente concentradas mediante máquinas como Trima Accel⁴⁷ o Amicus⁴⁸ con (plaquetas reducidas de plasma) o sin (plaquetas concentradas) la adición de una solución suplementaria.
3. Plaquetas agrupadas y obtenidas por aféresis con eliminación de tanto plasma como sea posible, por medio de centrifugación o de un procesador de células, como el Cobe 2991, después de lo cual las plaquetas se resuspenden en una solución complementaria (plaquetas lavadas). Con el uso de estos métodos, el plasma residual es por lo general < 10%.

La recuperación de plaquetas después del lavado es 80%-95% de las plaquetas sin lavar, y el incremento del conteo corregido (ICC) es ligeramente menor con plaquetas lavadas que sin lavar. Las plaquetas se activan, y esta activación plaquetaria puede llevar a la sobrerregulación de CD62, lo que resul-

ta en acortamiento de la supervivencia *in vivo*, y aumenta la liberación de las MRB de las plaquetas, lo cual puede causar reacciones adversas. Se han desarrollado soluciones aditivas que atenúan la activación plaquetaria. La adición de iones de magnesio y de potasio a las soluciones aditivas comerciales PASII y PASIII previene completamente la activación plaquetaria, como se evidencia al comparar los niveles de expresión de CD62P, la liberación MRB, el consumo de glucosa y la producción de lactato.⁴⁹⁻⁵¹ Además, M-sol, que contiene iones de magnesio y de potasio, atenúa los efectos en la activación plaquetaria.⁵² Al menos un estudio clínico con plaquetas lavadas resuspendidas en M-sol muestra una reducción de los efectos adversos.⁵³ Se requieren evaluaciones detalladas de cada solución de aditivos antes de hacer conclusiones definitivas.

Los concentrados obtenidos por aféresis (con remoción del 73% del plasma donado, con 100 ml de plasma para resuspender las plaquetas) reducen el riesgo de reacción alérgica en 2/3 (de 5,5% a 1,7%), mientras las plaquetas lavadas obtenidas por aféresis (remueven el 95% del plasma donado) reducen el riesgo de alergia más de 2/3 (a 0,5%).⁵⁴

En un período de diez años en el servicio de oncología de Johns Hopkins, una minoría (30%) de los receptores de transfusiones de plaquetas son responsable de la mayoría (62,1%) de las reacciones alérgicas a plaquetas, lo cual hace pensar que están más asociadas a factores propios del paciente, que a los atribuibles al producto.⁵⁵

Transfusiones a pacientes deficientes en IgA o Hp

Las transfusiones de pacientes deficientes en IgA y Hp requieren una atención especial. El PFC debe ser libre de IgA o Hp. Los centros de sangre deben tamizar para identificar donantes deficientes en IgA y Hp y disponer de preparados para los pacientes deficientes en IgA y Hp. Los donantes deficientes son registrados únicamente para donaciones de PFC. Las plaquetas y glóbulos rojos libres de IgA o Hp se suministran normalmente como componentes lavados a pacientes con deficiencia. Los glóbulos rojos se pueden lavar hasta tres veces para eliminar la mayor cantidad de plasma como sea posible, sin embargo, es difícil llevar a cabo el mismo procedimiento con plaquetas. En estos casos, las plaquetas se pueden obtener de donantes registrados.

Inducción de la tolerancia inmune en pacientes con deficiencia de IgA con reacciones anafilácticas IgA

La inmunodeficiencia variable común (CVID) implica bajos niveles de la mayoría o la totalidad de las clases de inmunoglobulinas, una falta de linfocitos B o células plasmáticas. Los pacientes con CVID frecuentemente desarrollan anticuerpos IgA que pueden inducir anafilaxia después de que se administran preparados de inmunoglobulina intravenosa (IgIV) o transfusiones de sangre. Estos pacientes desarrollan tolerancia a la IgA mediante la infusión de preparaciones de IgIV – reducidas en IgA que contienen pequeñas cantidades de IgA, hasta que la actividad de

anticuerpos IgA se disminuye significativamente o no se detecta.⁵⁶

La explicación más aceptada es que las moléculas de IgA residuales infundidas en las preparaciones de IgIV bloquean los anticuerpos IgA y que las IgIV en dosis altas inhibe la producción de anticuerpos IgA.

Tratamiento

Aunque los medicamentos pretransfusión no son eficaces, la mayoría de las reacciones transfusionales son fácilmente tratadas.^{1,57} Cuando se produce urticaria, se puede administrar difenhidramina. Las reacciones urticariales graves requieren tratamiento con metilprednisolona o prednisona. Una vez que se desarrolla una reacción grave o anafilaxia, se debe tomar una acción inmediata para mantener los niveles de oxigenación y estabilizar la hipotensión. La epinefrina se administra por vía intramuscular o por vía subcutánea. Si el paciente está inconsciente o en estado de choque, la epinefrina se administra por vía intravenosa. Si hay broncoespasmo, requiere la adición de un agonista beta II o aminofilina. Los pacientes refractarios, que no responden debido a bloqueantes beta-adrenérgicos o a un inhibidor de ECA, pueden responder a la administración de glucagón IV o por infusión continua.⁵⁸

Conclusiones

La causa de la reacción alérgica no es específica, y la relación causal entre la reacción y la transfusión sigue siendo oscura en muchos casos, aunque esto no suele ser un problema debido a que

la mayoría de las reacciones alérgicas son autolimitadas y responden bien al tratamiento. Sin embargo, en casos muy graves, la etiopatología necesita ser determinada para prevenir estas reacciones en las próximas transfusiones. En los casos recurrentes, las reacciones alérgicas son generalmente evitables mediante el uso de plaquetas y glóbulos rojos lavados. No obstante, es menester tratar de identificar el mecanismo exacto de la reacción para que su prevención se base en el mecanismo subyacente. Esto en definitiva lleva al desarrollo de nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de las reacciones alérgicas.

Referencias

1. Geiger, T. L., Howard, S. C. Acetaminophen and diphenhydramine premedication for allergic and febrile nonhemolytic transfusion reactions: good prophylaxis or bad practice? *Transfus Medicine Reviews*, 2007; 21:1-12.
2. Domen, R. E., Hoeltge, G. A. Allergic Transfusion Reactions. An Evaluation of 273 Consecutive Reactions. *Arch Pathol Lab Med.*, 2003; 127:316-320.
3. Stainsby, D., Jones, H., Asher, D., Atterbury, C., Boncinelli, A., Brant, L., Chapman, C. E. et al. Serious hazards of transfusion: a decade of hemovigilance in the UK. *Transfus Med Rev.*, 2006; 20(4):273-82.
4. Fatalities Reported to FDA Following Blood Collection and Transfusion: Annual Summary for Fiscal Year 2010. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/UCM254860.pdf>
5. Sandler, S. G., Mallory, D., Malamut, D., Eckrich, R. IgA anaphylactic transfusion reactions. *Transfusion Medicine Reviews*, 1995; 9:1-8.
6. Shimada, E., Tadokoro, K., Watanabe, Y., Ikeda, K., Niihara, H., Maeda, I. et al. Anaphylactic transfusion reactions in haptoglobin-deficient patients with IgE and IgG haptoglobin antibodies. *Transfusion*, 2002; 42:766-773.
7. Rougemont, A., Quilici, M., Delmont, J., Ardisson, J. P. Is the HpO phenomenon in tropical populations really genetic? *Human Heredity*, 1980; 30: 201-213.
8. Koda, Y., Watanabe, Y., Soejima, M., Shimada, E., Nishimura, M., Morishita, K. et al. Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anaphylactic patients with anti-haptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood*, 2000; 95:1138-1143.
9. Westhoff, C. M., Sipherd, B. D., Wylie, D. E., Toalson, L. D. Severe anaphylactic reactions following transfusions of platelets to a patient with anti-Ch. *Transfusion*, 1992; 32:576-579.
10. Bergamaschini, L., Mannucci, P. M., Federici, A. B., Coppola, R., Guzzoni, S., Agostoni, A. Posttransfusion anaphylactic reactions in a patient with severe von Willebrand disease: role of complement and alloantibodies to von Willebrand factor. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1995; 125: 348-355.
11. Warrier, I., Lusher, J. M. Development of anaphylactic shock in haemophilia B patients with inhibitors. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1998; 9: (Suppl. 1) S125-S128.
12. Dewachter, P., Castro, S., Nicaise-Roland, P., Chollet-Martin, S., Le Beller, C., Lillou-Louet, A., Mouton-Faivre, C. Anaphylactic reaction after methylene blue-treated plasma transfusion. *British Journal of Anaesthesia*, 2011; 106: 687-689.
13. Nubret, K., Delhoume, M., Orsel, I., Laudy, J. S., Sellami, M., Nathan, N. Anaphylactic shock to fresh-frozen plasma inactivated with methylene blue. *Transfusion*, 2011; 51:125-128.
14. Jacobs, J. F., Baumert, J. L., Brons, P. P., Joosten, I., Koppelman, S. J., van Pampus, E. C. Anaphylaxis from passive transfer of peanut allergen in a blood product. *New England Journal of Medicine*, 2011; 364:1981-1982.
15. Untermayr, E., Jensen-Jarolim, E. The role of protein digestibility and antacids on food

- allergy outcomes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2008; 121:1301-1308.
16. Burks, A. W., Sampson, H. A., Buckley, R. H. Anaphylactic reactions after gamma globulin administration in patients with hypogammaglobulinemia. Detection of IgE antibodies to IgA. *New England Journal of Medicine*, 1986; 314:560-564.
 17. Tsujimura, Y., Obata, K., Mukai, K., Shindou, H., Yoshida, M., Nishikado, H. et al. Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity*, 2008; 28: 81-89.
 18. Kraft, D., Hedin, H., Richter, W., Scheiner, O., Rumpold, H., Devey, M. E. Immuno globulin class and subclass distribution of dextran-reactive antibodies in human reactors and non reactors to clinical dextran. *Allergy*, 1982; 37: 481-489.
 19. Adourian, U., Champaine, E. L., Hirshman, C. A., Fuchs, E., Adkinson, N. F. Jr. High-titer protamine-specific IgG antibody associated with anaphylaxis: report of a case and quantitative analysis of antibody in vasectomized men. *Anesthesiology*, 1993; 78: 368-372.
 20. Cheifetz, A., Smedley, M., Martin, S., Reiter, M., Leone, G., Mayer, L., Plevy, S. The incidence and management of infusion reactions to infliximab: a large center experience. *American Journal of Gastroenterology*, 2003; 98: 1315-1324.
 21. Vadas, P., Gold, M., Perelman, B., Liss, G. M., Lack, G., Blyth, T. et al. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *New England Journal of Medicine*, 2008; 358: 28-35.
 22. Jönsson, F., Mancardi, D. A., Kita, Y., Karasuyama, H., Iannascoli, B., VanRooijen, N. et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest*, 2011; 121: 1484-1496.
 23. Jönsson, F., Mancardi, D. A., Zhao, W., Kita, Y., Iannascoli, B., Khun, H., et al. Human FccRIIA induces anaphylactic and allergic reactions. *Blood*, 2012; 119: 2533-3544.
 24. Strait, R.T., Morris S.C., Yang, M., Qu, X.W., Finkelman, F.D. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol*, 2002; 109:658-668.
 25. Edvardsen, L., Taaning, E., Mynster, T., Hvolris, J., Drachman, O., Nielsen, H. J. Bioactive substances in buffy-coat-derived platelet pools stored in platelet-additive solutions. *British Journal of Haematology*, 1998; 10:445-448.
 26. Phipps, R. P., Kaufman, J., Blumberg, N. Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet*, 2001; 357:2023-2024.
 27. Wakamoto, S., Fujihara, M., Kuzuma, K., Sato, S., Kato, T., Naohara, T. et al. Biologic activity of RANTES in apheresis PLT concentrates and its involvement in nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion*, 2003; 43:1038-1046.
 28. Garraud, O., Hamzeh-Cognasse, H., Cognasse, F. Platelets and cytokines: how and why? *Transfusion Clinique et Biologique*, 2012; 19 (3): 104-108,
 29. Azuma, H., Yamaguchi, M., Takahashi, D., Fujihara, M., Sato, S., Kato, T., Ikeda, H. Elevated Ca²⁺ influx-inducing activity toward mast cells in pretransfusion sera from patients who developed transfusion-related adverse reactions. *Transfusion*, 2009; 49:1754-1761
 30. Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M., Kurosaki, T. Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nature Immunology*, 2008; 9:81-88.
 31. Morishita, K., Wakamoto, S., Miyazaki, T., Sato, S., Fujihara, M., Kaneko, S. et al. Life-threatening adverse reaction followed by thrombocytopenia after passive transfusion of fresh frozen plasma containing anti-CD36 (Nak) isoantibody. *Transfusion*, 2005; 45:803-806.
 32. Wakamoto, S., Fujihara, M., Urushibara, N., Morishita, K., Kaneko, S., Yasuda, H. et al. Heterogeneity of platelet responsiveness to anti-CD36 in plasma associated with adverse transfusion reactions. *Vox Sanguinis*, 2005; 88:4151.
 33. Winters, J. L., Moore, S. B., Sandness, C., Miller, D. V. Transfusion of apheresis PLTs from IgA-deficient donors with anti-IgA is not associated with an increase in transfusion reactions. *Transfusion*, 2004; 44:382-385.

34. Johansson, S. G., Nopp, A., Florvaag, E., Lundahl, J., Soderstrom, T., Guttormsen, A. B. et al. High prevalence of IgE antibodies among blood donors in Sweden and Norway. *Allergy*, 2005; 60:1312-1315.
35. Johansson, S. G., Nopp, A., van Hage, M., Olofsson, N., Lundahl, J., Wehlin, L. et al. Passive IgE-sensitization by blood transfusion. *Allergy*, 2005; 60:1192-1199.
36. Branch, D. R., Gifford, H. Allergic reaction to transfused cephalothin antibody. *Journal of American Medical Association*, 1979; 241:495-496.
37. Arnold, D. M., Blajchman, M. A., Ditomasso, J., Kulczycki, M., Keith, P. K. Passive transfer of peanut hypersensitivity by fresh frozen plasma. *Archives of Internal Medicine*, 2007; 167:853-854.
38. Palmer, D. S., O'Toole, J., Montreuil, T., Scalia, V., Goldman, M. Evaluation of particle gel immunoassays for the detection of severe immunoglobulin A deficiency and anti-human immunoglobulin A antibodies. *Transfusion*, 2012; 52:1792-1798.
39. Schwartz, L. B., Sakai, K., Bradford, T. R., Ren, S., Zweiman, B., Worobec, A. S., Metcalfe, D. D. The alpha form of human tryptase is the predominant type present in blood at baseline in normal subjects and is elevated in those with systemic mastocytosis. *Journal of Clinical Investigation*, 1995; 96:2702-2710.
40. Hirayama, F. Recent advances in laboratory assays for nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion*, 2010; 50:252-263.
41. Schwartz, L. B. Tryptase from human mast cells: biochemistry, biology and clinical utility. *Monographs in Allergy*, 1990; 27:90-113.
42. Castells, M. C., Irani, A. M., Schwartz, L. B. Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. *Journal of Immunology*, 1987; 138:2184-2189.
43. Foster, B., Schwartz, L. B., Devouassoux, G., Metcalfe, D. D., Prussin, C. Characterization of mast-cell tryptase-expressing peripheral blood cells as basophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2002; 109:287-293.
44. Boumiza, R., Debard, A. L., Monneret, G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clinical and Molecular Allergy*, 2005; 3:9.
45. Kennedy, L. D., Case, L. D., Hurd, D. D., Cruz, J. M., Pomper, G. J. A prospective, randomized, double-blind controlled trial of acetaminophen and diphenhydramine pretransfusion medication versus placebo for the prevention of transfusion reactions. *Transfusion*, 2008; 48:2285-2291.
46. Sanders, R. P., Maddirala, S. D., Geiger, T. L., Pounds, S., Sandlund, J. T., Ribeiro, R. C. et al. Premedication with acetaminophen or diphenhydramine for transfusion with leuco-reduced blood products in children. *British Journal of Haematology*, 2005; 130:781-787.
47. Daskalakis, M., Schulz-Huotari, C., Burger, M., Klink, I., Umhau, M. Evaluation of the performance of Trima Accel[®] v5.2 for the collection of concentrated high-dose platelet products and concurrent plasma from high platelet count donors, in Germany. *Journal of Clinical Apheresis*, 2012; 27:75-80.
48. Vassallo, R. R., Adamson, J. W., Gottschall, J. L., Snyder, E. L., Lee, W., Houghton, J., Elfath, M. D. In vitro and in vivo evaluation of apheresis platelets stored for 5 days in 65% platelet additive solution/35% plasma. *Transfusion*, 2010; 50:2376-2385.
49. De Wildt-Eggen, J., Schrijver, J. G., Bins, M., Gulliksson, H. Storage of platelets in additive solutions: effects of magnesium and/or potassium. *Transfusion*, 2002; 42:76-80.
50. Gulliksson, H., AuBuchon, J. P., Cardigan, R., van der Meer, P. F., Murphy, S., Prowse, C., Richter, E. et al. Storage of platelets in additive solutions: a multicentre study of the in vitro effects of potassium and magnesium. *Vox Sanguinis*, 2003; 85:199-205.
51. Shanwell, A., Falker, C., Gulliksson, H. Storage of platelets in additive solutions: the effects of magnesium and potassium on the release of RANTES, beta-thromboglobulin, platelet factor 4 and interleukin-7, during storage. *Vox Sanguinis*, 2003; 85:206-212.
52. Hirayama, J., Azuma, H., Fujihara, M., Homma, C., Yamamoto, S., Ikeda, H. Storage of platelets in a novel additive solution (M-sol), which is prepared by mixing solutions approved for clinical use that are not especially for platelet storage. *Transfusion*, 2007; 47:960-965.

53. Azuma, H., Hirayama, J., Akino, M., Miura, R., Kiyama, Y., Imai, K. et al. Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol). *Transfusion*, 2009; 49:214- 218.
54. Tobian, A. A., Savage, W. J., Tisch, D. J., Thoman, S., King, K. E., Ness, P. M. Prevention of allergic transfusion reactions to platelets and red blood cells through plasma reduction. *Transfusion*, 2011; 51:1676-1683.
55. Savage, W. J., Tobian, A. A., Fuller, A. K., Wood, R. A., King, K. E., Ness, P. M. Allergic transfusion reactions to platelets are associated more with recipient and donor factors than with product attributes. *Transfusion*, 2011 Aug; 51(8):1716-22.
56. Ahrens, N., Höflich, C., Bombard, S., Lochs, H., Kiesewetter, H., Salama, A. Immune tolerance induction in patients with IgA anaphylactoid reactions following long-term intravenous IgG treatment. *Clinical and Experimental Immunology*, 2007; 151:455-458.
57. Roback, J. D., Grossman, B. J., Harris, T., Hillyer, C. D. (eds.) *Technical Manual*, 2011; pp. 744. American Association of Blood Banks, Bethesda.
58. Hennino, A., Bérard, F., Guillot, I., Saad, N., Rozières, A., Nicolas, J. F. Pathophysiology of urticaria. *Clin Rev Allergy Immunol.*, 2006 Feb; 30(1):3-11.

Púrpura postransfusional (PPT)

CARMEN CANALS SURÍS*
EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ**

Presentación clínica y diagnóstico

La PPT es una complicación inmunohematológica poco frecuente caracterizada por la aparición de una trombocitopenia grave (plaquetas $<10.000/\mu\text{L}$ en el 80% de los casos) con frecuencia acompañada de diátesis hemorrágica, que ocurre entre cinco y doce días después de una transfusión de componentes sanguíneos, y que está inducida por anticuerpos antiplaquetarios específicos.

En el primer ejemplo comunicado de PPT,¹ en 1959, se detectó un anticuerpo antiplaquetario específico al que se denominó anti-Zw^a, pero no fue hasta más adelante que se reconoció que este anticuerpo era el causante de

* *Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. ccanals@bst.cat*

** *Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. emuniz@bst.cat*

la trombocitopenia. En 1961, Shulman² describió el caso de dos mujeres que desarrollaron una púrpura generalizada por trombocitopenia grave entre seis y siete días después de una transfusión; en ambos casos se describió la presencia de un anticuerpo antiplaquetario específico denominado Pl^{A1} , que más tarde se demostró que era idéntico al Zw^a . Los investigadores postularon que estas dos pacientes se habían inmunizado frente al antígeno Pl^{A1} durante una gestación previa, y que una transfusión de plaquetas Pl^{A1} positivo había estimulado una respuesta anamnésica. El mecanismo por el cual las plaquetas del propio paciente, Pl^{A1} negativo, habían sido destruidas no quedaba claro, y todavía hoy sigue siendo motivo de discusión. Los autores sugirieron que los antígenos Pl^{A1} permanecerían en la circulación hasta una semana después de la transfusión, interaccionando de alguna manera con los correspondientes anticuerpos e induciendo, finalmente, la destrucción no específica de las plaquetas del propio paciente. Los antígenos plaquetarios específicos Zw^a/Pl^{A1} se denominan HPA-1a.³

Desde su descripción inicial se han comunicado varios centenares de casos de PPT. Durante los primeros cinco años de funcionamiento del programa de Hemovigilancia inglés (SHOT - *Severe Hazards of Transfusion*) se registraron dos muertes relacionadas con casos de PPT. En este registro, la incidencia de PPT disminuyó desde una media de diez casos al año durante los primeros años del programa, a tres casos anuales durante 1999 y 2000. La disminución de la incidencia de PPT coincidió con la implementación de

la leucorreducción universal, y los autores lo atribuyeron a la disminución de la cantidad de plaquetas presentes en los concentrados de hematíes. En Holanda, la introducción de la leucorreducción universal también mermó mucho la incidencia de PPT. De una incidencia de diez casos al año, han pasado a diagnosticarla muy raramente, del orden de un caso cada dos años. La incidencia de la PPT no es bien conocida, pero se estima que el riesgo de esta complicación puede oscilar entre un caso cada 40.000 a 300.000 componentes sanguíneos.

Los casos típicos de PPT se observan en mujeres de mediana edad (media de 57 años, rango de 21 a 80 años), aunque también se han observado algunos casos en hombres. Salvo raras excepciones, todos los casos tienen historia de aloinmunización frente a antígenos plaquetarios específicos (HPA) inducidos por gestación o por transfusiones.

Prácticamente todos los componentes sanguíneos desencadenan esta complicación. Se han descrito casos de PPT relacionados con transfusión de sangre total, concentrados de hematíes, plaquetas o plasma.

El inicio del cuadro clínico es súbito, con una caída rápida de la cifra de plaquetas, con recuentos inferiores a 10.000 plaquetas/ μ L, junto a la aparición de manifestaciones hemorrágicas que oscilan desde petequias generalizadas hasta cualquier tipo de sangrado: digestivo, del tracto urinario e incluso hemorragia cerebral. Sin tratamiento, la evolución es variable, puede autolimitarse en unos días o persistir durante varios meses. Sin embargo, las complicaciones hemorrágicas son graves, y la

mortalidad alcanza un 5% a un 10% de casos, aun a pesar de instaurar un tratamiento adecuado.⁴ En la mayoría de casos, la transfusión desencadenante de la PPT induce una reacción febril debida a la presencia en el paciente de anticuerpos anti-HLA adquiridos por inmunizaciones previas. En general, los restantes parámetros biológicos están dentro de la normalidad, incluyendo las pruebas de coagulación. No obstante, en casos excepcionales, la PPT evoluciona hacia trastornos de coagulación. Si se realiza un estudio medular, se observa presencia de megacariocitos normales y hasta aumentados en la médula ósea.

El diagnóstico diferencial debe incluir otras causas de trombocitopenia,

preferentemente las causadas por mecanismos inmunes, como una púrpura trombocitopénica autoinmune (PTI), una trombocitopenia inducida por fármacos (en especial es importante descartar la trombocitopenia por heparina) o una trombocitopenia aloinmune pasiva, o las trombocitopenias causadas por hiperconsumo (sepsis, coagulación intravascular diseminada-CID, púrpura trombótica trombocitopénica-PTT).⁵⁻⁶ Finalmente, ante una trombocitopenia aislada, en este caso sin diátesis hemorrágica acompañante, debe tenerse en consideración también una posible pseudotrombocitopenia EDTA-dependiente. En la Tabla 1 se presenta el diagnóstico diferencial de la PPT.

Tabla 1. Diagnóstico diferencial de la PPT

Púrpura trombocitopénica autoinmune (PTI)
Trombocitopenia inducida por fármacos
Trombocitopenia por heparina
Trombocitopenia aloinmune pasiva (TAP)
Hiperconsumo (Sepsis, CID, PTT)
Insuficiencia medular
Pseudotrombocitopenia EDTA-dependiente (ausencia de diátesis)
CID: Coagulación Intravascular Diseminada; PTT: Púrpura Trombótica Trombocitopénica

La confirmación del diagnóstico de PPT se basa en la demostración de aloanticuerpos antiplaquetarios específicos en el suero del paciente. En un 80% a 90% de los casos se detectan aloanticuerpos anti-HPA-1a en pacientes HPA-1a negativo. Otras especificidades detectadas son: HPA-1b, HPA-3a, HPA-3b, HPA-4a, HPA-5a, HPA-5b, HPA-15a, HPA-15b y Naka. Recientemente se ha publicado el primer caso

documentado de PPT por un anticuerpo anti-HPA-5b en un hombre aloinmunizado por transfusiones previas que desarrolló una PPT tras la transfusión de varios componentes sanguíneos.⁷ Ocasionalmente están presentes dos o más aloanticuerpos. Se detectan también con frecuencia anticuerpos anti-HLA que no están implicados en la patogenia de esta complicación. Es interesante remarcar que en algunas cir-

cunstancias el anticuerpo anti-HPA no es detectable con algunas de las técnicas empleadas en el diagnóstico, como en un caso reportado de PPT por anti-HPA-3a, que fue detectable únicamente mediante técnicas de inmunofluorescencia.⁸ Las técnicas que conllevan la solubilización de las glicoproteínas de membrana (ELISA o MAIPA) pueden alterar la conformación de algunos epítomos y producir resultados falsos negativos en la investigación de aloanticuerpos antiplaquetarios.

Mecanismo patogénico

El mecanismo patogénico de la PPT sigue sin estar completamente esclarecido. No se conoce la razón que justifica la destrucción de las plaquetas del paciente. Habitualmente, las plaquetas autólogas del receptor son HPA-1a negativo y, por esta razón, no son capaces de actuar como diana para los anticuerpos anti-HPA-1a. A lo largo de los años se han postulado diferentes teorías para explicar esta situación paradójica. Entre los potenciales mecanismos patogénicos propuestos, los cuatro más aceptados son:

1. El antígeno HPA-1a se encuentra en forma soluble en el plasma de todos los componentes sanguíneos, por lo que puede ser adsorbido por las plaquetas HPA-1a negativo del receptor, transformándolas en diana para el correspondiente anticuerpo (Figura 1). A favor de este mecanismo patogénico decimos que en algunos casos ha sido eluido el anticuerpo anti-HPA-1a de las plaquetas del receptor. Además, la posible adsorción de antígenos plaqueta-

rios solubles presentes en el plasma del donante es un fenómeno que ha sido demostrado.

2. El antígeno HPA-1a soluble puede interactuar con el anticuerpo correspondiente y formar inmunocomplejos que, secundariamente, se fijan a las plaquetas del paciente a través de los receptores Fc induciendo su destrucción (Figura 2). Una posible explicación para la adherencia de los inmunocomplejos a las plaquetas en la PPT implica la interacción de glicoproteínas (GPs) de la membrana plaquetar. En casi todos los casos de PPT, el antígeno plaquetario implicado está localizado en la GP IIb o en la IIIa. La GPIIb y la GPIIIa se asocian de forma natural para formar el complejo IIb/IIIa; de hecho, en condiciones experimentales, estas GPs pueden mantenerse aisladas únicamente en ausencia de Ca^{2+} . Es posible que fragmentos de plaquetas HPA-1a positivo que contengan GPIIb/IIIa se adhieran a complejos GPIIb/IIIa de las plaquetas intactas HPA-1a negativo. Cuando fragmentos plaquetarios HPA-1a positivo están ligados al anticuerpo correspondiente, la adherencia de estos inmunocomplejos a la plaqueta del paciente induce su destrucción por el sistema mononuclear-fagocítico. Esta hipótesis se refuerza por la observación de que en pacientes con enfermedad de Glanzmann, que presentan un déficit de GPIIb-IIIa, y que son portadores de anticuerpos frente a determinantes antigénicos de esta GPIIb-IIIa, nunca se han descrito casos de PPT.

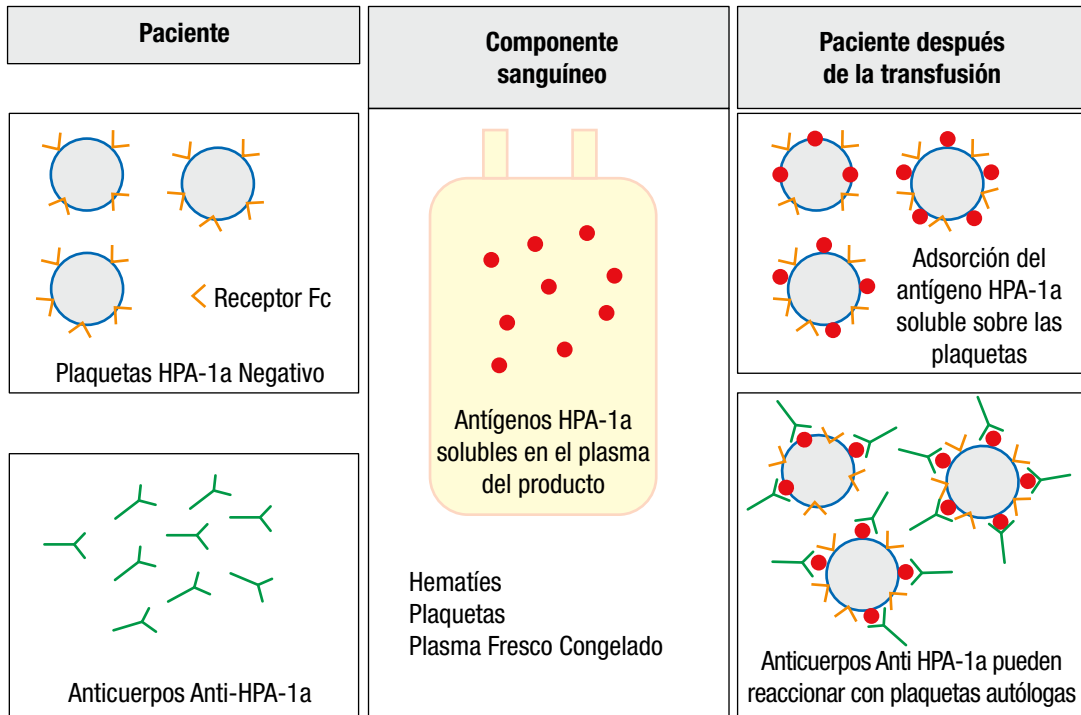


Figura 1. Adsorción de antígenos plaquetarios solubles en el plasma del donante sobre las plaquetas del receptor

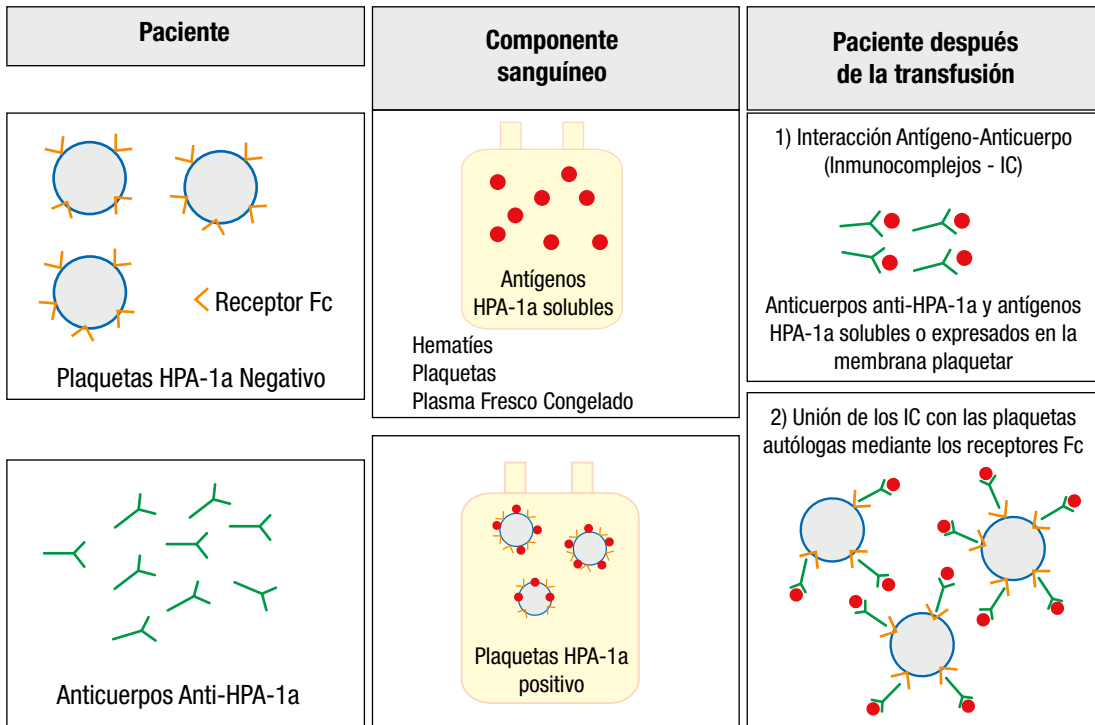


Figura 2. Unión de los inmunocomplejos, mediante los receptores Fc, a las plaquetas autólogas

3. La transfusión induciría simultáneamente una respuesta aloinmune (respuesta anamnésica con un incremento rápido de la concentración de aloanticuerpo) y una respuesta autoinmune (producción transitoria de autoanticuerpos) (Figura 3). En algunos casos, utilizando técnicas muy sensibles, se ha demostrado que el suero obtenido en la fase aguda es reactivo frente a plaquetas HPA-1a negativo, e incluso frente a las plaquetas del propio paciente obtenidas una vez recuperado. Así mismo, se ha observa-

do que eluidos obtenidos en la fase aguda son reactivos frente a plaquetas HPA-1a negativo, aunque de forma mucho más débil que frente a plaquetas HPA-1a positivo.⁹ Estas reacciones observadas frente a células HPA-1a negativo son probablemente debidas a autoanticuerpos. Sin embargo, en la mayoría de casos de PPT no se observa la reacción del suero con plaquetas HPA-1a negativo, por lo que el papel de los autoanticuerpos en la patogenia de la PPT no está del todo dilucidada.

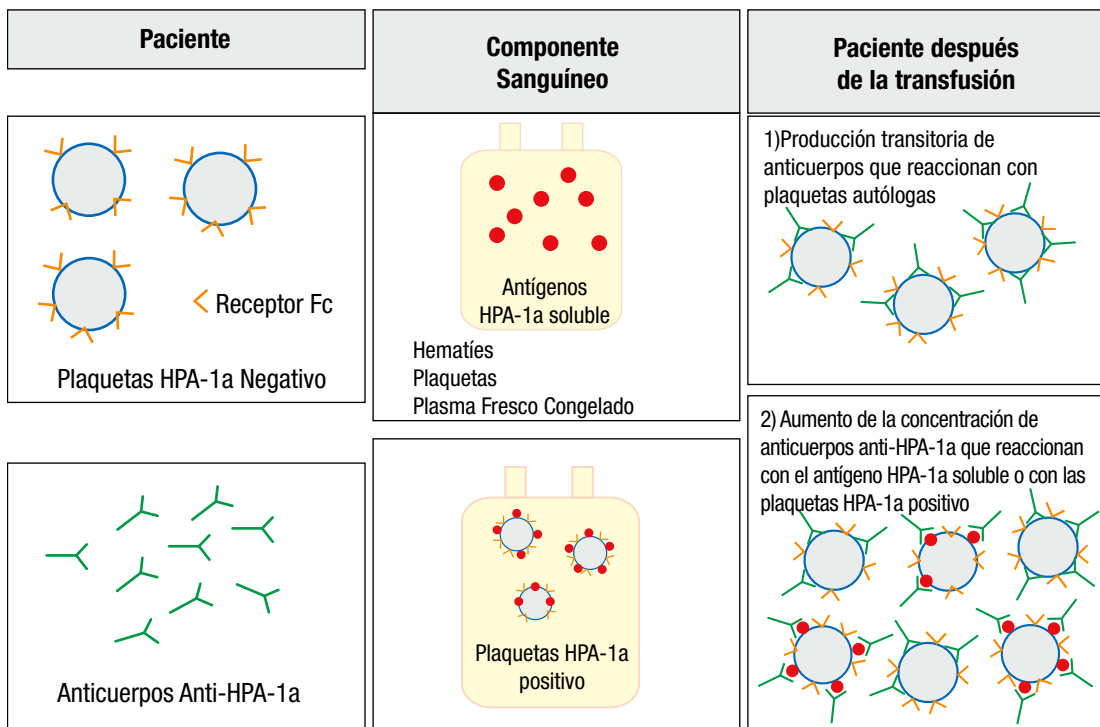


Figura 3. Aumento del título de anticuerpos anti-HPA-1a y producción transitoria de anticuerpos que reaccionan con las plaquetas autólogas (respuesta autoinmune)

4. En el mismo sentido, algunos expertos han planteado la posibilidad de que en la fase más precoz de la respuesta anamnésica causada por la transfusión, emerja un anticuer-

po “inmaduro”. Este anticuerpo no presentaría una especificidad restringida al antígeno HPA-1a, y sería capaz de reaccionar no sólo con las plaquetas transfundidas, sino tam-

bién con las plaquetas del paciente (HPA-1a negativo). Taaning E. y Tonnesen F., en 1999, observaron este fenómeno cuando estudiaron una serie de doce pacientes diagnosticados de PPT.¹⁰ En la fase de trombocitopenia encontraron anticuerpos IgG e IgM panreactivos frente a las GPs IIb-IIIa, Ib-IX y Ia-IIa, junto al aloanticuerpo IgG. En la fase de recuperación, los anticuerpos panreactivos desaparecieron, mientras que persistía el aloanticuerpo. Estos resultados son congruentes con la hipótesis de la presencia en la primera fase de la PPT de anticuerpos “inmaduros” sin una especificidad restringida.

Tratamiento

El tratamiento debe iniciarse lo antes posible por el riesgo potencial de hemorragia cerebral.

- Actualmente, se considera que el tratamiento más efectivo para la PPT es la infusión de **altas dosis de Ig endovenosa** (IVIG), 1 g/kg/día a 2 g/kg/día durante dos a cinco días, con el que se observa una buena respuesta en más del 85% de los casos.
- En algunos pacientes el uso de **corticosteroides** (ej, prednisona, 1 mg/kg/día - 2 mg/kg/día) consigue normalizar el conteo de plaquetas en una semana.
- La **plasmaféresis** también se emplea para reducir la cantidad de anticuerpo circulante. La respuesta es variable y puede tardar una mediana de doce días. La elección

del fluido de reposición es un tema controvertido. Se ha sugerido que la utilización de plasma fresco congelado se asocia a una recuperación más rápida, pero tiene el riesgo añadido de la potencial transmisión de agentes infecciosos.

- La **transfusión de plaquetas** es de muy poca ayuda en la PPT. Debido a la destrucción de las plaquetas autólogas del receptor, no es esperable que las plaquetas transfundidas, independientemente de la compatibilidad, persistan en circulación más que las propias plaquetas del paciente. Es un tema cuestionado si la transfusión prolonga o no el curso de la PPT. En cualquier caso, la transfusión debe reservarse para los pacientes con sangrado activo.
- La **esplenectomía** debe únicamente plantearse en casos de pacientes refractarios, con un elevado riesgo de hemorragia grave, como por ejemplo de una hemorragia intracraneal.

Prevención

La PPT es impredecible, de ahí que el primer episodio no se puede prevenir, aunque sí parece que la leucorreducción de los componentes sanguíneos disminuye el riesgo de esta complicación inmunohematológica. No siempre la transfusión de componentes HPA-1a positivo desencadena la reacción en pacientes que han sufrido un episodio de PPT y en los que el anticuerpo es aún detectable en suero. La explicación podría radicar en que se requieren algunas características especiales del anticuerpo para inducir la reacción. En algunos estudios se ha observado que

los anticuerpos anti-HPA-1a eran fijadores de complemento en la fase aguda de la PPT, mientras que no lo eran en la fase de recuperación de la trombocitopenia.² Es posible que se libere un número suficiente de inmunocomplejos para inducir la PPT únicamente cuando se produce la lisis intravascular de las plaquetas. Sin embargo, en otros pacientes sí se ha observado recurrencia de PPT. En una paciente HPA-1a negativo que desarrolló dos episodios relativamente leves de PPT, separados por un intervalo de tres años, los cuales ocurrieron una a dos semanas después de la transfusión, se detectó un potente anticuerpo anti-HPA-1a en el plasma.¹²

Se recomienda entregar una tarjeta o una carta a los pacientes que han sufrido una PPT, para explicar la reacción transfusional presentada y la necesidad de que reciban componentes sanguíneos negativos para el antígeno correspondiente (ej, HPA-1a negativo) en caso de requerir nuevas transfusiones. En aquellas situaciones en que la transfusión pueda ser programada, se plantea una autotransfusión o el reclutamiento de donantes fenotipados por parte del Banco de Sangre. El tipaje de miembros de la familia resulta útil en estos casos.

Referencias

1. Van Loghem, J. J., Dorfmeier, H., van der Hart, M. Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). *Vox Sang*, 1959; 4: 161-169.
2. Shulman, N. R., Aster, R. H., Letner, A. Immunoreactions involving platelets. V. Posttransfusion purpura due to a complement-fixing antibody against a genetically controlled platelet antigen. A proposed mechanism for thrombocytopenia and its relevance in "autoimmunity". *J Clin Invest*, 1961; 40: 1597-1620.
3. Metcalfe, P., Watkins, N. A., Ouwehand, W. H. et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sanguinis*, 2003; 85: 240-245.
4. Kroll, H., Kiefel, V., Mueller-Eckhardt, C. Posttransfusion purpura: clinical and immunologic studies in 38 patients. *Infusionsther Transfusionsmed*, 1993; 20: 198-204.
5. Lubenow, N., Eichler, P., Albrecht, D. et al. Very low platelet counts in post-transfusion purpura falsely diagnosed as Heparin-induced thrombocytopenia: report of four cases and review of literature. *Thrombosis Research*, 2000; 100: 115-125.
6. Welling, K. L., Taaning, E., Lund, B. V., Rosenkvist, J., Heslet, L. Post-transfusion purpura (PPT) and disseminated intravascular coagulation (DIC). *Eur J Haematol*, 2003; 71: 68-71.
7. Lynce, F., Yin, F., Alcorn, K., Malkosvka, V. Post-transfusion purpura in an African-American man due to human platelet antigen-5b alloantibody: a case report. *J of Case Med Reports*, 2012; 6: 420.
8. Barba, P., Pallarés, P., Nogués, N., Canals, C., Gracia, M., Vinyets, I., Muñoz-Díaz, E. Post-transfusion purpura caused by anti-HPA-3a antibodies that are only detectable using whole platelets in the platelet immunofluorescence test. *Transfus Med*, 2009; 20: 200-202.
9. Minchinton, R. M., Cunningham, J., Cole-Sinclair, M. Autorreactive platelet antibody in posttransfusion purpura. *Aust NZ J Med*, 1990; 20: 111-115.
10. Taaning, E., Tonnesen, F. Panreactive platelet antibodies in post-transfusion purpura. *Vox Sang*, 1999; 76: 120-123.
11. Shulman, N. R., Marder, V. J., Hiller, M. C. Platelet and leukocyte isoantigens and their antibodies: serologic, physiologic and clinical studies. *Progr Hematol*, 1964; 4: 222-304.
12. Soulier, J. P., Patereau, C., Gobert, N. Post-transfusional immunologic thrombocytopenia. A case report. *Vox Sang*, 1979; 37: 21-29.

Complicaciones inmunohematológicas del trasplante de células madre hematopoyéticas

JOSÉ LUIS ARROYO RODRÍGUEZ*
LUZ BARBOLLA GARCÍA**

El trasplante de células madre hematopoyéticas (TPH) es una técnica terapéutica utilizada para regenerar la función hematopoyética en numerosas enfermedades congénitas y adquiridas, en las que la médula ósea (MO) está irreversiblemente dañada, bien de forma primaria o como resultado de la administración de tratamiento quimio y/o radioterápico intensivo. Su eficacia terapéutica, aunque depende de múltiples factores, es atribuible fundamentalmente al tratamiento mieloblástico de la fase preparativa del trasplante y al efecto inmune “injerto contra tumor”.¹

Las circunstancias especiales que acontecen en el contexto del TPH (tra-

* *Médico especialista en Hematología y Hemoterapia. Doctor en Medicina y Cirugía. Director del Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria, España. director@bscan.org*

** *Médico especialista en Hematología y Hemoterapia. Doctora en Medicina y Cirugía. Directora Gerente del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid, España. lbarbolla.trans@salud.madrid.org*

tamiento de acondicionamiento ablativo e inmunosupresor, coexistencia de sistemas inmunes y hematopoyéticos de donante y receptor, etc.) pueden provocar interacciones adversas entre la hematopoyesis y el sistema inmune del paciente, y en consecuencia generar una serie de complicaciones inmunohematológicas que generalmente se manifiestan como citopenias periféricas.² De todas ellas, las más frecuentes son las que afectan la serie roja (Tabla 1).

Estas complicaciones, en las que se ven implicados mecanismos autoinmu-

nes y aloinmunes, pueden desarrollarse después de trasplante alogénico, autólogo o singénico, y ocurrir de forma inmediata o tardía, incluso años después. Aunque la mayoría son leves, en ocasiones son graves y ponen en riesgo la vida del paciente.

Teniendo en cuenta que en muchos casos se conocen los factores desencadenantes (por ejemplo, incompatibilidad ABO entre donante y receptor), es importante establecer las medidas preventivas necesarias para evitar o minimizar su aparición o proceder a su tratamiento.

Tabla 1. Complicaciones inmunohematológicas del trasplante de progenitores hematopoyéticos

I. Serie roja
Anemia hemolítica aloinmune Anemia hemolítica autoinmune Retraso en el implante de serie roja Aplasia pura de células rojas
II. Granulocitos
Neutropenia aloinmune Neutropenia autoinmune Fallo de implante
III. Plaquetas
Trombocitopenia aloinmune Trombocitopenia autoinmune Fallo de implante Refractariedad a transfusión de plaquetas
IV. Otras
Citopenias combinadas Rechazo de injerto Fallo de implante

Hemólisis inmune

La hemólisis inmune como complicación asociada al trasplante de progenitores hematopoyéticos, ocurre fundamentalmente en los casos con incompatibilidad ABO entre donan-

te y receptor. Su presentación clínica, súbita e inesperada, a menudo se confunde con otras causas de hemólisis no inmune y con complicaciones más frecuentes en el trasplante, y por ello, esperadas (enfermedad injerto contra el huésped o enfermedad venooclusiva

hepática), que también pueden cursar con anemia y elevación de la bilirrubina o la LDH de forma similar a los síndromes hemolíticos (Tabla 2).

Para conocer sus posibles causas y presentaciones clínicas, debemos valorar los distintos escenarios de incompatibilidad ABO.

Tabla 2. Diagnóstico diferencial de anemia hemolítica en el trasplante de progenitores hematopoyéticos

Diagnóstico	Fisiopatología
Hemólisis inmune relacionada con injerto	
TPH con incompatibilidad mayor ABO entre donante y receptor	Hemólisis de los hematíes presentes en el producto Retraso en el implante de serie roja
TPH con incompatibilidad menor ABO entre donante y receptor	Hemólisis de los hematíes del paciente causada por isohemaglutininas presentes en el plasma del producto o por síndrome linfocito pasajero
TPH con incompatibilidad mayor para otros antígenos no ABO	Hemólisis de los hematíes del donante
TPH con incompatibilidad menor para otros antígenos no ABO	Hemólisis de los hematíes del paciente causada por aloanticuerpos presentes en el plasma del producto o por síndrome linfocito pasajero
Hemólisis inmune relacionada con transfusión	
Transfusión de hematíes incompatibles con donante o receptor	Hemólisis de hematíes transfundidos causada por anticuerpos del paciente o derivados del injerto
Transfusión de plasma incompatible con donante o receptor	Hemólisis de hematíes del paciente y/o del donante
Otras causas de hemólisis inmune	
Anemia hemolítica autoinmune	
Anemia hemolítica inducida por drogas	Formación de autoanticuerpos por mecanismo hapteno o modificación de membrana de los hematíes
Hemólisis no inmune	
Púrpura trombótica trombocitopénica	Anemia hemolítica microangiopática
Infusión de células madre criopreservadas	Hemólisis por DMSO
Sepsis por <i>Clostridium perfringens</i>	Hemólisis intravascular no inmune por toxina

Incompatibilidad mayor ABO

Presente en el 15%-20% de los trasplantes hematopoyéticos HLA compatibles, y en un porcentaje mayor cuando hay disparidad HLA.³ Los eritrocitos del donante son incompatibles con el plasma del receptor (por ejemplo, donante A y receptor O), y por tanto, su infusión puede provocar una reacción hemolítica. La formación del complejo Ag-Ac, fijador de complemento dispara la respuesta fisiopatológica que involucra a múltiples sistemas enzimáticos, los cuales determinarán la extensión y gravedad de la hemólisis y la anemia. La destrucción de los hematíes ocurre directamente en el torrente circulatorio (hemólisis predominantemente intravascular), lo que determina la presencia de hemoglobinemia y hemoglobinuria.

Aunque se conocen estudios contradictorios al respecto,⁴ actualmente no existen evidencias de que la incompatibilidad ABO influya en la incidencia de EICH, tasa de recaída o supervivencia global del trasplante; sin embargo, la posibilidad de anemia hemolítica obliga a que esta situación sea tenida en cuenta en la fase pre, peri y postrasplante.⁵

De forma preventiva, en los trasplantes con incompatibilidad mayor ABO debemos reducir la cantidad de eritrocitos en el producto a infundir. Estas medidas son especialmente necesarias cuando la fuente de obtención de progenitores es la médula ósea, puesto que el elevado volumen de hematíes presente en el producto, implica un alto riesgo de hemólisis aguda. Los métodos más empleados son la sedimentación mediante agentes químicos

(hidroxietil almidón start, dextrano), la separación por gradiente de densidad y la separación automática mediante equipos de aféresis.^{6,7}

Teniendo en cuenta que todas estas técnicas conllevan una pérdida asociada de células progenitoras, algunos expertos recomiendan el procesamiento de la médula solo en los casos en los que el anticuerpo en el receptor esté presente a títulos altos (por ejemplo > 32), aunque no se ha podido establecer un dintel de seguridad.

Cuando el producto a infundir procede de sangre periférica habitualmente se infunde sin manipulación. La mayoría de los equipos de aféresis trabajan con un hematocrito final < 4%, por lo que la escasa cantidad de hematíes presentes no parece justificar su procesamiento secundario y el riesgo asociado de pérdida de progenitores; si bien es cierto, tampoco se ha definido cuál es el volumen mínimo de hematíes transfundidos a partir del cual se pueda predecir la aparición de reacción hemolítica.⁴

Otra actuación preventiva a tener en cuenta fundamentalmente en aquellos casos con títulos muy altos de anticuerpos, consistiría en disminuir previamente al trasplante la cantidad de anticuerpos circulantes en el receptor mediante recambios plasmáticos o técnicas de inmunoadsorción.⁸

Menos frecuente que la hemólisis aguda, es la hemólisis inmune retardada. Los anticuerpos anti A o anti B del receptor, que generalmente se hacen indetectables al segundo mes postrasplante, en estos casos persisten provocando la hemólisis de los nuevos he-

matíes formados incluso en estadio de eritroblasto a partir del implante, que son del grupo ABO del donante.⁹ Clínicamente, lo más probable es que se manifieste como un retraso en el injerto de la serie roja.

Incompatibilidad menor ABO. Síndrome del linfocito pasajero

La complicación clínica característica de la incompatibilidad menor ABO (plasma del donante incompatible con hematíes del paciente) es el denominado Síndrome del linfocito pasajero. Se trata de un síndrome hemolítico de etiología inmune cuya causa radica en la proliferación y subsecuente producción de anticuerpos de los linfocitos del donante que son infundidos con el producto que contiene los progenitores hematopoyéticos.¹⁰

La hemólisis inmune comienza, por lo general, al final de la primera semana o durante la segunda semana postrasplante. El cuadro hemolítico se presenta de forma súbita y puede llegar a ser grave con una caída rápida de los niveles de hemoglobina y aparición de signos de hemólisis extravascular (hemoglobinemia y hemoglobinuria) acompañados de fallo renal. Los casos menos graves cursan con una caída progresiva de la hemoglobina o un rendimiento insuficiente de las transfusiones con un incremento de los niveles de la LDH y de la bilirrubina indirecta y un descenso de la haptoglobina.

La hemólisis persiste cinco o diez días hasta que los hematíes del receptor son eliminados de la circulación y pasan a ser reemplazados por los nuevos hematíes producidos a partir

del inóculo del trasplante, o bien por los hematíes compatibles transfundidos.

De forma paralela, la producción de anticuerpos disminuye progresivamente según lo hace la supervivencia de los linfocitos pasajeros.

Los factores clínicos que favorecen su aparición son:

- Profilaxis de EICH sin metotrexato u otros agentes que inhiban la proliferación de linfocitos B.
- Fuente de obtención de los progenitores: teóricamente más frecuente en sangre periférica debido a la mayor cantidad de linfocitos, aunque han sido anecdóticos los casos comunicados.
- Acondicionamiento de intensidad reducida, debido a que no se suprime totalmente la eritropoyesis del receptor.

Aunque típicamente está involucrado sólo el sistema ABO, también se han descrito casos que afectan otros sistemas antigénicos: Rh, Kell, Duffy, o Kidd.

Ocasionalmente se han descrito casos de hemólisis masiva no justificada exclusivamente por la incompatibilidad presente. Esta situación, conocida como *bystander immunohemolysis*, y cuyo mecanismo no está del todo aclarado, implica la destrucción de los hematíes incompatibles y adicionalmente la de hematíes negativos para el antígeno contra el que el anticuerpo está dirigido.⁵

Entre las estrategias planteadas para la prevención del síndrome del linfocito pasajero, la más eficaz y utilizada es la reducción de plasma en el producto

de MO previamente a ser infundido. Algunos centros sólo la llevan a cabo en caso de alto título de hemaglutininas incompatible (>256). El recambio eritrocitario utilizado profilácticamente ha presentado resultados controvertidos.

Todos los pacientes trasplantados con incompatibilidad menor ABO deben ser monitorizados en las primeras semanas postrasplante para la detección precoz de anticuerpos y/o hemólisis. En caso de aparición, se debe monitorizar el grado de hemólisis (Hb, LDH,

bilirrubina) y realizar soporte transfusional con hematíes compatibles.

En casos de hemólisis masiva con afectación renal, se debe plantear el recambio eritrocitario junto con el uso de fármacos como Rituximab.¹¹

Todas las consideraciones detalladas en incompatibilidad mayor y menor deben ser tenidas en cuenta en los TPH con incompatibilidad bidireccional ABO (donante A y receptor B o viceversa).

La Tabla 3 muestra la propuesta de los autores para el manejo de incompatibilidad ABO.

Tabla 3. Conducta ante TPH con incompatibilidad ABO

Incompatibilidad mayor ABO	
Sangre periférica	No precisa manipulación del producto (<20 mL hematíes) Monitorizar los datos de hemólisis aguda
Médula ósea	Disminuir hematocrito / concentrar buffy coat Recambios plasmáticos si el título es muy elevado Monitorizar los datos de hemólisis aguda
Incompatibilidad menor ABO	
Sangre periférica	No precisa manipulación Monitorizar los datos de hemólisis retardada
Médula ósea	Reducción de plasma Monitorizar los datos de hemólisis retardada

Hemólisis por aloanticuerpos no ABO

Presente en el 3%-8% de los trasplantes alogénicos.¹² Los más frecuentes son los anticuerpos dirigidos contra antígenos del sistema Kidd y MNS. Su aparición se ve favorecida por la coexistencia de incompatibilidad ABO. En algunos casos se ha demostrado que van dirigidos contra antígenos ausentes tanto en el donante como en el receptor, lo que indica que han sido creados en respuesta a antígenos transfundidos durante el

período peritrasplante, a pesar del profundo estado de inmunosupresión. En la mayoría de los casos es un hallazgo del laboratorio, sin hemólisis significativa.

Respecto al sistema Rh, aunque algunos autores han propuesto la administración de inmunoglobulina profiláctica en los casos de incompatibilidad mayor Rh, la aparición de anti D raramente se ha asociado a hemólisis importante, por lo que actualmente no está justificada su utilización en este contexto.

Anemia hemolítica autoinmune

Se han descrito casos de anemia hemolítica autoinmune (AHAI) a partir del segundo mes postrasplante. El diagnóstico se confirma mediante un resultado positivo para la prueba de Coombs directa. Los estudios posteriores, que deben ser los habituales para una AHAI, pondrán de manifiesto una panaglutinina caliente (IgG), un anticuerpo frío (IgM) o un Ac con especificidad para algún antígeno eritrocitario.

Aunque muy poco frecuente, la aparición de AHAI tardía (algún caso hasta tres años) es más frecuente en trasplantes con depleción de células T y se ha relacionado con un peor pronóstico en la supervivencia.⁵

Aplasia pura de células rojas

En algunos casos de incompatibilidad mayor ABO se puede producir una anemia hiporregenerativa que conlleva la necesidad de recibir transfusiones de concentrados de hematíes mucho tiempo después del trasplante. Aunque su etiología no está del todo clara, parece que es debida a la destrucción de los progenitores eritroides derivados del donante por parte de hemaglutininas producidas por células plasmáticas del receptor que sobrevivieron al tratamiento de acondicionamiento. El diagnóstico requiere la presencia de anemia durante más de sesenta días, reticulopenia y ausencia de precursores eritroides en el aspirado medular. Es muy importante, de cara a establecer e iniciar un tratamiento específico, hacer el diagnóstico diferencial con la aplasia pura de células rojas provocada por parvovirus B19 (infección transmitida vía respiratoria o

a través de transfusión de sangre) cuyo diagnóstico puede hacerse mediante la detección de anticuerpos específicos o detección directa de DNA del virus.

El tratamiento de esta aplasia de la serie roja consiste en recambios plasmáticos terapéuticos con objeto de eliminar las aglutininas causantes, y en disminución de la terapia inmunosupresora con objeto de inducir un efecto de injerto contra huésped.¹³

Otras citopenias

Se han descrito casos de trombocitopenia y/o neutropenia de origen autoinmune tras TPH alogénico y autólogo. El mecanismo exacto no es bien conocido, habiéndose propuesto distintas teorías que implicarían, entre otros, un desbalance del cociente población ayudador/supresor, desregulación inmune debida a daño tímico por radioquimioterapia o a una expresión alterada de antígenos propios secundaria a infecciones virales. En los TPH alogénicos suele encajarse un cuadro de enfermedad injerto contra huésped.³

En los casos de incompatibilidad ABO, si bien está claramente demostrado que puede provocar retraso en la recuperación eritrocitaria con el consiguiente incremento en las necesidades transfusionales, existen datos discordantes sobre las posibles complicaciones que afectan los leucocitos y las plaquetas. Mientras en algunas series se ha detectado un retraso de dos a tres días en el implante,^{14,15} en otras no se detectaron tales diferencias respecto a los casos con identidad ABO. Algo similar ocurre con la posibilidad de fallo de implante primario, que en alguna serie se

ha asociado con un riesgo hasta de quince veces mayor.

Obviamente, existen otras situaciones clínicas que pueden cursar con una o varias citopenias de origen inmune que no son desarrolladas en este capítulo por no ser específicas del TPH, pero que aparecen en otros muchos contextos o situaciones clínicas (p.e. anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica asociada a drogas, anemia hemolítica por incompatibilidad transfusional, púrpura trombocitopénica autoinmune, etc). Entre ellas cabe destacar la refractariedad de plaquetas de origen inmune que debe descartarse en cualquier paciente sometido a TPH con respuesta a la transfusión de plaquetas menor a la esperada, y que generalmente se debe a la presencia de Ac frente a antígenos del sistema HLA (A,B), aunque no hay que descartar los Ac antiplaquetarios, especialmente HPA-1b y HPA-5b.

Selección de componentes sanguíneos para transfusión

Es imprescindible que todos los candidatos a alotrasplante de CPH tengan estudiados determinados parámetros pretrasplante, con el objeto de planificar un soporte transfusional adecuado a cada paciente durante la fase de recupe-

ración hematológica y de identificar en fases tempranas las posibles complicaciones que pudieran aparecer. Entre las determinaciones analíticas obligadas se encuentran:

- Grupo ABO y Rh de donante y receptor.
- Escrutinio de anticuerpos irregulares (AI), y en su caso, identificación.
- Fenotipo eritrocitario de donante y receptor, que nos permitirá detectar el desarrollo de quimeras.
- Relación de compatibilidad ABO entre donante y receptor: identidad, incompatibilidad mayor, incompatibilidad menor o mixta. En caso de incompatibilidad, título de los anticuerpos correspondientes.
- En aquellos casos de receptores politransfundidos y sospecha de refractariedad plaquetaria, es aconsejable determinar Ac anti HLA y antiplaquetarios.

Además de una serie de medidas generales a tener en cuenta en todos los trasplantes alogénicos (irradiación de componentes a transfundir, leucodepleción, etc.), en los casos de trasplante con incompatibilidad ABO, se deben seguir unas pautas para la selección del componente adecuado en función del tipo de incompatibilidad¹⁶ (Tabla 4).

Tabla 4. Selección de componentes en función del tipo de incompatibilidad ABO

Grupo receptor	Grupo donante	Concentrado de hematíes	Plaquetas y plasma
Incompatibilidad menor			
A	O	O	A, AB
B	O	O	B, AB
AB	O	O	AB
AB	A	A, O	AB
AB	B	B, O	AB
Incompatibilidad mayor			
O	A	O	A, AB
O	B	O	B, AB
O	AB	O	AB
A	AB	A	AB
B	AB	B	AB
Incompatibilidad mayor y menor			
A	B	O	AB
B	A	O	AB

Referencias

- Armitage, J. O. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med.*, 1994; 330:827-38.
- Klumpp, T. R. Immunohematologic complications of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1991; 8:159-70.
- O'Donnell, M. R. Blood group incompatibilities and hemolytic complications of hematopoietic cell transplantation. En: Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG (Eds). *Thomas' hematopoietic cell transplantation*. 4th ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009; 1219-1225.
- Rowley, S. D., Donato, M. L. and Bhattacharyya, P. Red blood cell-incompatible allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2011; 46: 1167-1185.
- Gajewski, J. L., Johnson, V. V., Sandler, S. G. et al. A review of transfusion practice before, during, and after hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood*, 2008; 112: 3036-47.
- Braine, H. G., Sensenbrenner, L. L., Wright, S. K., Tutschka, P. J., Saral, R., Santos, G. W. Bone marrow transplantation with major ABO blood group incompatibility using erythrocyte depletion of marrow prior to infusion. *Blood*, 60; 1982: 420-425.
- Tsang, K. S., Li, C. K., Wong, A. P., Leung, Y., Lau, T. T., Li, K. et al. Processing of major ABO-incompatible bone marrow for transplantation by using dextran sedimentation. *Transfusion*, 1999; 39: 1212-1219.
- Bensinger, W. I., Buckner, C. D., Clift, R. A., Thomas, E. D. Plasma exchange and plasma modification for the removal of anti-red cell antibodies prior to ABO-incompatible marrow transplant. *J Clin Apher.*, 1987; 3: 174-177.
- Witherspoon, R. P., Storb, R., Ochs, H. D., Flournoy, N., Kopecky, K. J., Sullivan, K. M. et al. Recovery of antibody production in human allogeneic marrow graft recipients: Influence of time posttransplantation, the presence or absence of chronic graft-versus-host disease, and antithymocyte globulin treatment. *Blood*, 1981; 58: 360-368.

10. Petz, L. D. Immune hemolysis associated with transplantation. *Sem in Hematol.*, 2005; 42:145-155.
11. Lee, H. J., Gulbis, A., De Padua Silva, L. et al. Rituxmab for passenger lymphocyte syndrome associated with allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.*, 2008; 42:67-69.
12. De la Rubia, J., Arriaga, F., Andreu, R., Sanz, G., Jiménez, C., Vicente, A. et al. Development of non-ABO RBC alloantibodies in patients undergoing allogeneic HPC transplantation. Is ABO incompatibility a predisposing factor? *Transfusion*, 2001; 41: 106-110.
13. Stussi, G., Halter, J., Bucheli, E., Valli, P. V., Seebach, L., Gmur, J. et al. Prevention of pure red cell aplasia after major or bidirectional ABO blood group incompatible hematopoietic stem cell transplantation by pretransplant reduction of host anti-donor isoagglutinins. *Haematologica*, 2009; 94: 239-248.
14. Kimura, F., Sato, K., Kobayashi, S., Ikeda, T., Sao, H., Okamoto, S. et al. Impact of ABO-blood group incompatibility on the outcome of recipients of bone marrow transplants from unrelated donors in the Japan Marrow Donor Program. *Haematologica*, 2008; 93: 1686-1693.
15. Michallet, M., Le, Q-H., Mohty, M., Prebet, T., Nicolini, R., Boiron, J. M. et al. Predictive factors for outcomes after reduced intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies: a 10-year retrospective analysis from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Exp Hematol.*, 2008; 36:535-544.
16. Barbolla, L., Contreras, E. Indicaciones de la transfusión en situaciones especiales: trasplantes, cuidados intensivos, cardiopatía, cirugía, embarazo, neonatología y pediatría. En: Barbolla L, Contreras E, Pujol MM (Eds). *Manual práctico de medicina transfusional*. Madrid: Acción médica, 2002; 105-123.

Breve historia de la enfermedad hemolítica del recién nacido

CARMEN MARTIN VEGA*

Principios

La historia de la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN) refleja uno de los más brillantes éxitos en medicina, y una clara demostración de la utilidad del esfuerzo conjunto de clínicos y serologistas. En tan solo veinticinco años, diferentes clínicos e investigadores describen la enfermedad, sospechan y luego confirman la etiología, encuentran el tratamiento y logran prevenirla.

Pero la primera mención que se tiene de la enfermedad se encuentra en las memorias de una comadrona francesa llamada Louise Bourgeois¹

* Médico especialista en Hematología y Hemoterapia. Doctor en Medicina y Cirugía. Exjefe de Servicio del Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. cmartinvega@telefonica.net

que describe, en 1609, la asistencia a un parto gemelar (Figura 1). De los dos gemelos, el primero presentaba un cuadro claramente hidrópico y falleció en el parto, mientras el segundo desarrolló rápidamente una ictericia en las primeras tres horas de vida y falleció a los tres días. Entonces no se sabía, pero claramente correspondía a una EHRN.

En años posteriores se describieron enfermedades neonatales, actualmente compatibles con la EHRN, sin que se tuviera ninguna idea de la causa de la misma.

Diamond⁵ se refiere a una publicación de 1898 que relataba setenta casos de edema generalizado, descritos entre 1614 y 1898. En este artículo de 1932, Diamond y cols.⁵ asocian por primera vez el edema fetal generalizado con la ictericia neonatal grave y la anemia del recién nacido como un único proceso

patológico, pero sin precisar la etiología.

En 1938, una patóloga americana, Ruth Darrow,⁴ fue la primera en lanzar la hipótesis de que los hallazgos anatómopatológicos de los fetos y neonatos muertos de EHRN sugerían que podían ser debidos a una reacción antígeno-anticuerpo.

Levine y Stetson,¹¹ en 1939, publican el histórico caso de una madre que después de dar a luz precisó una transfusión de sangre tras la cual tuvo una grave reacción hemolítica. La sangre había sido extraída a su marido. Ambos eran del mismo grupo sanguíneo ABO. El suero de la señora aglutinaba cerca del 80% de los hematíes ABO compatibles.

En 1940, Landsteiner y Wiener,⁹ en sus trabajos de laboratorio inmunizando conejos y cobayas con los hematíes



Figura 1. Louise Bourgeois

del mono *Macacus rhesus*, detectaron que estos animales desarrollaban un anticuerpo que aglutinaba no solo los hematíes del *Macacus*, sino alrededor del 85% de la sangre de los individuos de raza blanca en el estado de Nueva York. A los individuos cuyos hematíes aglutinaban con ese anticuerpo lo denominaron Rh (de Rhesus) positivo, y Rh negativo al 15% restante. Dadas las aparentes similitudes de los anticuerpos se estableció que el antígeno Rh era el causante de la EHRN. Si Levine y Stetson en su publicación hubieran dado un nombre al anticuerpo, la enfermedad producida por el “factor Rh” se hubiera llamado de otra manera. Aun cuando ya en 1942, y más claramente en 1963, se encontraron diferencias entre los dos anticuerpos, se demostró que eran dos anticuerpos distintos y que solo el factor producido por la madre era el que causaba la EHRN, el término Rh estaba demasiado extendido para modificarlo. El factor real encontrado en el *Macacus Rhesus* se denominó posteriormente Landsteiner Wiener (Figura 2).

Durante los primeros años después de la descripción de la EHRN y el fac-

tor Rh, resultaba sorprendente que en el suero de muchas madres Rh negativo con recién nacidos afectados de la EHRN no se encontraba el anticuerpo. Se dedicaron numerosos estudios y trabajos para esclarecer el problema. Fue en 1945, cuando tras numerosos experimentos, Coombs, Mourant y Race³ describieron el test de la antiglobulina que permitía poner de manifiesto el anticuerpo incompleto. A partir de entonces se describen otros anticuerpos y sistemas de grupo sanguíneo.

Diamond y cols.⁶ sugieren el tratamiento durante los dos primeros días de vida con pequeñas infusiones de sangre. Concluyen que de doce casos, ocho consiguieron sobrevivir.

No es hasta 1946, cuando Wallerstei¹⁶ describe un método que permite retirar los hematíes Rh positivos del recién nacido, utilizando la fontanela anterior y reponiéndolos con sangre Rh negativo a través de una canulación venosa. Era una técnica no exenta de riesgos que se reservaba para los casos realmente desesperados.

En 1947, Diamond,⁶ en una comunicación a la *Royal Society of Medicine in London* en la que, además de explicar

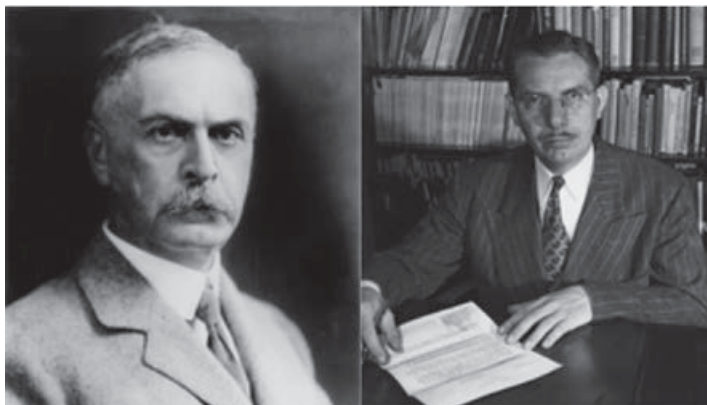


Figura 2. Karl Landsteiner y Alexander Solomon Wiener

los beneficios de inducir el parto tempranamente en los casos graves, describió un rudimentario sistema que utiliza un catéter de plástico para canular la vena umbilical. Esta sería la primera descripción de la exanguinotransfusión, que ha ido perfeccionándose con los años.

La técnica de la exanguinotransfusión vía umbilical tuvo una rápida aceptación. Pero hasta que en 1952, Mollison y Walker (después de un trabajo multicéntrico organizado por la unidad de investigación en transfusión sanguínea del Consejo de Investigación Médica en el Reino Unido) concluyen que la exanguinotransfusión era seguida por una amplia tasa de supervivencia, y que la incidencia de *kerknicterus* era muy baja, la exanguinotransfusión no fue ampliamente utilizada.¹⁴

Después de estos descubrimientos hubo un gran avance en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Entre otros, el estudio de la herencia de los grupos sanguíneos, el desarrollo del test de la antiglobulina, la extensión y el perfeccionamiento de la exanguinotransfusión, y posteriormente el uso del líquido amniótico y el desarrollo de la transfusión intrauterina.

Antes de 1945, alrededor del 50% de los fetos con EHRN fallecían a consecuencia del *kerknicterus* y/o del *hydrops* fetal. En los países desarrollados la mortalidad se redujo al 2%-3% aun cuando algunos autores no dan datos referentes a este descenso debido a la falta de estadísticas fiables en sus respectivos países. Pero es indudable que la posibilidad de prevenir la enfermedad fue definitiva para completar el ciclo de la lucha contra ella.

Una vez más se combina el trabajo de muchos médicos clínicos e investigadores que utilizan métodos de laboratorio, diseños de experiencias y análisis teóricos, como es el caso de Nevanlinna y col.¹⁵ quienes realizaron importantes observaciones. En el estudio publicado en 1956 se concluye que la incompatibilidad ABO entre la madre y el feto protege a la madre de la inmunización por el antígeno D. Existen varias hipótesis para explicar este hecho, pero esta observación fue la base del método de prevención de la inmunización Rh.

Dos grupos de investigadores, uno en Inglaterra y otro en Estados Unidos, fueron los pioneros de la profilaxis y sus resultados se publicaron casi simultáneamente.

El grupo inglés, de Liverpool, inicia sus investigaciones con la idea de que la destrucción de los hematíes ABO incompatibles por las isoaglutininas Anti-A o B impiden el inicio del contacto con el antígeno D, y por tanto la inmunización.⁷⁻¹²

El grupo americano, de Nueva York, basó sus trabajos en que la administración de anticuerpos pasivamente suministrados suprime la respuesta inmune activa.⁸

A partir de aquí se han desarrollado muchas teorías con respecto al exacto mecanismo de la profilaxis con gammaglobulina anti-D, pero lo que queda claro es que la administración de la misma impide la inmunización frente al antígeno.

Los estudios realizados desde entonces han demostrado que siempre que se tenga en cuenta la cantidad de hematíes fetales que han pasado a la madre, y respetando las dosis y el lí-

mite de tiempo, se consigue reducir notablemente la mortalidad.¹³

Existen diversos factores que contribuyen al fracaso de la prevención, pero en 1977 se demostró que un 1,8% de mujeres Rh(D)-negativo a pesar de la profilaxis posnatal continúan desarrollando anticuerpos anti-D debido a pequeñas hemorragias transplacentarias durante los últimos meses de la gestación y en el momento del parto, y se postula el uso de la profilaxis antenatal.¹³ No todos los países la aceptaron de inmediato y existen algunas diferencias en cuanto a la dosis y tiempo de administración, pero finalmente fue aceptada universalmente.

El éxito de la profilaxis con la inmunoglobulina anti-D ha creado un problema: al disminuir la inmunización por anti-D se produce una escasez de la inmunoglobulina necesaria para prevenir la inmunización, esta escasez se ve incrementada por la profilaxis antenatal.

La producción de inmunoglobulina anti-D monoclonal apareció como la solución al problema. En 1997, en Edimburgo, se realizó una conferencia de consenso sobre la profilaxis de la EHRN por anti-D y las perspectivas sobre el uso de los monoclonales, y se discutió largamente el tema que todos daban ya por solucionado. Esta conferencia es citada por Lee y cols.¹⁰ en 1999, al tiempo que recopilaban las recomendaciones sobre el uso de la inmunoglobulina anti-D. Pero todavía no se superan los problemas con respecto a la administración de la inmunoglobulina anti-D monoclonal.

Un tema que no se puede considerar histórico, ya que es de total actualidad,

es la determinación del genotipo fetal. Quedan aún muchos interrogantes y diferencias en los protocolos, antes y después del parto.

Lo que es indudable es que con los tratamientos actuales, cada vez más óptimos, y la introducción de la profilaxis antenatal, los casos tan graves que vimos hace no tantos años, ya constituyen historia. Aun cuando no es así en todos los países, sí que sucede en los países más desarrollados.

Referencias

1. Bowman, J. M. Haemolytic disease of the newborn. *Vox Sang.*, 1996; 70 (Suppl 3):62-67.
2. Bowman, J. M., Chown, B., Lewis, M., Pollock, J. M. Rh isoimmunization during pregnancy: antenatal prophylaxis. *Can Med Assoc J.*, 1978; 118:623-7.
3. Coombs, R. R. A., Mourant, A. E. and Race, R. R. Detection of weak and "incomplete Rh agglutinins". *Lancet* ii, 1945, 15.
4. Darrow, R. R. Icterus gravis (erythroblastosis) neonatorum. An examination of etiologic considerations. *Arch Pathol.*, 1938; 25:378-417.
5. Diamond, L. K., Blackfan, K. D., Baty, J. M. Erythroblastosis fetalis and its association with universal oedema of the fetus, icterus gravis neonatorum, and anaemia of the newborn. *J Pediatr.*, 1932; 30:269-309.
6. Diamond, L. K. Erythroblastosis foetalis or haemolytic disease of the newborn. *Proc. Royal So. Med.*, 1947; 40: 54.
7. Finn, R., Clarke, C. A., Donohoe W. T. A. et al. Experimental studies on the prevention of Rh haemolytic disease. *Brit. Med Jour.*, 1961; J. 1:1486.
8. Freda, V. J., Gorman, J. G., Pollack, W. Successful prevention of experimental Rh sensitization in man with an anti-Rh gamma₂ globulin antibody preparation. *Transfusion*, 1964; 4: 26.

9. Landsteiner, K., Weiner, A. S. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera in Rhesus blood. *Soc. Exp. Biol.*, 1940 New York, 42: 223
10. Lee, D., Contreras, M., Robson, S. C., Rodeck, C. H., Whittle, M. J. Recommendations for the use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis. *Transfus Med*, 1999; 9: 93-97.
11. Levine, P., Stetson, R. E. An unusual case of intra-group agglutination. *JAMA*. 1939; 113:126-127.
12. Levine, P. The influence of the ABO system on Rh haemolytic disease. *Hum Biol.*, 1958; 30:14-28.
13. McMaster Conference on Prevention of Rh immunization 28-30 September, 1977. *Vox Sang*, 1979; 3650-64.64.
14. Mollison, P. L. and Walker, W. Controlled trials of the treatment of haemolytic disease of the newborn. *Lancet*, 1952, 1:429.
15. Nevanlinna, H. R., Vainio, T. The influence of mother-child ABO incompatibility on Rh immunization. *Vox Sang.*, 1956, 1: 26.
16. Wallerstein, H. Treatment of severe erythroblastosis by simultaneous removal and replacement of blood of the newborn. *Science*, 1946; 103:583-584.

Enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad Rh: Profilaxis con gammaglobulina anti-D

RAMÓN F. MONTAÑO*
JANELI FUENMAYOR**
OSCAR WALTER TORRES***

* *MSc, PhSc en Inmunología. Investigador asociado en el Laboratorio de Patología Celular y Molecular. Centro de Medicina Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. rmontano@ivic.gob.ve*

** *Laboratorio de Patología Celular y Molecular. Centro de Medicina Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela. jfuenmay@ivic.gob.ve*

*** *Jefe de Unidad de Hemoterapia. Hospital Materno-Infantil Ramón Sardá. Esteban de Luca 2151. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. owtorres@gmail.com*

El sistema sanguíneo Rh

Los aloantígenos que conforman el sistema sanguíneo Rh humano residen en una pareja de proteínas, RhD y RhCE, que se expresa exclusivamente en la membrana de los glóbulos rojos (GR).¹ RhD y RhCE forman parte de un complejo proteico, el complejo Rh, cuya función está aparentemente vinculada con un rol estructural en la membrana eritrocitaria;² aunque puede además desempeñarse como un canal proteico, facilitador del transporte de gases (CO₂, O₂, NH₃, NO)³⁻⁷ y/o de cationes mono-

valentes^{8,9} hacia o desde el interior del eritrocito. Desde el punto de vista inmunitario, el sistema aloantigénico Rh es una colección diversa de determinantes antigénicos (epítomos) localizados en la secuencia de las cadenas polipeptídicas RhD y RhCE. RhD y RhCE son proteínas integrales de membrana, no glicosiladas,¹⁰ que exhiben un grado apreciable de polimorfismo¹¹⁻¹² y son identificadas en la nomenclatura CD con la designación CD240.¹³ En este complejo aloantigénico se incluyen las clásicas especificidades antitéticas C/c y E/e, que dependen del alelo de RhCE presente en cada individuo, y D/d que inicialmente se pensó también correspondía a un par de alelos antitéticos, pero que en realidad está determinada por la presencia (D) o ausencia (d) de la proteína RhD. Esto último ha permitido la clasificación de los seres humanos en Rh positivo (D; cuando RhD está presente) o Rh negativo (d; cuando RhD está ausente).

Las proteínas RhD y RhCE son codificadas por los genes *RHD* y *RHCE*, los cuales tienen un origen común, exhiben una alta homología (96% de identidad) y se encuentran ubicados, muy próximos uno del otro, en el cromosoma 1 humano.¹⁴⁻¹⁶ En consecuencia, RhD y RhCE son muy semejantes en su secuencia primaria y estructura.⁷ La presencia de ambas proteínas en la membrana eritrocitaria depende críticamente de la interacción con otra proteína integral de membrana denominada RhAg (CD241), con la que comparten cierto grado de homología. Estos tres polipéptidos forman parte de la “familia proteica Rh” y se unen en la membrana del GR a proteínas acce-

sorias –CD47, LW, GPB– constituyendo el complejo Rh.¹⁷ Serológicamente, se han identificado al menos cincuenta variantes antigénicas dentro del complejo Rh,^{18,19} todas relacionadas a RhD o RhCE, conformándose así en el sistema de antígenos (Ag) eritrocitarios humano más complejo y polimórfico que se conoce. La carencia de la proteína RhD en los individuos Rh negativo [Rh(-)], aunada a su extenso polimorfismo, la hacen muy inmunogénica para estos, y se estima que hasta un 85%-90% de quienes se exponen a un contacto con GR Rh positivo [Rh(+)] desarrollan una respuesta inmunitaria –se “sensibilizan”– produciendo aloanticuerpos anti-RhD, principalmente de los isotipos de inmunoglobulina IgG₁ e IgG₃.²⁰⁻²² De esta manera, la mayor contribución a la variedad aloantigénica del complejo la aporta sin duda la proteína RhD.

La inmunodominancia de RhD ha facilitado la producción de anticuerpos monoclonales que reconocen de manera específica un número apreciable de variantes alélicas de la misma.²³ Esto, en conjunto con estudios de genética molecular dirigidos a la caracterización del polimorfismo del gen *RHD*,²⁴ ha permitido una descripción detallada, aunque aparentemente aún incompleta, de la antigenicidad de la proteína RhD y de las diferentes variantes alélicas presentes en las poblaciones humanas.^{25, 26} Es así que hoy día se entiende a lo que clásicamente se ha llamado el “antígeno Rh” (aludiendo a la proteína RhD) como un mosaico antigénico diverso que contiene por lo menos treinta epítomos distintos.^{23, 27} De acuerdo con los análisis moleculares realizados, muchos de estos epítomos se solapan,

algunos son independientes, pero entre ellos se han definido al menos seis *clusters* o agrupaciones.^{25, 26}

La inmunogenicidad de la proteína RhD tiene además consecuencias desde el punto de vista clínico para la práctica de la medicina transfusional. La administración de sangre o productos sanguíneos (principalmente aquellos que contengan GR) derivados de un donante Rh(+) a un paciente Rh(-) casi invariablemente conducirá a la sensibilización de éste al Ag RhD y a la eventual ocurrencia de reacciones hemolíticas postransfusionales. Adicionalmente, existen individuos Rh(+) cuya proteína RhD exhibe mutaciones que se traducen en la pérdida de uno o varios determinantes antigénicos (son los llamados RhD parcial o variantes D²⁸). Estos individuos son usualmente identificados como Rh(+) al utilizar los reactivos y procedimientos de hemoclasificación empleados rutinariamente en bancos de sangre y laboratorios clínicos, pero al transfundirles sangre “Rh-compatibil” de un donante cuya proteína RhD es antigénicamente normal pueden generar una respuesta de anticuerpos anti-RhD dirigida a los epítomos que su proteína RhD no posee. Lo anterior es particularmente importante para aquellos pacientes que requieren una transfusión sanguínea y poseen alguna de las variantes de la proteína RhD parcial agrupadas bajo la “categoría DVI”.²⁹ En el ámbito de la obstetricia y perinatología, una madre Rh(-), o RhD parcial, también se encuentra a riesgo de sensibilización con la proteína RhD si gesta un bebé Rh(+), y puede presentarse la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad Rh.

La enfermedad hemolítica del recién nacido

La enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (EHRN) fue reconocida como un síndrome clínico durante los años treinta y cuarenta del siglo XX,³⁰⁻³² aun cuando el primer registro documentado de la misma se remonta a principios del siglo XVII.³³ El cuadro clínico de la EHRN incluye anemia de origen hemolítico, eritroblastosis, *Hydrops fetalis* (acumulación excesiva de líquidos en el espacio extravascular) e ictericia, de gravedad variable. La etiopatogenia de esta enfermedad fue sugerida en 1938³⁴ y está vinculada a la presencia de anticuerpos maternos en la circulación fetal, causantes de la destrucción de los eritrocitos del feto. Estos anticuerpos reconocen aloantígenos paternos, presentes en los GR fetales, pero ausentes en la madre,³⁵ y su existencia puede ocurrir de manera “natural”, como en el caso de la EHRN por incompatibilidad materno-fetal en el grupo sanguíneo ABO (EHRN-ABO),³⁶ o producto de una inmunización o gestación previa, como sucede en el caso de la EHRN por incompatibilidad entre los grupos sanguíneos Rh de la madre y el bebé (EHRN-Rh).³⁷

En la EHRN-Rh, la vasta mayoría de los casos ocurre cuando una madre cuyo tipo sanguíneo es Rh(-) gesta un feto Rh(+), y además, presenta anticuerpos anti-RhD. Como se mencionó, los anticuerpos anti-RhD maternos generalmente pertenecen a la clase IgG, y por tanto, tienen la facultad de atravesar la placenta y alcanzar la circulación fetal donde se combinan con los eritrocitos fetales y aceleran su destrucción,

principalmente en el bazo. Como resultado de la destrucción acelerada de los hematíes se produce anemia, con presencia de eritroblastos en sangre periférica (eritroblastosis) y el catabolismo de cantidades excesivas de hemoglobina, lo que conduce a un incremento en los niveles de bilirrubina no conjugada, ocasionando ictericia y, en casos graves, neurotoxicidad que desemboca en la muerte *in utero* del feto.

De lo anterior resulta claro que, dado el supuesto de la incompatibilidad de grupo sanguíneo indicada, el evento clave para la ocurrencia de la EHRN-Rh es la producción de anticuerpos anti-RhD tipo IgG por parte de la madre. El evento de sensibilización responsable de la aparición de estos anticuerpos puede ser una hemorragia transplacentaria durante, o al término de un embarazo Rh(+) previo o a consecuencia de una transfusión sanguínea con GR Rh(+).

Profilaxis de la EHRN-Rh

Desde mediados del siglo XX se conoce que la administración de preparaciones de IgG humana enriquecidas en anticuerpos anti-RhD (a las cuales llamaremos genéricamente "IgRh") a individuos Rh(-) cuando estos son expuestos a GR Rh(+) previene el evento de sensibilización a RhD y la subsecuente producción de anticuerpos anti-RhD.³⁸ La utilización de IgRh para prevenir la aloinmunización de madres Rh(-) que se encuentran bajo riesgo de sensibilización a RhD, ha resultado tan exitosa que, luego de su introducción inicial, la incidencia de inmunización en embarazos Rh-incompatibles se redujo en un 90% (de 14% a 1%-2%) en regiones

industrializadas del mundo como Norteamérica y Europa; y es actualmente una indicación médica rutinaria en estas pacientes. Inicialmente, la indicación consistió en la administración por vía intramuscular o endovenosa de 100 microgramos a 300 microgramos de IgRh a toda madre Rh(-) no inmunizada a RhD (si la paciente ya está sensibilizada, la administración de IgRh no es capaz de revertir la inmunización) durante las primeras 72 horas después del parto,³⁹ ya que es el momento cuando la sangre fetal tiene la mayor probabilidad de alcanzar la circulación materna. Posteriormente fue establecido que la administración de IgRh anteparto (a las 28 semanas de embarazo) puede reducir aún más (hasta 0,1%-0,2%) la posibilidad de sensibilización (debida a hemorragias transplacentarias ocultas que ocurrieran durante el embarazo),⁴⁰⁻⁴² por lo que es cada vez más común el uso de IgRh anteparto (a las 28-30 semanas de gestación), además de la administración posparto. El problema con la indicación anteparto, a diferencia de la posparto, es que para el momento de la administración de la IgRh usualmente se desconoce si el feto es Rh(+) o Rh(-), lo cual obliga a suministrar el material a todas las gestantes Rh(-). Esto hace que en aquellos casos en los que el feto es RhD(-), la IgRh se utilice sin necesidad. Recientemente, varios laboratorios en el mundo han explorado la posibilidad de utilizar pruebas moleculares para realizar la genotipificación *RHD* del feto, empleando como fuente de ADN fetal el plasma de la madre gestante,⁴³⁻⁴⁵ con resultados tan alentadores que en algunos países esto ya se ha convertido

en una práctica rutinaria, en los casos que así esté indicado.⁴⁶ Adicionalmente, el establecimiento del genotipo *RHD* del padre –mediante pruebas de biología molecular y a partir de una muestra de su sangre periférica– constituye otra herramienta de reciente desarrollo, mínimamente invasiva, pero muy útil e informativa para identificar a las madres Rh(–) gestantes que se encuentren en riesgo de sensibilización a RhD;^{47,48} e incluso para identificar entre las madres Rh(–) ya sensibilizadas a RhD, aquellas que gestan un bebé Rh(+), y por tanto, poseen un alto riesgo de ocurrencia de la EHRN-Rh.⁴⁹

Esquemas actuales de profilaxis.

La profilaxis IgRh, a pesar de ser un gran avance médico, representa un método inmunoprofiláctico distinto a lo que comúnmente se entiende por inmunoprofilaxis o vacunación, pues no inmuniza a la paciente frente al antígeno, dado que lo único que se administra es un anticuerpo para prevenir la aloinmunización. Este modo de actuación requiere que la IgRh sea suministrada cada vez que hay una exposición al antígeno y que la dosis sea suficiente para cubrirlo, lo que depende del volumen de la hemorragia feto-materna (HFM). Muchos hospitales utilizan la técnica de Kleihauer-Betke como método de detección de la HFM y si ésta es superior a 4 ml emplean la citometría de flujo para cuantificar la HFM y así ajustar la dosis de IgRh.

Profilaxis prenatal

La administración de IgRh para prevenir la aloinmunización feto-materna y los posteriores efectos de mortalidad

y morbilidad neonatal es una práctica generalizada, pero su uso y su efecto preventivo en el primer trimestre del embarazo es actualmente motivo de controversia. En una de las últimas revisiones sistemáticas realizadas en *Medline* en la *Cochrane Collaboration* se concluyó que la administración antenatal de 100 microgramos (500 UI) de IgRh puede reducir el riesgo de sensibilización materna a 0,2%, sin la aparición de efectos adversos, confirmando una vez más la importancia de la inmunoprofilaxis antenatal.⁵⁰

La evidencia clínica no da soporte al uso de IgRh en mujeres RhD(–) con aborto espontáneo sin intervención médica antes de la semana 12-14; sin embargo, en caso de duda de la edad gestacional se debe administrar IgRh.

El *American College of Obstetricians and Gynecologists* no define una pauta general. Consideran que se puede establecer una recomendación sin estar basada en la evidencia, pero por otra parte dicen que la aloinmunización por aborto espontáneo antes de la semana 12 es muy rara.⁵¹ En Inglaterra, el *Royal College of Obstetricians and Gynecologists* no recomienda la administración de IgRh en abortos espontáneos cuando éste ocurre antes de la semana 12 de gestación. Ello conduce a que no exista una práctica generalizada en el uso de la IgRh a mujeres RhD(–) con aborto espontáneo antes de la semana 12. La dosis no está definida, pero 50 microgramos debería ser suficiente en el primer trimestre.

Después del primer trimestre se debe administrar IgRh para prevención de la aloinmunización RhD en aquellas situaciones y/o maniobras que

conduzcan a un riesgo de hemorragia feto-materna; tales como aborto, amniocentesis, traumatismo abdominal, embarazo ectópico, toxemia del embarazo, cordocentesis, biopsia coriónica, biopsia de placenta, feto muerto, mola hidatiforme, cirugía intrauterina y hemorragia vaginal.

La frecuencia y volumen de hemorragia fetal aumenta a medida que progresa el embarazo, el mayor riesgo ocurre después de la semana 28 de gestación, cuando el feto está completamente desarrollado y el volumen fetoplacentario es mayor. En estudios realizados se estima que el 3% de las mujeres embarazadas tienen hematíes fetales circulando en el primer trimestre, el 12% en el segundo trimestre, el 45% en el tercer trimestre, y hasta el 60% en el parto. La incidencia de inmunización durante el embarazo de mujeres RhD(-) que han tenido un hijo RhD(+) es de 1,5%. En una revisión sobre la administración de IgRh en el embarazo que incluyó a 4.500 mujeres se observó que la administración de 100 microgramos de anti-D en la semana 28 y 34 de gestación puede reducir el riesgo de aloinmunización de 1,5% a 0,2%. La profilaxis prenatal no se ha instaurado de una forma sistemática porque existen controversias derivadas del aumento del consumo de anti-D que ello conlleva.⁵⁰

En general se reconocen dos esquemas de inmunoprofilaxis antenatal: i) administración de una única dosis de 300 microgramos (1.500 UI) en la semana 28 de gestación; o ii) dos dosis de 100 microgramos y 125 microgramos (500 UI-625 UI), una en la semana 28, y la otra en la semana 34.⁵²

Profilaxis posnatal

En los programas de profilaxis RhD existe un consenso internacional en el que toda madre RhD(-) o con un recién nacido (RN) RhD(+), con prueba anti-globulínica directa (PAD) negativa de sangre de cordón debe recibir 300 microgramos (1.500 UI) de anti-RhD independientemente del estatus ABO del RN. Así mismo, toda madre RhD(-) no sensibilizada con mortinato que imposibilite conocer el Grupo Rh y PAD del producto, debe recibir 300 microgramos (1.500 UI); en ambas circunstancias, dentro de las 72 horas posparto. Si la paciente no ha recibido la profilaxis en las primeras 72 horas posevento, ésta puede administrarse hasta cuatro semanas después.

Si se sospecha HFM importante, se debe administrar 300 microgramos de IgG anti-RhD por cada 30 ml de sangre fetal, lo que se puede calcular por diferentes pruebas (Test de Rosetas, Kleihauer-Betke o citometría de flujo).⁵³ En relación con la HFM, afortunadamente, el volumen que se pierde por lo general es pequeño, con menos de 0,025 mL eritrocitos fetales observados en 75% de los casos, menos de 0,5 mL en 6%, y menos de 15 mL en más del 99%.⁵⁴ La incidencia de HFM de importancia clínica varía dependiendo del volumen de sangre fetal considerado significativo. Muchas series se han enfocado en un punto de corte de 30 mL, ya que esta es la cantidad de eritrocitos fetales cubiertos por la dosis estándar de 300 microgramos de IgRh administrada para la prevención a la sensibilización a Rh.⁵⁵ Con este punto de corte, la incidencia de la HFM se ha estimado en aproximadamente 3 por 1.000 nacimientos.⁵⁴

Prevención de la aloinmunización en la Unión Europea

Entre los países de la Unión Europea (UE) se aprecia falta de uniformidad en los programas de prevención de la aloinmunización RhD y en la cantidad de IgRh que se debe administrar para un efecto preventivo eficaz. Mientras que Inglaterra o Francia administran dosis de 100 microgramos en el parto, otros países administran 300 microgramos. En la prevención prenatal son mayores las diferencias en la cantidad de IgRh que se administra, y van desde los 75 microgramos en Holanda hasta los 300 microgramos en Austria o Alemania, pasando por los 100 microgramos en las semanas 28 y 34 en Inglaterra o Francia. La profilaxis prenatal en la semana 28 no se realiza de forma sistemática en todos los países, y en Holanda y Polonia se limita a mujeres que no tienen hijos vivos.

En Inglaterra, la cuantificación del volumen de HFM solo se realiza de rutina después del parto si el recién nacido es RhD(+). En la mayoría de los países el volumen de la HFM sólo se cuantifica si se sospecha una HFM masiva o si el neonato presenta anemia, y la técnica empleada puede ser citometría de flujo o el Test de Kleihauer-Betke.⁵⁶

Prevención de la aloinmunización en América Latina

En Bolivia no hay normativas específicas para el control inmunohematológico de la gestante y del neonato; tampoco sobre la inmunoprofilaxis. Solamente en las *Guías para uso racional de hemocomponentes* editadas

por las anteriores autoridades del Plan Nacional de Sangre se recomienda que “personas Rh negativo que reciben plaquetas Rh positivo o hemocomponente contaminado con glóbulos rojos, deberán recibir gammaglobulina hiperimmune anti-D”. De todas maneras, la EHP por anti-D en este país no reviste importancia sanitaria porque la población, por sus características étnicas, es Rh(+) en un 92%-100%.^{57, 58}

En Venezuela no existen normas del Ministerio de Salud para la inmunoprofilaxis Rh. En cambio, la Sociedad de Obstetricia recomienda determinar el tipo sanguíneo ABO y Rh, y la Sociedad Venezolana de Hematología ha recomendado la administración de la IgG Rh en los casos en que estuviere indicada. Aproximadamente, desde 1980 se está haciendo la profilaxis prenatal, con 300 microgramos de IgRh a las 28 semanas de gestación.⁵⁹

Según datos obtenidos del *Boletín del Instituto Nacional de Salud Pública de México*, en este país no se tiene experiencia alguna en la cuantificación de la HFM en cualquier etapa del embarazo, ni con la prueba de Kleihauer-Betke. Es decir, que en ausencia de la experiencia o infraestructura para realizar la cuantificación de la HFM, ésta no debe ser aún un criterio para ser incorporada en las medidas de prevención de la isoinmunización. El empleo de la IgRh, en las semanas 28 y 34, ha demostrado un efecto marginal y no significativo en la reducción del riesgo en mujeres Rh(-) primíparas o sin distinción de la paridad de 0,30 (0,22-0,38) y 0,34 (0,28-0,40), respectivamente. Pero sin duda alguna, el elemento más preocupante es la falta de un marco norma-

tivo o regulatorio, pues el INPer (Instituto Nacional de Perinatología) es la única institución donde se tienen claramente establecidos las normas y los criterios para la inmunoprofilaxis en la gestante D(-). En el ámbito nacional, la Norma Oficial Mexicana (NOM) para la atención de la mujer durante el embarazo, parto o puerperio y del recién nacido, señala criterios generales para la atención de la gestante D(-). No especifica ningún criterio adicional, ni para modificar la dosis, ni la aplicación prenatal o ningún otro procedimiento que permita proteger a las gestantes D(-) en riesgo, bajo circunstancias clínicas que favorecen la isoimmunización. Las nuevas propuestas de actualización de la NOM para la disposición de sangre humana y sus componentes han eliminado cualquier recomendación respecto a las prácticas de inmunoprofilaxis.⁶⁰

En Ecuador, el *Reglamento a la Ley de Maternidad Gratuita y de Atención a la Infancia* del Ministerio de Salud Pública menciona en el Art. 1 inc. a) “La asistencia prenatal incluirá: el diagnóstico de embarazo y los controles que sean necesarios, mediante los siguientes exámenes: biometría hemática, VDRL, grupo sanguíneo y factor Rh, tiempo de protrombina...”. No existen otras consideraciones para situaciones de gestantes sensibilizadas, como tampoco la detección de anticuerpos irregulares en forma sistemática.⁶¹

En Brasil no existen normas que regulen los controles inmunohematológicos perinatales, tampoco sobre la IP. La prevención se lleva a cabo con una dosis de 300 microgramos posparto, sin cuantificación de la HFM. No está sistematizada la profilaxis antenatal.

En Uruguay, según normas, se deben estudiar todas las gestantes, en lo posible en el primer trimestre (ABO, Rh y detección de anticuerpos séricos irregulares). En las pacientes sensibilizadas se efectúa el seguimiento mensual (inmunohematológico y obstétrico), para evaluar el grado de sufrimiento fetal. La inmunoprofilaxis se efectúa con dosis de 300 microgramos en las semana 28 y dentro de las 72 horas posparto. Para la indicación de la dosis posparto no se efectúa la cuantificación de la HFM.

En la República Argentina, el diagnóstico, tratamiento y prevención de la EHP por Rh son abordadas en las *Recomendaciones para el Equipo Perinatal* del Ministerio de Salud de la Nación y por las *Normas Técnicas de la Ley Nacional de Sangre* N° 22.990. Ambas normativas coinciden en la obligatoriedad de que se deben estudiar todas las gestantes, en lo posible en el primer trimestre (ABO, Rh y detección de anticuerpos séricos irregulares), así como a todos los neonatos (ABO, Rh, PAD). En relación con la inmunoprofilaxis, se recomienda administrar no menos de 250 microgramos de IgRh entre las semanas 28 y 32 de gestación y no menos de 300 microgramos dentro de las 72 horas posparto. También es obligatoria la cuantificación de la HFM para ajustar la dosis de IgRh posparto, pero su cumplimiento es parcial.⁶²⁻⁶⁴

IgRh

La materia prima utilizada para la preparación de IgRh es una mezcla de plasmas humanos obtenidos mediante plasmáferesis de donantes inmunizados a RhD que poseen altos títulos de aloanticuer-

pos específicos. En el pasado los donantes solían ser mujeres Rh(-), sensibilizadas durante un embarazo Rh(+) y que ya no se encontraban en edad reproductiva. Paradójicamente, este tipo de donantes ahora es escaso debido al éxito de los programas de prevención a la aloinmunización a Rh con IgRh. En su lugar, en la actualidad se utilizan hombres Rh(-), quienes voluntariamente acceden a ser inmunizados y luego estimulados repetidas veces mediante la inyección de GR Rh(+). Las mezclas de plasma son procesadas industrialmente de manera similar (fraccionamiento mediante precipitación con etanol frío) a como se prepara la inmunoglobulina endovenosa (IVIG) o mediante cromatografía de intercambio aniónico para rendir un producto final que contiene esencialmente IgG humana (principalmente IgG₁ y en menor proporción IgG₃). Solo una pequeña fracción del total de proteínas presente en una dosis de IgRh profiláctico corresponde a anticuerpos anti-RhD (entre 50 microgramos y 300 microgramos de anticuerpo versus 50 miligramos - 60 miligramos de proteína total, dependiendo de la formulación). La naturaleza policlonal de estas preparaciones hace suponer que deben contener una mezcla de anticuerpos anti-RhD con especificidad por la mayoría –sino la totalidad– de los epítomos B (determinantes antigénicos reconocibles por los linfocitos B humanos) de la proteína RhD, aunque no se dispone de estudios sistemáticos que confirmen esta suposición.

Mecanismo de acción de la IgRh

La administración conjunta de GR Rh(+) (ABO-compatibles) e IgRh a indi-

viduos Rh(-) ocasiona una rápida desaparición de los GR alogénicos de la circulación.⁶⁵ Algo similar sucede si los GR Rh(+) son recubiertos con IgG anti-RhD *ex vivo* y luego son inyectados.³⁸ El órgano en el cual ocurre el secuestro de los GR alogénicos recubiertos de anti-RhD es el bazo.⁶⁶ Contrariamente, cuando se inyectan los GR alogénicos en ausencia de IgRh, estos exhiben una vida media similar a la de los GR autólogos, y se detectan en la circulación durante meses. En los primeros dos casos, un porcentaje elevado (en algunos estudios el 100%) de los individuos resulta “protegido” de la sensibilización a RhD; en el tercero, entre un 80%-90% se inmunizan y comienzan a producir anti-RhD. Estos hallazgos han sido interpretados para proponer que, en el caso de una mujer Rh(-) con un embarazo Rh(+) a la cual se le administró IgRh, la eliminación de los GR fetales es tan rápida y completa que no da oportunidad para que ocurra contacto alguno entre estos y los linfocitos B RhD-específicos de la madre, y evitar así su activación y posterior diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos anti-RhD, lográndose entonces el efecto profiláctico. Esto es lo que en la literatura angloamericana se conoce con el nombre de “*antigen (RBC) clearance hypothesis*”, es decir, “hipótesis de eliminación del antígeno”.⁶⁷

Aun cuando la hipótesis de eliminación del antígeno resulta satisfactoria para explicar el efecto preventivo inmediato de la IgRh, no lo es para aclarar el carácter “residual” o prolongado de su acción profiláctica. En varios estudios se ha documentado que si

se deja transcurrir el tiempo suficiente (hasta 10 meses) para que desaparezca (o al menos no sea detectable) la IgG anti-RhD de la circulación de los individuos Rh(-) en los que la administración de IgRh produjo un efecto profiláctico, un número de individuos bastante menor al esperado resulta inmunizado al repetir la inyección de GR Rh(+), esta vez en ausencia de una nueva dosis de IgRh.^{55, 68} Ello ha dado lugar a la formulación de otras hipótesis que toman en cuenta esta observación. La que mayor aceptación ha tenido –hasta hace relativamente poco tiempo– se fundamenta en un fenómeno experimental denominado Inmunosupresión Mediada por Anticuerpos (AMIS; del inglés, *Antibody-Mediated Immune Suppression*), en el cual la administración a conejos,^{69, 70} ratones⁷¹ y otras especies animales⁷² de un Ag –en la forma de complejo inmune (CI) con anticuerpos tipo IgG– conduce a la supresión de la respuesta humoral específica en contra del Ag administrado. La explicación que se ha dado a la AMIS es que cuando el Ag –en la forma de CI– interactúa con la célula B a través del BCR (receptor para el antígeno en la célula B), también lo hace a través de un receptor para la porción Fc de la IgG (FcγR; del inglés, *Fc gamma receptor*) que está presente en la membrana de la célula B denominado FcγRIIB. FcγRIIB es un receptor inhibitorio (posee motivos “ITIM” –del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*– en su porción intracelular⁷³) que exhibe baja afinidad por la IgG y, en consecuencia, se une a la porción Fc de la IgG solo cuando ésta se encuentra formando CI con el Ag. Esta situación de coligamiento a

través del BCR y del FcγRIIB envía dos señales al interior de la célula B virgen, una positiva (vía BCR) y otra negativa (vía FcγRIIB), que son “interpretadas” conjuntamente como un mensaje de regulación (arresto celular), en lugar de activación, y que la conducen a un estado de anergia.⁷⁴ Adicionalmente, la agregación del FcγRIIB en la membrana de la célula B estimula la generación de señales proapoptóticas.⁷⁴ De esta manera, los clones de células B Ag-específicas se mostrarían “tolerantes” (escenario de anergia) y/o estarían ausentes (escenario de la apoptosis) cuando se hace la segunda administración del Ag.

El mecanismo de AMIS pareciera adecuado para explicar la acción profiláctica (tanto inmediata como residual) de la IgRh. No obstante, estudios recientes realizados en ratones no mutantes para el receptor FcγRIIB (ratones mutantes que no expresan dicho receptor) han arrojado una sombra de duda sobre la idea de que éste sea el mecanismo por el cual opera la IgRh en la prevención de la aloinmunización a la proteína RhD. En estos estudios se puso en evidencia que el fenómeno de AMIS ocurre en los ratones FcγRIIB-nocaut de manera normal y similar a como se manifiesta en los ratones silvestres.⁷⁵

En vista de que ni los mecanismos revisados aquí ni otros que se han propuesto^{76, 77} parecen explicar de manera satisfactoria la acción profiláctica de la IgRh, es pertinente proponer una explicación diferente que, por supuesto, tome en cuenta tanto el carácter inmediato como el efecto residual de la IgRh. En este sentido y en atención a los antecedentes examinados, nos ha parecido importante sugerir un mecanismo

alternativo: que la IgRh pueda operar provocando en la madre un asincronismo entre las respuestas mediadas por las células B y T RhD-específicas, y que esta sea la causa de la acción profiláctica. Expliquémonos con un poco más de detalle.

En primer lugar sostengamos que, efectivamente, cuando se administra IgRh a un individuo Rh(-) y en su circulación hay GR Rh(+) ocurre un secuestro rápido y eficaz de estos GR alogénicos por el sistema retículo-endotelial esplénico. *In vitro*, la unión de IgG anti-RhD al GR Rh(+) no conduce a activación del complemento^{78,79} ni a hemólisis; más aún, tampoco es capaz de inducir hemaglutinación, lo cual ha sido atribuido a la relativamente baja densidad y a la poca exposición de la proteína RhD en la superficie del GR.⁶⁵ De esta manera, el secuestro y posterior eliminación de los GR Rh(+) sensibilizados con anti-RhD en el bazo, probablemente no implique el concurso del sistema del complemento. De acuerdo con esto, es posible que los GR alogénicos viajen en la circulación materna e ingresen al parénquima esplénico, a la pulpa roja más concretamente, confundidos entre los GR autólogos, pero recubiertos de moléculas de IgG anti-RhD. El retorno de la sangre desde la pulpa roja a la circulación implica un proceso de filtración a través de un endotelio especializado que reviste los senos venosos.⁸⁰ En este endotelio abundan células del sistema retículo-endotelial (macrófagos esplénicos), lo que permitiría entonces la interacción de los “complejos inmunes” –GR Rh(+): IgG anti-RhD– con estos macrófagos esplénicos y su subsiguiente retención rápida

y selectiva. Esto impediría la ocurrencia de contactos productivos entre los linfocitos B RhD-específicos y los GR Rh(+), evitándose la activación de estos linfocitos. La IgRh actuaría entonces como lo postula la “hipótesis de eliminación del antígeno” e impediría la estimulación del componente humoral de la respuesta inmunitaria anti-RhD. Pero ¿cuál es el destino de los GR alogénicos que interactúan con el sistema retículo-endotelial esplénico? ¿Cuáles mecanismos operan para su destrucción?

En este orden de ideas, los dos mecanismos principales de eliminación deberían ser la fagocitosis inmune y/o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC; del inglés, *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*); ambos supeditados a la unión de la porción Fc γ de los anticuerpos anti-RhD con receptores Fc γ R en la superficie de las células efectoras. El consenso en la literatura es que ambos mecanismos operan, aunque no existen evidencias experimentales directas para apoyar esta suposición. Haciendo un ejercicio teórico, uno podría imaginar una condición “extrema” en la cual hay numerosas moléculas de IgG anti-RhD sobre la superficie de cada GR Rh(+), en cantidad suficiente como para inducir a través de su porción Fc el agrupamiento de los receptores Fc γ R en la membrana de la célula efectora, y así fomentar la eritrofagocitosis de manera preferencial sobre la ADCC. En este escenario, toda la carga antigénica RhD estaría inmediatamente disponible para la maquinaria de procesamiento del fagocito y su posterior presentación en el contexto de moléculas HLA clase II a clo-

nes de linfocitos T cooperadores (Th) cuyo TCR (receptor para el antígeno en la célula T) muestre especificidad por péptidos derivados de la proteína RhD. El “extremo” opuesto sería la situación en la cual cada GR Rh(+) tiene moléculas de IgG anti-RhD unidas, pero no en la cantidad suficiente para estimular la fagocitosis, aunque sí capaces de mediar la unión del GR a la célula efectora y posteriormente el fenómeno de ADCC. En este escenario, el estroma de los GR lisados podría mantenerse unido a la membrana de la célula efectora, pero no estaría disponible para el procesamiento y presentación. Aunque nosotros nos inclinamos a suponer que el destino final del estroma es la fagocitosis, ello constituye una incógnita, puesto que no hay estudios que le den soporte a tal suposición. Para continuar el ejercicio teórico, se podría además concebir un sinnúmero de situaciones intermedias en la ocurrencia de ambos procesos.

En cualquier caso es muy factible que, luego de la rápida captura de los GR alogénicos en el bazo, tenga lugar el procesamiento y presentación antigénica a linfocitos Th RhD-específicos. Si esto es así, la respuesta de células T anti-RhD sería estimulada y deberían expandirse clones de linfocitos Th RhD-reactivos. Evidencia experimental, obtenida mediante el examen de la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica de individuos Rh(-) inmunizados con GR Rh(+) cuando son estimuladas *in vitro* con péptidos sintéticos de la proteína RhD, apunta en este sentido.⁸¹ Bajo tales condiciones, al no haber linfocitos B RhD-específicos que se encuentren

experimentando estimulación a través de su BCR, las células Th RhD-específicas no tendrían a quien ayudar. ¿Qué le sucede a estos clones “huérfanos” de linfocitos Th RhD-específicos? La respuesta a esta pregunta podría ser clave para un mejor entendimiento del mecanismo de acción profiláctica residual de la IgRh. Si estos clones de linfocitos Th se agotan en el tiempo, cuando se realice la administración de GR Rh(+) por segunda vez (de 6 a 10 meses después y en ausencia de IgRh), se podría dar la situación inversa; esto es, hay una adecuada estimulación de la respuesta humoral (los linfocitos B RhD-específicos tienen ahora el tiempo suficiente y la disponibilidad antigénica en la superficie del GR alogénico para garantizar encuentros efectivos y estimulantes), pero los clones de linfocitos Th RhD-específicos ya no están presentes para cooperar. El resultado en este escenario sería que, nuevamente, pero por razones distintas, la cooperación entre las células T y B RhD-específicas no ocurre, y estaría operando el efecto profiláctico inmediato y residual de la IgRh, debido a la inducción de un asincronismo entre los componentes humoral y celular de la respuesta anti-RhD de la madre.

La comprobación experimental de la hipótesis del asincronismo entre las respuestas de las células B y T RhD-específicas resultaría algo complicada de justificar y de realizar en humanos. Ello implicaría el concurso de voluntarios Rh(-) a los que se inyecten GR Rh(+) o mujeres Rh(-) con embarazos Rh(+), a quienes luego de la administración de IgRh se les tendría que tomar muestras de sangre seriadas en el tiempo para

estudiar la producción de anticuerpos y la presencia de células Th anti-RhD alorreactivas, para luego readministrar GR Rh(+), en el caso de los voluntarios, o aguardar por un segundo embarazo Rh(+), en el caso de las madres, y repetir el análisis. Sin embargo, la reciente disponibilidad de un modelo de ratones transgénicos que expresan la proteína HEL (lisozima de huevo de gallina) de manera exclusiva en sus GR⁸² ha creado, por vez primera, un grupo sanguíneo en el ratón de laboratorio, lo cual facilita la posibilidad de estudiar el efecto profiláctico de una IgG específica contra un “aloantígeno” de GR en este modelo.

Ahora bien, si la IgRh funciona tan espléndidamente previniendo la aloinmunización a RhD, y es un producto seguro que ha mostrado no tener efectos colaterales mayores y una eficacia demostrada durante más de cuarenta años de continua administración en cientos de miles de mujeres embarazadas ¿por qué molestarse en encontrarle una explicación a su acción profiláctica? La respuesta tiene dos vertientes. En primer lugar, desde el punto de vista académico-científico, la curiosidad por conocer las intimidades de cómo estas moléculas actúan para resultarnos tan útiles en la vida cotidiana, y la esperanza de que en ese conocimiento se encuentren respuestas a cómo opera el sistema inmunitario humano en otros contextos, son justificaciones más que suficientes. En segundo lugar, y tal vez más importante aún, están otros hechos de orden práctico: con la indicación de la IgRh anteparto (referida al inicio de este capítulo) y el crecimiento poblacional, la demanda de IgRh va en

aumento. Lo anterior se enfrenta al hecho de que, por razones de índole ética vinculadas a riesgos de transmisión de agentes infecciosos,⁸³ la disponibilidad de las mezclas de plasma hiperinmune (que es la materia prima a partir de la cual se prepara la IgRh) se ve cada día más comprometida. Estas razones empujan con fuerza a la comunidad científica y médica hacia la búsqueda de una alternativa a la IgRh. No cabe duda que el camino cierto para encontrarle reemplazo a la IgRh debe pasar por un entendimiento cabal del mecanismo a través del cual actúa.

Anticuerpos monoclonales anti-RhD como posible reemplazo de la IgRh

Una de las opciones que más se ha considerado como posible reemplazo de la IgRh para la profilaxis de la EHRN-Rh son los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-RhD. Los intentos iniciales para producir mAb anti-RhD se realizaron preparando hibridomas de ratón y resultaron un fracaso, ya que el sistema inmunitario del ratón de laboratorio produce una respuesta humoral anti-Rh que no distingue los determinantes antigénicos RhD de los RhCE. Sin embargo, actualmente se dispone de numerosos clones de células productoras de mAb anti-RhD de origen humano. La vasta mayoría de estos mAb humanos (humAb) fueron producidos utilizando variaciones de la tecnología desarrollada inicialmente por Köhler y Milstein,⁸⁴⁻⁸⁷ o a través de la producción de líneas de células linfoblastoides humanas generadas mediante transformación con el virus Epstein-Barr,⁸⁸ lo cual en

esencia implica la “inmortalización” y clonación de las células productoras del anticuerpo. Más recientemente, un número menor de humAb anti-Rh se ha desarrollado mediante la aplicación de técnicas de biología molecular y ADN recombinante,⁸⁹⁻⁹⁴ en las cuales se persigue la clonación e “inmortalización” de los genes que codifican estas proteínas. Un número apreciable de estos humAb anti-RhD ha sido caracterizado *in vitro* en cuanto a su especificidad por los distintos epítomos RhD²³ y en su habilidad para mediar funciones efectoras como la fagocitosis y ADCC.⁹⁵ Unos pocos han sido probados en estudios experimentales realizados en voluntarios Rh(-), con el propósito de calcular su vida media *in vivo*, evaluar su capacidad para mediar la eliminación acelerada de GR Rh(+) y estimar sus bondades como agentes profilácticos en la prevención de la aloinmunización a la proteína RhD, todo ello con el fin último de compararlos con las preparaciones policlonales de IgRh disponibles hoy en día.⁹⁶

Si bien es cierto que los trabajos iniciales de caracterización *in vitro* de los humAb anti-RhD suscitaron gran expectativa acerca de la posible formulación de un reactivo monoclonal que sustituyera las preparaciones de IgRh usadas en la actualidad, los resultados de los estudios *in vivo* no han sido tan alentadores. Efectivamente, a partir de los estudios *in vitro* utilizando GR Rh(+) que expresan formas mutadas de RhD, tales como las variantes RhD parcial a las que se hizo referencia al inicio del capítulo, y otras, ha quedado claro que se dispone de humAb anti-RhD que reconocen una mayoría importante

de los diferentes epítomos RhD presentes en las poblaciones humanas.^{23,27} Por otro lado, los estudios *in vitro* también han permitido la identificación de humAb anti-RhD que se comportan eficazmente en ensayos funcionales de fagocitosis y ADCC mucho mejor que las preparaciones policlonales.⁹⁷ Este tipo de ensayos ha posibilitado además un examen detallado y por separado de las bondades de los isotipos IgG₁ e IgG₃ anti-RhD, que son los dos isotipos presentes en la IgRh, para facilitar la unión de los GR Rh(+) a células efectoras, así como también para mediar la fagocitosis y la ADCC.^{95,98} Más aún, gracias al uso de técnicas de mutagénesis sitio-dirigidas y otras de biología molecular, se han desarrollado formas alteradas de estos anticuerpos. Por ejemplo, algunos poseen modificaciones en la secuencia de aminoácidos correspondiente a lugares específicos en la porción Fc de la molécula, lográndose variantes que no muestran afinidad alguna por los receptores FcγR,^{99,100} pero preservan la capacidad de unión al receptor FcRn,¹⁰¹ y con ello mantienen la propiedad de ser transportados a través de la placenta. Estas formas recombinantes se han propuesto como una posible terapia para aquellos casos en los que la madre Rh(-) ya está sensibilizada y produciendo IgG anti-RhD; así se postula que las formas recombinantes competirían con los anticuerpos anti-RhD maternos, al unirse a los eritrocitos fetales y bloquear el antígeno Rh allí presente, con lo cual se evitaría su secuestro y destrucción en el bazo fetal.¹⁰⁰ Otros son anticuerpos tipo IgG que polimerizan en una forma similar a como lo hace la IgM y adquieren ahora la habilidad de

mediar la aglutinación directa de los GR Rh(+).¹⁰²

Infortunadamente, a pesar de todos estos esfuerzos no ha sido posible formular una alternativa monoclonal a la IgRh. Los resultados de los estudios *in vivo* y el estado actual del desarrollo de los monoclonales anti-RhD para fines profilácticos son un claro testimonio de ello. En primer lugar, hay que decir que el número de humAb anti-RhD que han sido probados *in vivo* (diecinueve anticuerpos, de acuerdo con la literatura consultada) parece discreto si se compara con la cantidad potencialmente disponible (más de cien anticuerpos que han sido estudiados sistemáticamente, de acuerdo con el más reciente *workshop* de la ISBT (*International Society of Blood Transfusion*)).²³ Con estos diecinueve anticuerpos se han realizado catorce estudios *in vivo*,^{99,103-115} pero solo once fueron evaluados en términos de su capacidad profiláctica. La variabilidad de los resultados obtenidos no pudo ser mayor. Sólo dos de los once anticuerpos se comportaron igual o mejor que las preparaciones policlonales previniendo la aloinmunización a RhD;^{108,109} algunos incluso produjeron un incremento en el número de individuos inmunizados,¹⁰⁶ y en los otros casos el número de individuos que resultó protegido fue bastante menor a lo observado con las preparaciones policlonales utilizadas como control.^{103-105,107}

El precario desempeño de los humAb anti-RhD como agentes profilácticos de la aloinmunización a RhD ha dado lugar a la elaboración de una variedad de posibles explicaciones, ninguna de las cuales ha sido definiti-

vamente confirmada o refutada experimentalmente.^{96,106,116} Una de estas hipótesis propone que el “déficit” profiláctico de los humAb anti-Rh puede deberse a la forma particular como los sistemas de expresión empleados para la producción de estas proteínas llevan a cabo la glicosilación de las mismas. La presencia de residuos de carbohidratos diferentes a los encontrados en las preparaciones policlonales de anti-RhD afectaría de diversas maneras la interacción de los humAb anti-Rh con los sistemas efectores de fagocitosis y citotoxicidad mediados por anticuerpo, impactando negativamente su acción profiláctica.⁹⁶ De manera interesante y pertinente, recientemente fueron publicados los resultados de un estudio farmacocinético y de inocuidad realizado en cuarenta y seis voluntarios Rh(-) con un anticuerpo monoclonal denominado roledumab. Roledumab es una IgG₁ recombinante humana anti-RhD, en la que el componente de carbohidrato presente en la porción Fc de la molécula ha sido “optimizado” para interactuar con un receptor Fc activador denominado FcγRIII, el cual le confiere a la molécula una mayor capacidad para mediar ADCC.¹¹⁷ Los hallazgos del estudio indican que roledumab tiene una farmacocinética muy similar a la de los anticuerpos anti-RhD presentes en las preparaciones de IgRh, y no produjo efectos adversos más allá de lo observado con el placebo empleado.¹¹⁸ Un ensayo clínico fase II con roledumab se encontraba en desarrollo en el momento en que se escribía este capítulo.

En nuestra opinión, un aspecto al que no se ha prestado suficiente aten-

ción y que probablemente sea importante para explicar las diferencias entre la IgRh y los humAb anti-RhD en términos de su capacidad para prevenir la isoimmunización a Rh, es el carácter monoespecífico de estos últimos versus la naturaleza poliespecífica de las preparaciones de IgRh. ¿Por qué esto pudiera ser importante? La IgRh está compuesta por una población de moléculas de IgG anti-RhD heterogénea en cuanto a su especificidad por los distintos epítomos de la proteína RhD, la cual brinda la oportunidad de que a cada molécula RhD en la membrana eritrocitaria se una más de una molécula de IgG anti-RhD. En el caso de los humAb anti-RhD esto no es posible; por cada molécula RhD solo una molécula de anticuerpo se puede unir. Esta limitación le permitiría a los linfocitos B cuyos BCR tengan la especificidad adecuada, el reconocimiento en la molécula RhD de los epítomos libres o desocupados, así se facilita la aparición de una respuesta humoral dirigida contra los eritrocitos RhD(+). Además, la relativa poca movilidad¹⁷ y la baja densidad del complejo Rh en la membrana eritrocitaria (se ha calculado que existan entre 10.000 complejos Rh a 30.000 complejos Rh que contienen proteína RhD por GR, dependiendo del fenotipo)³⁷ haría que esta diferencia sea crucial en cuanto a facilitar el proceso de eritrofagocitosis por parte de la IgRh en comparación con los humAb anti-RhD. En otras palabras, al haber solo una molécula de anticuerpo unida por complejo Rh en el caso de los humAb anti-RhD, esto se traduciría en una mediación menos eficiente de la fagocitosis, y ello conduce a una menor capacidad para facilitar el

secuestro rápido de los eritrocitos alógenos en el bazo, lo cual es considerado el mejor indicador de la acción profiláctica de los anticuerpos anti-RhD. Nosotros produjimos y comparamos en ensayos de fagocitosis *in vitro*¹¹⁹ versiones monoméricas y poliméricas de una IgG recombinante anti-RhG (RhG representa un epítomo común a las proteínas RhD y uno de los alelos de RhCE). En las versiones monoméricas, cada molécula de IgG posee solo una porción Fc, mientras que en las versiones poliméricas cada molécula tiene un mínimo de dos hasta un máximo de cinco a seis porciones Fc por molécula. Los GR Rh(+) opsonizados con los anticuerpos monoméricos fueron discretamente fagocitados por macrófagos aislados de la cavidad peritoneal de ratones de laboratorio, mientras que el 100% de los GR opsonizados con las versiones poliméricas de anti-Rh (a una concentración no aglutinante) resultaron fagocitados. De manera interesante y conveniente, en estos estudios no se apreciaron diferencias en cuanto a la incapacidad manifiesta tanto de las formas poliméricas como de las monoméricas de los anticuerpos anti-RhG para activar el complemento.

Si las consideraciones anteriores son correctas, probablemente será necesario utilizar una mezcla de monoclonales con especificidad por epítomos RhD diferentes e independientes y/o emplear versiones recombinantes poliméricas de anti-RhD para lograr una formulación monoclonal que tenga las propiedades profilácticas de la IgRh. De hecho, una mezcla de veinticinco anticuerpos recombinantes anti-RhD ha sido desarrollada recientemente¹²⁰ y

utilizada en ensayos clínicos,¹²¹ como terapia en pacientes Rh(+) que padecen trombocitopenia inmune y a los que no se les ha extirpado el bazo, de la cual se han obtenido resultados similares a los producidos por el tratamiento con anti-RhD policlonal.¹²² Es la impresión de los autores que en la actualidad se dispone del material monoclonal y de la información y conocimiento suficiente para, utilizados estos de la manera adecuada, formular una mezcla de humAb anti-RhD con propiedades profilácticas de la aloinmunización a RhD similares a las que exhibe la IgRh.

Referencias

1. Flegel, W. A., Wagner, F. F. Blutgruppen: Alloantigene auf Erythrozyten. En: Transfusionsmedizin, 2003. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, eds.: Berlin: Springer. pp. 145-85.
2. Westhoff, C. M. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion*. 2004; 44: 1663-73.
3. Soupene E, King N, Feild E, Liu P, Niyogi KK, Huang C-H, Kustu S. Rhesus expression in a green alga is regulated by CO₂. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2002; 99: 7769-73.
4. Endeward, V., Cartron, J. P., Ripoche, P., Gros, G. RhAG protein of the Rhesus complex is a CO₂ channel in the human red cell membrane. *Faseb J.*, 2008; 22: 64-73.
5. Callebaut, I., Dulin, F., Bertrand, O., Ripoche, P., Mouro, I., Colin, Y., Mornon, J. P., Cartron, J. P. Hydrophobic cluster analysis and modeling of the human Rh protein three-dimensional structures. *Transfusion Clin Biol.*, 2006; 13: 70-84.
6. Bruce, L. J., Beckmann, R., Leticia, Ribeiro, M., Peters, L. L., Chasis, J. A., Delaunay, J., Mohandas, N., Anstee, D. J. and Tanner, M. J. A. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood*, 2003; 101: 4180-8.
7. Burton, N. M., Anstee, D. J. Structure, function and significance of Rh proteins in red cells. *Current Opinion Hematol.* 2008; 15: 625-30.
8. Marini, A. M., Matassi, G., Raynal, V., Andre, B., Cartron, J. P., Cherif-Zahar, B. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat Genet.*, 2000; 26: 341-4.
9. Bruce, L. J., Guizouarn, L., Burton, N. M., Gabillat, N., Poole, J., Flatt, J. F., Brady, R. L., Borgese, F., Delaunay, J., Stewart, G. W. The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. *Blood*, 2009; 113: 1350-7.
10. Moore, S., Green, C. The identification of specific Rhesus-polypeptide-blood-group-ABH-active-glycoprotein complexes in the human red-cell membrane. *Bioch J.*, 1987; 244: 735-41.
11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/systems_alleles&system=rh
12. <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>
13. Mason, D. et al. CD antigens 2002. *Blood*, 2002; 99: 3877-80.
14. Apoil, P. A., Blancher, A. Rh gene evolution in primates: study of intron sequences. *Mol Biol Evol.*, 2000; 17: 127-36.
15. Wagner, F. F., Flegel, W. A. RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. *Blood*, 2002; 99: 2272-3.
16. Flegel, W. A. The genetics of the Rhesus blood group system. *Dtsch Arztebl.*, 2007; 104(10): A 651-7.
17. Van Kim, C. L., Colin, Y., Cartron, J. P. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev.*, 2006; 20: 93-110.
18. Westhoff, C. M. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex. *Seminars in Hematol.*, 2007; 44: 42-50.
19. Daniels, G. L, et al. ISBT committee on terminology for red blood cell surface antigens: Macao report. *Vox Sang.*, 2009; 96: 153-6.
20. Mattila, P. S., Seppala, I. J. T., Eklund, J., Makela, O. Quantitation of immunoglobulin classes and subclasses in anti-Rh(D) antibodies. *Vox Sang.*, 1985; 48: 350-6.

21. Urbaniak, S. J. Alloimmunity to RhD in humans. *Transfusion Clin Biol.*, 2006; 13: 19-22.
22. Poole, J., Daniels, G. Blood Group Antibodies and Their Significance in Transfusion Medicine. *Transfusion Med Rev.*, 2007; 21: 58-71.
23. Scott, M. Section 1A: Rh serology Coordinator's report. *Transfusion Clin Biol.*, 2002; 9: 23-9.
24. Wagner, F. F., Flegel, W. Review: The molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematol.*, 2004; 20: 23-36.
25. Flegel, W. A. Molecular genetics of RH and its clinical application. *Transfusion Clin Biol.*, 2006; 13: 4-12.
26. Liu, W., Avent, N. D., Jones, J. W., Scott, M. L., Voak, D. Molecular configuration of Rh D epitopes as defined by site-directed mutagenesis and expression of mutant Rh constructs in K562 erythro leukemia cells. *Blood*, 1999; 94: 3986-96.
27. Scott, M. Rh serology-Coordinator's report. *Transfusion Clin Biol.*, 1996; 3: 333-7.
28. Flegel, W. A. The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfusion*, 2007; 5: 50-7.
29. Von Zabern, I., Wagner, F. F., Moulds, J. M., Moulds, J. J., Flegel, W. A. D category VI: a group of clinically relevant and phylogenetically diverse partial D. *Transfusion*, 2013. doi: 10.1111/trf.12145 (Epub ahead of print).
30. Diamond, L. K., Blackfan, K. D., Baty, J. M. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. *J Pediatr.*, 1932; 1: 269-309.
31. Hawksley, J. C., Lightwood, R. A contribution to the study of erythroblastosis: icterus gravis neonatorum. *Quart J Med.*, 1934; 3: 155-209.
32. Gilmour, J. R. Erythroblastosis fetalis. *Arch Dis Child*, 1944; 19: 1-25.
33. Bourgeois, L. Observations diverses, sur le aterilité, perte de fruit, foecondité, accouchements, et maladies des femmes, et enfants nouveaux naiz. 1609. Paris: Abraham Saugrain.
34. Darrow, R. R. Icterus gravis (erythroblastosis) neonatorum. An examination of etiologic considerations. *Arch Pathol.*, 1938; 25: 378-417.
35. Levine, P., Burnham, L., Katzin, W. M., Vogel, P. The role of isoimmunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. *Am J Obstet Gynecol.*, 1941; 42: 925-37.
36. Villegas Cruz, D., Durán Menéndez, R., Alfonso Dávila, A., López De Roux, M., Cortina, L., Vilar Carro, M., Orbeal Aldama, L. Enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad ABO. *Rev Cubana Pediatr.*, 2007; 79(4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475312007000400002&lng=es.
37. Mollison, P. L., Engelfriet, C. P., Contreras, M. *Blood transfusion in clinical medicine*, 9th Ed. Blackwell Science, Oxford, UK. 1997.
38. Stern, K., Goodman, H. S., Berger, M. Experimental isoimmunization to hemo-antigens in man. *J Immunol.*, 1961; 87: 189-98.
39. Contreras, M. The prevention of Rh haemolytic disease of the fetus and newborn - general background. *British J of Obstetrics and Gynaecol.*, 1998; 105: 7-10.
40. Bowman, J. M., Chown, B., Lewis, M., Pollock, J. M. Rh isoimmunisation during pregnancy: antenatal prophylaxis. *Can Med Assoc J.*, 1978; 118: 623-7.
41. Thornton, J. G., Page, C., Foote, G., Arthur, G. R., Tovey, L. A. D., Scott, J. S. Efficacy and long term effects of antenatal prophylaxis with anti-D immunoglobulin. *British Med J.*, 1989; 298: 1671-3.
42. Urbaniak, S. J. The scientific basis of antenatal prophylaxis. *British J Obstetrics & Gynaecol.*, 1998; 105:11-8.
43. Müller, S. P., Bartels, I., Stein, W., Emons, G., Gutensohn, K., Köhler, M., Legler, T. J. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion*, 2008; 48: 2292-301.
44. Finning, F., Martin., Daniels, G. The use of maternal plasma for prenatal RhD blood group genotyping. Capítulo 11 del libro "DNA and RNA profiling in human blood. Methods and Protocols". pp. 143-160. Editado por Peter Bugert. Humana Press, 2009.

45. Illanes, S., Soothill, P. Management of red cell alloimmunization in pregnancy: the non-invasive monitoring of the disease. *Prenatal Diagnosis*, 2010; 30: 668-73.
46. De Haas, M., van der Schoot, E. Prenatal screening. *ISBT Sci Series*, 2013; 8: 6-10.
47. Yu, X., Wagner, F. F., Witter, B., Flegel, W. A. Outliers in RhD membrane integration are explained by variant RH haplotypes. *Transfusion*, 2006; 46: 1343-51.
48. Pirelli, K. J., Pietz, B. C., Johnson, S. T., Pinder, H. L., Bellissimo, D. B. Molecular determination of RHD zigosity: predicting risk of hemolytic disease of the fetus and newborn related to anti-D. *Prenatal Diagnosis*, 2010; 30: 1207-12.
49. Moise, K. J., Argoti, P. S. Management and prevention of red cell alloimmunization in pregnancy: a systematic review. *Obstetrics & Gynecol.*, 2012; 120(5): 1132-9.
50. Crowther, C. A., Middleton, P., McBain, R. D. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2013; 2: CD000020.
51. ACOG practice bulletin. Prevention of Rh D alloimmunization. Number 4, May 1999 (replaces educational bulletin Number 147, October 1990). Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. American College of Obstetrics and Gynecology. *Int J Gynaecol Obstet.*, 1999; 66: 63-70.
52. Liunbruno, G. M., D'Alessandro, A., Rea, F., Piccinini, V., Catalano, L., Calizzani, G., Pupella, S., Grazzini, G. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunisation. *Blood Transfusion*, 2010; 8(1): 8-16.
53. Insunza, A., Behnke, E., Carrillo, J. Enfermedad hemolítica perinatal: manejo de la embarazada RhD negativo. *Rev Chil Obstet Ginecol.*, 2011; 76(3): 188-206.
54. Sebring, E. S., Polesky, H. F. Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. *Transfusion*, 1990; 30: 344-57.
55. Pollack, W., Ascari, W. Q., Kochesky, R. J., O'Connor R. R., Ho, T. Y., Tripodi, D. Studies on Rh prophylaxis. I. relationship between doses of anti-Rh and size of antigenic stimulus. *Transfusion*, 1971; 11: 333-9.
56. Rodríguez Villanueva, J. Prevención de la aloimmunización materna con gammaglobulina anti-D. *Boletín SETS*, 2007; 9(2): 4-9.
57. Mazzi Gonzales de Prada, E., Crespo García, R., Canedo de Guzmán, B., Flores Lizarazu, E., Ramiro Quispe, E., Miranda Aguilar, C. Estudio de grupos sanguíneos y factor Rh en una población de La Paz, Bolivia. *Rev Soc Bol Ped.*, 2000. Vol 39 N° (1).
58. Salcedo, J., Rojas, P., Sánchez, C., Rocha, R., Escalera, J. C. Infección por Chagas y determinación de grupos sanguíneos en escolares de Tacopaya-Arque. *Revista del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud de Univalle-Cochabamba*. Ed. Agosto 2004.
59. Linares, J. Prevención de la Incompatibilidad Rh. En: Zighelboim I. (Ed.) *Actualidades en reproducción humana y perinatología*. Zighelboim I. 1982, 399-418.
60. Prevención de la isoimmunización materna al antígeno RhD. *Salud Pública México*, 2004; 46(3): 193-201.
61. Reglamento a la Ley de Maternidad Gratuita y de Atención a la Infancia. Ministerio de Salud Pública de Ecuador. 12 de junio del 2002.
62. Enfermedad hemolítica perinatal. Control inmunohematológico y profilaxis. Recomendaciones para el equipo perinatal. Dirección de Maternidad e Infancia. Ministerio de Salud. Agosto 2010.
63. Ley Nacional de Sangre N° 22.990. Decreto Reglamentario N° 1338 30/09/04. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. República Argentina.
64. Normas Técnicas y Administrativas. Resolución 797/20135. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. República Argentina. Julio 3 de 2013.
65. Mollison, P. L., Hughes-Jones, N. C., Lindsay, M., Wessely, J. Suppression of primary Rh immunization by passively-administered antibody. Experiments in volunteers. *Vox Sang.*, 1969; 16: 421-39.
66. Hughes-Jones, N. C., Mollison, P. L., Veal, N. Removal of incompatible cells by the spleen. *British J. Haematol*, 1957; 3: 125-33.

67. Brinc, D., Denomme, G.A., Lazarus, A. H. Mechanism of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn: what can we learn from rodent models. *Current Opinion Hematol.*, 2009; 19: 488-96.
68. Gorman, J. G., Freda, V. J., Pollack, W. J., Robertson, J. G. Protection from immunization in Rh-incompatible pregnancies. A progress report. *Bull NY Acad Med.*, 1966; 42: 458-73.
69. Pollack, W., Gorman, J. G., Hager, H. J., Freda, V. J., Tripodi, D. Antibody-mediated immune suppression to the Rh factor: animal models suggesting mechanism of action. *Transfusion*, 1968; 8: 134-45.
70. Elson, C. J., Woodrow, J. C., Donohoe, T. A. Clearance of erythrocytes and the immune response. An experimental study. *Vox Sang.*, 1971; 20: 201-8.
71. Henry, C., Jerne, N. K. Competition of 19S and 7S antigen receptors in the regulation of the primary immune response. *J Exp Med.*, 1968; 128: 133-52.
72. Heyman, B. Regulation of antibody response via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu Rev Immunol.*, 2000; 18: 709-37.
73. Muta, T., Kurosaki, T., Misulovin, Z., Sánchez, M., Nussenzweig, C., Ravetch, J. F. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature*, 1994; 368:70-3.
74. Ravetch, J. V., Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol.*, 2001; 19: 275-90.
75. Karlsson, M. C. I., Wernersson, S., Díaz de Stahl, T., Gustavsson, S., Heyman, B. Efficient IgG mediated suppression of primary antibody responses in Fcγ receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1999; 96: 2244-9.
76. Kumpel, B., Elson, C. J. Mechanism of anti-D-mediated immunosuppression – a paradox awaiting resolution? *Trends in Immunol.*, 2001; 22:26-31.
77. Kumpel, B. M. On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. *Transfusion*, 2006; 46: 1652-6.
78. Freedman, J., Massey, A., Chaplin, H., Monroe, M. C. Assessment of complement binding by anti-D and anti-M antibodies employing labelled antiglobulin antibodies. *British J Haematol.*, 1980; 45: 309-18.
79. Contreras, M., Mollison, P. L. Immunological complications of transfusion. *British Med J.*, 1990; 300: 173-6.
80. Mebius, R. E., Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.*, 2005; 5: 606-16.
81. Stott, L., Barker, R. N., Urbaniak, S. J. Identification of alloreactive T-cell epitopes on the Rhesus D protein. *Blood*, 2000; 96: 4011-9.
82. Hendrickson, J. E., Saakadze, N., Cadwell, C. M., Upton, J. W., Mocarski, E. S., Hillyer, C. D., Zimring, J. C. The spleen plays a central role in primary humoral alloimmunization to transfused mHEL red blood cells. *Transfusion*, 2009; 49: 1678-84.
83. Bowman, J. Rh-immunoglobulin: Rh prophylaxis. *Best Pract & Res Clin Haematol.*, 2006; 19: 27-34.
84. Kohler, G., Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*, 1975; 256: 495-7.
85. Glassy, M. C. Production methods for generating human monoclonal antibodies. *Human Antibodies & Hybridomas*, 1993; 4: 154-65.
86. Thompson, K. M., Hough, D. W., Maddison, P. D., Melamed, M. D., Hughes-Jones, N. C. The efficient production of stable, human monoclonal antibody-secreting hybridomas from EBV-transformed lymphocytes using the mouse myeloma X63-Ag8.653 as a fusion partner. *J Immunol Meth.*, 1986; 94: 7-12.
87. Montaña, R. F., Romano, E. L. Human monoclonal anti-Rh antibodies produced by human-mouse heterohybridomas express the Gal a(1-3) Gal epitope. *Human Antibodies and Hybridomas*, 1994; 5: 152-6.
88. Steinitz, M., Klein, G., Koskimies, S., Makel, O. EB-virus induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature*, 1977; 269: 420-2.
89. Siegel, D. L., Silberstein, L. E. Expression and characterization of recombinant anti-Rh(D) antibodies on filamentous phage: a model system for isolating human red blood cell antibodies by repertoire cloning. *Blood*, 1994; 83: 2334-44.

90. Hughes-Jones, N. C., Gorick, B. D., Bye, J. M., Finnern, R., Scott, M. L., Voak, D., Marks, J. D., Ouwehand, W. H. Characterization of human blood group scFv antibodies derived from a V gene phage-display library. *British J Haematol.*, 1994; 88: 180-6.
91. Dziegiel, M., Nielsen, L. K., Andersen, P. S., Blancher, A., Dickmeiss, E., Engberg, J. Phage display used for gene cloning of human recombinant antibody against the erythrocyte surface antigen, rhesus D. *J Immunol Meth.*, 1995; 182: 7-19.
92. Edelman, L., Margaritte, C., Chaabihi, H., Monchâtre, E., Blanchard, D., Cardona, A., Morin, F., Dumas, G., Petres, S., Kaczorek, M. Obtaining a functional recombinant anti-rhesus (D) antibody using the baculovirus-insect cell expression system. *Immunol.*, 1997; 91: 13-9.
93. Miescher, S., Zahn-Zabal, M., De Jesus, M., Moudry, R., Fisch, I., Vogel, M., Kobr, M., Imboden, M. A., Kragten, E., Bichler, J., Mermod, N., Stadler, B. M., Amstutz, H., Wurm, F. CHO expression of a novel recombinant IgG1 anti-Rh D antibody isolated by phage display. *British J Haematol.*, 2000; 111: 157-66.
94. Proulx, C., Boyer, L., St-Amour, I., Bazin, R., Lemieux, R. Higher affinity human D MoAb prepared by light -chain shuffling and selected by phage display. *Transfusion*, 2002; 42: 59-65.
95. Kumpel, B. M., Beliard, R., Brossard, Y., Edelman, L., de Haas, M., Jackson, D. J. et al. Section 1c. Assessment of the functional activity and IgG Fc receptor utilisation of 64 IgG Rh monoclonal antibodies. Coordinator's report. *Transfusion Clin Biol.*, 2002; 9: 45-53.
96. Kumpel, B. M. Efficacy of RhD monoclonal antibodies in clinical trials as replacement therapy for prophylactic anti-D immunoglobulin: more questions than answers. *Vox Sang.*, 2007; 93: 99-111.
97. Kumpel, B. M. Monoclonal anti-D for prophylaxis of RhD haemolytic disease of the newborn. *Transfusion Clin Biol.*, 1997; 4: 351-6.
98. Kumpel, B. M., Jackson, D. J. Characterization and functional activity of human Rh monoclonal antibodies. *Transfusion Clin Biol.*, 1996; 6: 453-8.
99. Armour, K. L., Parry-Jones, D. R., Beharry, N., Ballinger, J. R., Mushens, R., Williams, R. K., Beatty, C., Stanworth, S., Lloyd-Evans, P., Scott, M., Clark, M. R., Peters, A. M., Williamson, L. M. Intravascular survival of red cells coated with a mutated human anti-D antibody engineered to lack destructive activity. *Blood*, 2006; 107: 2619-26.
100. Nielsen, L. K., Green, T. H., Sandlie, I., Michaelsen, T. E., Dziegiel, M. H. In vitro assessment of recombinant, mutant immunoglobulin G anti-D devoid of hemolytic activity for treatment of ongoing hemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfusion*, 2008; 48: 12-9.
101. Rojas, R., Apodaca, G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cel Biol.*, 2002; 3: 1-12.
102. Montano, R. F., Penichet, M. L., Blackall, D. P., Morrison, S. L., Chintalacharuvu, K. R. Recombinant polymeric IgG anti-Rh: a novel strategy for development of direct agglutinating reagents. *J Immunol Meth.*, 2009; 340: 1-10.
103. Crawford, D. H., Teesdale, P. E., Contreras, M., Crusz, T. A. M., Harrison, J. F., Huehns, E. R. In Vivo Use of Human Monoclonal Anti-RhD Antibody. Abstracts of XX Congress of ISBT and BBTS, 1988: 270.
104. Kumpel, B. M., Goodrick, M. J., Pamphilon, D. H., Fraser, I. D., Poole, G. D., Morse, C., Standen, G. R., Chapman, G. E., Thomas, D. P., Anstee, D. J. Human Rh D monoclonal antibodies (BRAD-3 and BRAD-5) cause accelerated clearance of Rh D+ red blood cells and suppression of Rh D immunization in Rh D- volunteers. *Blood*, 1995; 86: 1701-9.
105. Smith, N. A., Ala, F. A., Lee, D., Love, E. M., Makar, Y. F., Pamphilon, D. H., Goodrick, M. J., Duguid, J. K., Kumpel, B. M., McNeill, D., Poole, G. D., Chapman, G. E., Thomas, D. P., Harman, C. T. A multi-centre trial of monoclonal anti-D in the prevention of Rh-immunisation of RhD- male volunteers by RhD+ red cells. *Transfusion Med.*, 2000; 10 (Suppl. 1): 8.
106. Béliard, R. Monoclonal antibodies to prevent alloimmunization: lessons from clinical trials. *Transfusion Clin Biol.*, 2006; 13: 58-64.

107. Olovnikova, N. I., Belkina, E. V., Drize, N. I., Lemeneva, L. N., Miterev Gyw, Nikolaeva, T. L., Chertkov, I. L. Fast clearance of Rhesus positive erythrocytes by monoclonal anti-Rhesus antibodies – insufficient condition for effective prevention of Rhesus sensitization. *J Exp Biol Med.*, 2000; 129: 77-81.
108. Chauhan, A. R., Bhattacharyya, M. S., Turakhia, N., Daftary, G.V. Efficacy and safety of monoclonal anti-D immunoglobulin in comparison with polyclonal anti-D immunoglobulin in prevention of Rho immunization. *J Assoc Physicians India*, 2002; 50:1341-2.
109. Miescher, S., Spycher, M. O., Amstutz, H., de Haas, M., Kliijer, M., Kalus, U. J., Radtke, H., Hubsch, A., Andresen, I., Martin, R. M., Bichler, J. A single recombinant anti-RhD IgG prevents Rhesus D immunization: association of RhD positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the Fc γ RIIA and IIIA genes. *Blood*, 2004; 103: 4028-35.
110. Crawford, D. H., Azim, T., Daniels, G. L., Huehns, E. R. Monoclonal antibodies to the Rh D antigen; in Cash JD (ed.) *Progress in Transfusion Medicine*. Edinburgh, UK, Churchill Livingstone, 1988; 3: 175-97.
111. Thomson, A., Contreras, M., Gorick, B., Kumpel, B., Chapman, G. E., Lane, R. S., Teesdale, P., Hughes-Jones, N. C., Mollison, P. L. Clearance of Rh D-positive red cells with monoclonal anti-D. *Lancet*, 1990; 336: 1147-50.
112. Urbaniak, S. J., Greiss, M. A., Perera, W. S., Inskip, M., Flowitt-Hill, D., Armstrong-Fisher, S. S., Templeton, G., Downing, I., Fraser, R., Carter, M. C., Prowse, C. V. Assessment of in vivo function of IgG1 and IgG3 monoclonal anti-D by clearance of Tc99 labelled autologous rhesus D positive red blood cells. *Transfusion*, 1998; 38 (Suppl.): 33S.
113. Olovnikova, N. I., Belkina, E. V., Berkovsky, A. L., Lemeneva, L. N., Nikolaeva, T. L., Chertkov, I. L. Monoclonal anti-D immunoglobulin for the prophylaxis of hemolytic disease of the newborn. *Int J Gynaecol Obstet.*, 1994; 39: 3-6.
114. Cortey, A., Brossard, Y., Beliard, R., Bourel, D. Recommandations pour la pratique clinique. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D feto-maternelle. *Perspectives. J Gynecol Obstet Biol Reprod.*, 2006; 35 (Suppl. 1): 1S119-1S122.
115. Chapman, G. E., Ballinger, J. R., Norton, M. J., Parry-Jones, D. R., Beharry, N. A., Cousins, C., Dash, C. H., Peters, A. M. The clearance kinetics of autologous RhD-positive erythrocytes coated ex vivo with novel recombinant and monoclonal anti-D antibodies. *Clin Exp Immunol.*, 2007; 150: 30-41.
116. Kumpel, B. M. In vivo studies of monoclonal anti-D and the mechanism of immune suppression. *Transfusion*, 2002; 9: 9-14.
117. Beliard, R., Waegemans, T., Notelet, D., Massad, L., Dhainaut, F., Romeuf, C. D., Guemas, E., Haazen, W., Bourel, D., Teillaud, J. L., Prost, J. F. A human anti-D monoclonal antibody selected for enhanced Fc γ RIII engagement clears RhD+ autologous red cells in human volunteers as efficiently as polyclonal anti-D antibodies. *British J Haematol.*, 2008; 141(1): 109-19.
118. Yver, A., Homery, M. C., Fuseau, E., Guemas, E., Dhainaut, F., Quagliaroli, D., Beliard, R., Prost, J. F. Pharmacokinetics and safety of roledumab, a novel human recombinant monoclonal anti-RhD antibody with an optimized Fc for improved engagement of Fc γ RIII, in healthy volunteers. *Vox Sang.*, 2012; 103: 213-222.
119. Díaz, D. Construcción y caracterización estructural y funcional de proteínas de fusión IgG-IgM con especificidad anti-RhG. Tesis de PhD. IVIC, 2009.
120. Frandsen, T. P. et al. Consistent manufacturing and quality control of a highly complex recombinant polyclonal antibody product for human therapeutic use. *Biotechnol & Bioengineering*, 2011; 108(9): 2171-81.
121. Robak, T. et al. Rozrolimupab, a mixture of 25 recombinant human monoclonal RhD antibodies, in the treatment of primary immune thrombocytopenia. *Blood*, 2012; 120(18): 3670-6.
122. Robak, T., Trelinski, J., Flensburg, M. F., Naested, H., Petersen, J. Rozrolimupab, a mixture of recombinant human monoclonal anti-D antibodies, for the treatment of primary immune thrombocytopenia – a review. *ISBT Science Series*, 2013; 8: 102-8.

Control inmunohematológico de la gestante

EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ*

Introducción

La enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (EHFRN) continúa siendo una complicación vigente de la gestación.¹ La aloinmunización anti-Rh(D) se sigue detectando con una frecuencia superior a la esperada para un fenómeno susceptible de ser evitado con la administración correcta de gammaglobulina anti-D (IgG anti-D) a las dosis establecidas y con el calendario previsto.^{2,3} Por otra parte, la generalización del estudio de anticuerpos (Acs) irregulares a todas las gestantes, independientemente de su grupo Rh(D), ha

* Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. emuniz@bst.cat

contribuido a la detección de otras especificidades con capacidad de inducir una EHFRN. En este grupo se inscriben los anticuerpos de especificidad anti-K y anti-c, los más frecuentes tras los de especificidad anti-Rh(D), que suelen detectarse en gestantes que refieren antecedentes transfusionales con hematíes no fenotipados para los correspondientes antígenos.^{4,5} Los flujos migratorios producidos en los últimos años también han propiciado la aparición en determinados países, como es el caso de España, de especificidades hasta ahora muy infrecuentes o incluso desconocidas en nuestro medio, así como un cierto incremento del número de casos de EHFRN causados por anticuerpos anti-Rh(D) y/o por otras especificidades menos comunes.⁶

En los últimos años se han producido importantes avances técnicos en el ámbito del laboratorio y de la clínica obstétrica, que en su conjunto mejoran notablemente el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la EHFRN. La posibilidad de conocer el genotipo *RHD* fetal a partir de una muestra de plasma materno constituye probablemente el avance más importante en la historia de esta enfermedad después de la introducción de la profilaxis con IgG anti-D. El empleo ordinario de esta técnica ya es una realidad en algunos países europeos, y en muchos otros se sigue avanzando hacia la implantación sistemática de la prueba dentro del programa profiláctico, de tal manera que la administración de la IgG anti-D se limite exclusivamente a las gestantes inequívocamente portadoras de un feto Rh(D) positivo. Las técnicas moleculares también nos permiten

determinar de forma exacta el grado de cigosidad *RHD*, diferenciando a los individuos homocigotos (D/D) de los heterocigotos (D/-), y proporcionar un consejo genético más seguro del que posibilitaba, hasta ahora, el cálculo del genotipo más probable. En el plano obstétrico, la ecografía y el doppler con determinación del pico sistólico de velocidad de la arteria cerebral media se están afianzando como las herramientas más útiles para el control del feto y la valoración del grado de afectación fetal. Paralelamente, los criterios de transfusión fetal son cada vez más restrictivos, ya que la experiencia ha demostrado la buena tolerancia de los fetos ante situaciones de anemia, incluso grave, lo cual hace aconsejable una actitud transfusional lo más conservadora posible.

La vigencia de la EHFRN y la necesidad de actualizar nuestros conocimientos sobre la misma para abordar con éxito su diagnóstico y prevención, sirvieron de estímulo para que un grupo de profesionales pertenecientes a la Sociedad Española de Transfusión (SETS) y a la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) decidiera elaborar un protocolo de consenso. La iniciativa se adoptó con el convencimiento de que sólo una estrategia multidisciplinaria, diseñada y consensuada entre obstetras y hematólogos expertos en medicina transfusional, puede permitir el control de esta enfermedad o, lo que es igual, la desaparición o la reducción al mínimo de los casos de EHFRN producidos por anticuerpos anti-Rh(D), el diagnóstico precoz de la aloinmunización frente a otros antígenos eritrocitarios y la aplicación de un programa

profiláctico lo más racional y avanzado posible⁷ (Tabla 1).

En este apartado del capítulo dedicado a la EHFRN se revisa el control inmunohematológico actual de las gestantes de acuerdo con las directrices establecidas en nuestro protocolo de consenso SETS/SEGO que ofrecemos a toda la comunidad latinoamericana. El análisis detallado de algunas de las pruebas y exploraciones que se mencionan es tratado en otros apartados de este y otros capítulos del libro, de manera que este texto se centra preferentemente en las pruebas serológicas y en el cronograma de las mismas.

Determinaciones analíticas comunes durante el primer trimestre

En todas las gestantes, ya sean portadoras de un grupo Rh(D) positivo o negativo, se deben realizar las siguientes pruebas analíticas coincidiendo con la primera visita al obstetra, y siempre en el **primer trimestre**:

- Grupo ABO y Rh(D)
- Escrutinio de anticuerpos eritrocitarios irregulares (EAI), también denominado Coombs indi-

recto en referencia a la técnica empleada.

Si el resultado del EAI es positivo se procederá a investigar la especificidad del anticuerpo.

Identificación de las muestras

Las solicitudes y las muestras de las gestantes deben estar correctamente identificadas incluyendo los siguientes requisitos: apellidos y nombre, fecha de nacimiento y número unívoco de identificación.

El laboratorio debe de conocer los antecedentes clínicos, transfusionales y obstétricos de la gestante.

Tipaje Rh(D)

Se recomienda emplear un reactivo monoclonal (IgM) que no reconozca las variantes DVI.⁸

Las muestras se examinarán por duplicado, a menos que se emplee un equipo automatizado con transferencia electrónica de los resultados.

El test directo de la antiglobulina no debe utilizarse con la finalidad de confirmar el carácter Rh(D) negativo de las muestras de gestantes que son o aparentan ser Rh(D) negativo.

Tabla 1. Objetivos del control inmunohematológico de la gestante

1. Detectar las gestantes Rh(D) negativo candidatas a recibir profilaxis con gammaglobulina anti-D.
2. Detectar, lo más precozmente posible, una aloinmunización tanto en las mujeres D positivo como en las D negativo.
3. Poner en marcha el programa de prevención de la EHRN, inmunohematológico y obstétrico, dirigido a evitar o a reducir el riesgo de afectación fetal.

Si la aglutinación obtenida no se corresponde con la que habitualmente presentan las muestras Rh(D) positivo, se recomienda catalogar la muestra de forma provisional como Rh(D) negativo, hasta que un laboratorio de referencia determine definitivamente su carácter Rh(D) positivo o negativo.

Los profesionales implicados en el programa profiláctico antenatal deben informar a la gestante que es portadora de un grupo Rh(D) negativo y, como tal, candidata al tratamiento con IgG anti-D de acuerdo con el calendario previsto. También se recomienda que estos profesionales dispongan de “Guías de uso de IgG anti-D” en las que se establezcan de forma clara las indicaciones, las dosis y las vías de administración. Finalmente, es aconsejable que las candidatas a recibir profilaxis sean provistas de un carné o ficha en el que se indique de modo evidente su grupo sanguíneo Rh(D) negativo.

Escrutinio e identificación de Acs irregulares

La técnica de la antiglobulina indirecta (Coombs indirecto) con incubación a 37 °C es la técnica de elección para el escrutinio e investigación de Acs irregulares antieritrocitarios.

El escrutinio sistemático de Acs irregulares con hematíes tratados enzimáticamente no aporta ningún valor adicional.

La titulación anti-A y/o anti-B no es necesaria porque no permite predecir la EHFRN por incompatibilidad ABO materno-fetal.

En los hematíes empleados para el EAI deben estar representados los si-

guientes antígenos: C, c, D, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, M, N, Le^a.

Es recomendable que una célula de escrutinio sea R₁R₁ y otra R₂R₂ y que los antígenos Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S y s estén presentes en forma homocigota en una de las células.

No deben efectuarse mezclas de diferentes hematíes para su empleo en el EAI.

No es imprescindible que los antígenos Cw, Kp^a y Lu^a estén presentes en las células de escrutinio. No obstante, todavía es un tema controvertido^{9,10} si debe realizarse un EAI especial en las gestantes incorporando células que nos permita examinar algunos de estos Acs de baja frecuencia o, como alternativa, llevar a cabo una identificación en el panel completo donde algunos de estos antígenos suelen estar representados, como es el caso de Cw.

Titulación

La titulación de los anticuerpos de especificidad anti-Rh(D) se debe realizar preferentemente con células R₂R₂. Las restantes especificidades, por el contrario, deben titularse con hematíes heterocigotos.

Anti-D pasivo versus anti-D inmune

Cuando la gestante recibe IgG anti-D, el anti-D pasivo se detecta en el EAI. En estos casos no es posible diferenciar el anti-D pasivo de un anti-D inmune. La vida media del anti-D pasivo es de tres semanas aproximadamente, pero su presencia puede ser detectada, dependiendo de la sensibilidad de la técnica, hasta tres o más meses después.

Si se demuestra que la gestante recibió IgG anti-D en las ocho semanas precedentes, y el anticuerpo es débil, se aconseja mantener el calendario de profilaxis.

Si no hay evidencia de administración de IgG anti-D en las semanas previas, se aconseja monitorizar el anticuerpo cada cuatro semanas hasta la semana 28, y cada quince días después de la semana 28:

- Si el anticuerpo se debilita progresivamente e incluso desaparece, cabe pensar que se trata de un anticuerpo pasivo.
- Por el contrario, si el título se mantiene o incrementa hay que pensar en un anticuerpo de origen inmune.
- Si continúan las dudas respecto a la naturaleza del anticuerpo se recomienda mantener el programa de profilaxis antenatal.

Anti-D+C versus anti-G

Una proporción de muestras con una aparente especificidad anti-D+C puede corresponder a una especificidad anti-G acompañadas o no de anti-D y/o anti-C. En algunos casos un título de anti-C claramente superior al de anti-D sugiere la presencia de anti-G, pero esta premisa no se cumple siempre. Las consecuencias clínicas y el interés de conocer la composición exacta de los Acs presentes en la muestra estriban en que si la gestante es portadora de un anti-G sin anti-D debe seguir el programa profiláctico antenatal con IgG anti-D, lo que no sería necesario si la presencia de anti-D fuera real.¹¹

Estos casos deben ser remitidos a un laboratorio de referencia para discrimi-

nar la relación exacta de Acs presentes en la gestante y establecer la pauta profiláctica que corresponda.

Anti-D débil detectado en autoanalizador

Las gestantes en las que se detecta un anti-D débil en autoanalizador es posible que no estén inmunizadas. En un estudio, 206 de 236 gestantes con un anti-D débil detectado en autoanalizador no presentaron progresión de la inmunización, a pesar de ser portadoras de un hijo Rh(D) positivo. Por esta razón, se aconseja que en estos casos se administre la dosis de IgG anti-D posparto.⁸

Determinaciones analíticas en el curso de la gestación

1. Protocolo en las gestantes no sensibilizadas (EAI negativo en el primer trimestre de la gestación) (Figura 1)

1.1. Gestante Rh(D) positivo

Debe repetirse el EAI en el último trimestre (24-34 semanas), pues cabe la posibilidad de que se haya producido una aloinmunización en el curso de la gestación, especialmente si intervinieron circunstancias favorecedoras de una hemorragia feto-materna: maniobras obstétricas, traumatismo abdominal o transfusión de componentes sanguíneos.

En algunos países es controversial la necesidad real de efectuar este nuevo control por la que hasta ahora se consideraba una posibilidad muy pequeña

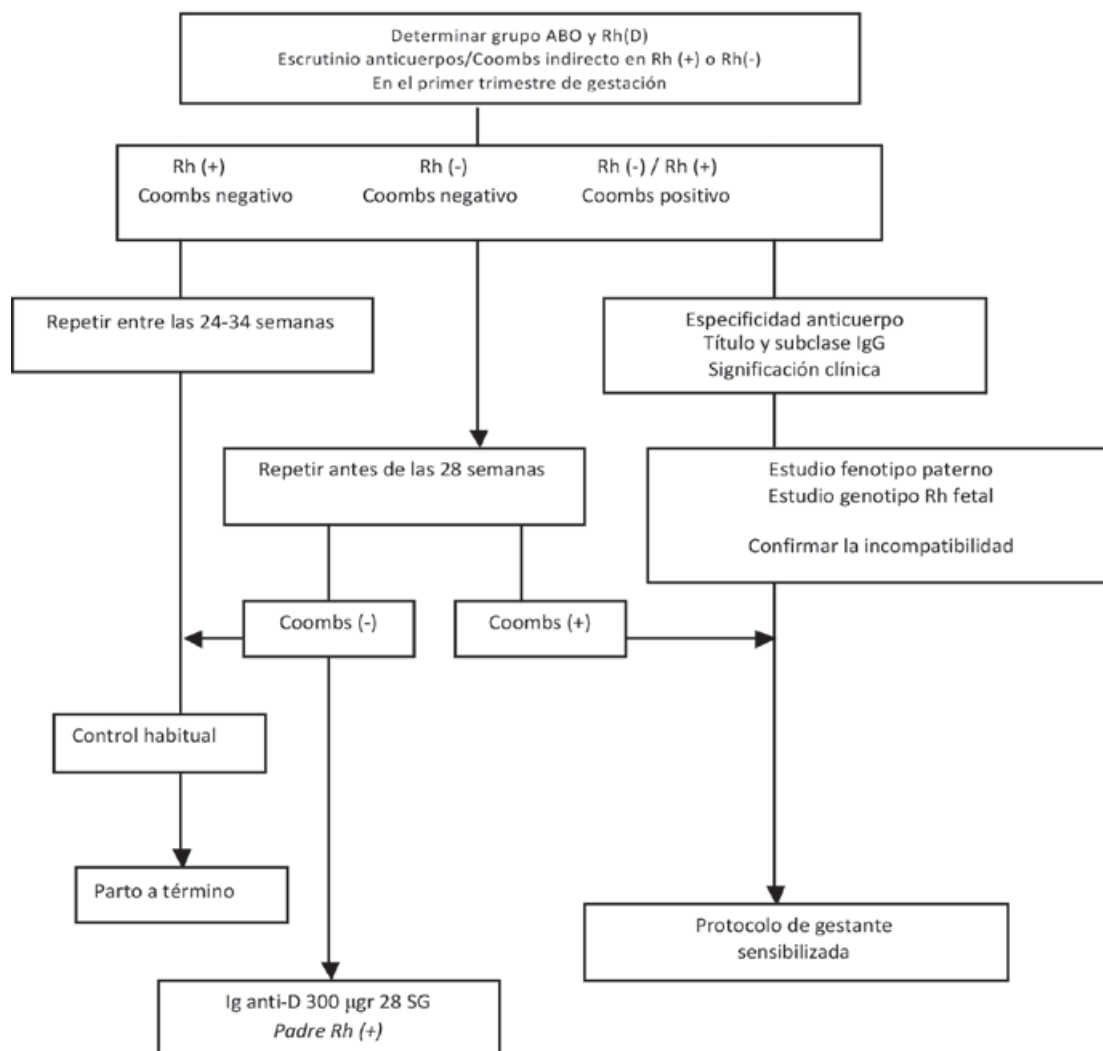


Figura 1. Protocolo de estudio en todas las gestantes

de aloinmunización tardía y de afectación fetal secundaria;¹² sin embargo, una publicación reciente nos alerta sobre la conveniencia del mismo.¹³ En este estudio se demuestra que algunos Acs indetectables en el primer trimestre pueden ser identificados en este último control, y que además se trata de Acs con capacidad de inducir afectación fetal grave. De un total de 355 Acs clínicamente significativos, 159 fueron de especificidad no anti-D, y un 10% de ellos no era detectable en el primer trimestre (16 casos). En 11 de los 16 casos se produjo afectación fetal gra-

ve, ocho por anti-c, y tan sólo un caso en una gestante primípara. El estudio concluye que es necesario mantener el control del tercer trimestre en las mujeres Rh(D) positivo, especialmente en las múltíparas.

1.2. Gestante Rh(D) negativo

Se recomienda realizar, como mínimo, un nuevo control de EAI **antes de las 28 semanas** de gestación, para valorar la indicación de administrar IgG anti-D.

Si el nuevo EAI otra vez resulta negativo se debe administrar la dosis preceptiva de IgG anti-D; por el contrario,

si el nuevo EAI demuestra la presencia de un anticuerpo anti-Rh(D) no está indicada la administración de IgG anti-D.

2. Protocolo en las gestantes sensibilizadas (EAI positivo en el primer trimestre de la gestación) (Figura 2)

Toda gestante Rh (D) negativo o positivo, sensibilizada por un anticuerpo, requiere una valoración y un seguimiento

especial, tanto desde el punto de vista inmunohematológico como obstétrico. En el caso de antecedentes obstétricos y/o en presencia de anticuerpos capaces de provocar una EHFRN, es necesario enviar a la gestante a un centro especializado, donde el tratamiento de la madre y el niño pueda realizarse adecuadamente. En este punto es necesaria la realización, simultánea o progresiva, de diferentes estudios complementarios que ayudan a predecir la magnitud

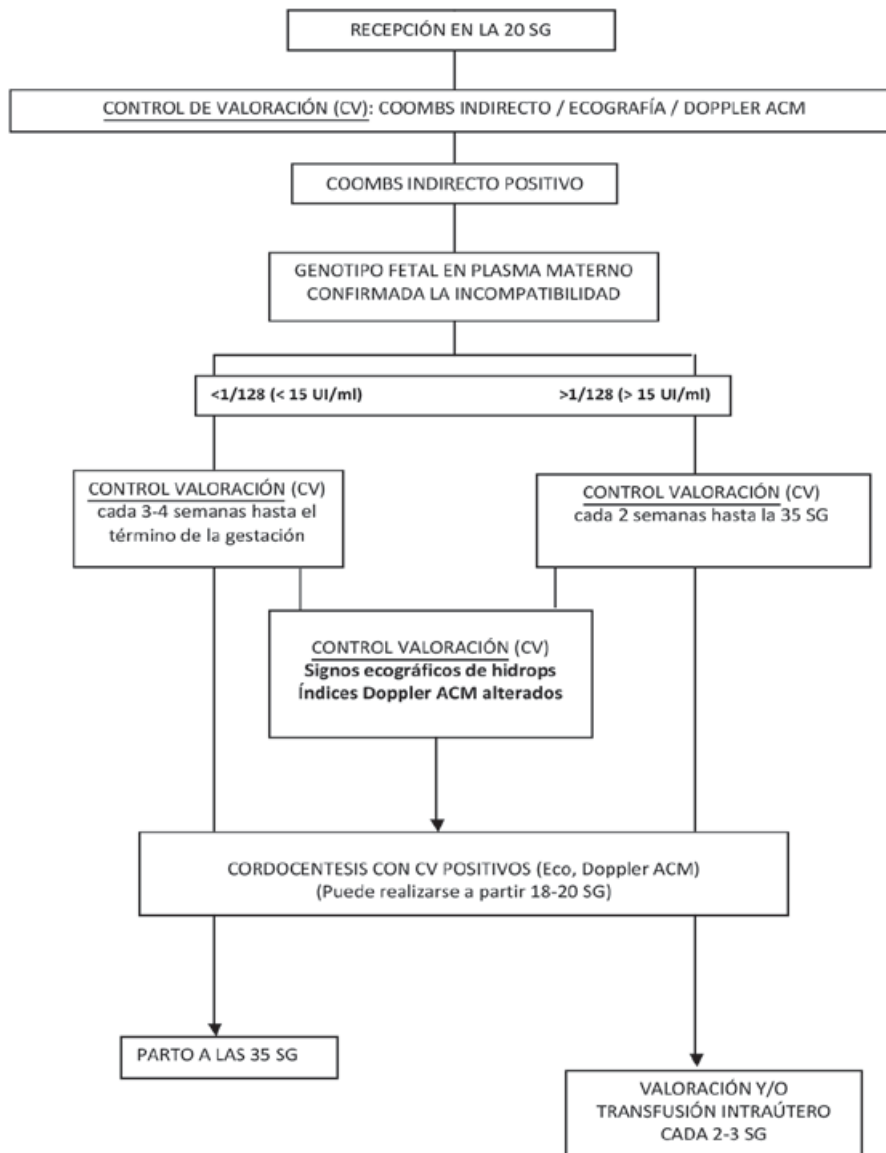


Figura 2. Protocolo de seguimiento en gestantes sensibilizadas

potencial del problema generado por la incompatibilidad materno-fetal:

- Titulación y/o cuantificación del anticuerpo materno
- Estudio del fenotipo del padre para determinar el grado de cigosidad del antígeno (Ag) problema y la probabilidad de que el feto herede o no este antígeno.
- Análisis del genotipo Rh(D) fetal para confirmar la incompatibilidad.
- Pruebas para valorar o predecir el grado de afectación fetal.

Algunos de estos estudios se realizan en el centro de origen, pero otros de carácter más complejo sólo están al alcance de laboratorios de inmunohematología de referencia.

Sobre los Acs y la titulación de Acs

Los **Acs de clase IgM** no requieren un seguimiento especial y, por tanto, no están indicados los estudios complementarios. La gestante puede continuar con el protocolo que le corresponda de acuerdo con su grupo Rh(D).

Los **Acs de clase IgG**, y muy especialmente los de especificidad anti-Rh(D), van a exigir estudios complementarios para precisar, en la medida de lo posible, qué gestantes y/o qué fetos van a ser subsidiarios de estudios o

exploraciones más complejas incluyendo las de carácter invasivo.

La **Titulación del anticuerpo** continúa siendo la técnica más sencilla y al alcance de cualquier laboratorio para valorar la evolución del Ac materno. Para que el título tenga valor se debe realizar bajo las mismas condiciones técnicas, por el mismo personal, siempre que sea factible, y examinar en paralelo la muestra actual con la precedente (Tabla 2).

Se entiende por **Título crítico** aquel que una vez alcanzado se asocia a afectación fetal, y por ello justifica exploraciones de carácter invasivo (cordocentesis) para valorar más objetivamente el grado de anemización fetal. El título crítico ha ido cambiando con el tiempo, y en la actualidad se considera que muy raramente se produce afectación fetal si el título se mantiene por debajo de 128.

Hay que tener una especial consideración por los aumentos súbitos de título entre dos determinaciones sucesivas, de manera que un incremento de título en dos diluciones es una alarma indicativa de progresión de la inmunización materna y de previsible afectación fetal.

La titulación se expresa con un valor absoluto y no debe confundirse con la

Tabla 2. Requisitos imprescindibles para que la titulación resulte útil

El objetivo debe ser el conseguir la máxima estandarización de la técnica:

- Emplear el mismo sistema: tarjeta, tubo, microplaca.
- Hematíes del mismo fenotipo en las titulaciones sucesivas.
- El suero y los hematíes en igual proporción que en la titulación previa.
- La titulación, de ser posible, debe ser realizada por la misma persona.
- Trabajar, en paralelo, con la muestra anterior (a partir de títulos de 16).

dilución que se expresa con un quebrado. Por ejemplo, el título puede ser 32 y la correspondiente dilución es 1/32.

La técnica de ELAT (*Enzyme-Like Antiglobulin Technique*) es una técnica alternativa a la titulación que permite cuantificar la cantidad de Ac materno. El título de 128 es equivalente a 15 U/ml, y por debajo de este valor tampoco suele haber afectación fetal.⁸

Mientras **el título se mantiene por debajo de 128** (15 U/ml), se debe investigar el fenotipo del padre y/o determinar el grupo Rh(D) fetal si ya se han superado las 12 semanas de gestación. El objetivo es confirmar la existencia de una incompatibilidad materno-fetal antes de que el título alcance un nivel crítico. Hay que poner en marcha un programa de seguimiento específico de las gestantes sensibilizadas que incluya las determinaciones seriadas del título

de anticuerpo y las exploraciones obstétricas complementarias.

Las Tablas 3 y 4 resumen la relación de anticuerpos que habitual u ocasionalmente producen EHFRN, y la relación de los que raramente la producen, respectivamente.

El título debe repetirse cada cuatro semanas hasta la semana 28, y quincenalmente después de esta semana, haciéndolo coincidir siempre que sea factible con la consulta de valoración obstétrica.

Si el título se ha mantenido estable y por debajo de 128, la gestante podrá ser asistida en un parto espontáneo.

El control obstétrico de valoración de la afectación fetal (CV) habitualmente incluye:

- Ecografía para detectar signos indirectos de anemia fetal y signos precoces de hidrops.

Tabla 3. Acs que habitual u ocasionalmente producen EHRN grave

Anticuerpos	Comentarios
Rh(D), c C, E, e, G Ce(f), Ce, Cw, Ew, Hro, Hr, Rh29, Go ^a , Rh32, Bea, Evans, Tar, Sec, JAL, MAR-like	EHRN grave y frecuente EHRN ocasional
K K, Kp ^a , Js ^a , Js ^b , Ul ^a , Ku, K22	Anemia aplásica > Anemia hemolítica EHRN leve
ABO	EHRN poco frecuente
S,s,U M En ^a , Mi ^a , Vw, Mur, Hut, Hil, Mt ^a , Mv, Far, sD, Or, Mut, Mur	EHRN grave EHRN excepcionalmente grave EHRN ocasionalmente grave
Fy ^a , Fy ^b	EHRN leve, grave. Un caso por anti-Fy ^b
JK ^a , Jk ^b	No suelen producir EHRN. Un caso grave
Co ^a , Co ^b	EHRN grave
Di ^a , Di ^b , Wr ^a , ELO, Bow	Pocos casos. EHRN grave
Ge	Generalmente no causan EHRN Dos casos graves. Inhibe la eritopoyesis
HJK, Kg, REIT, JVF, JONES, MAM	Pocos casos. EHRN grave

Tabla 4. Acs que muy raramente producen EHRN, o que suelen inducir formas leves

Anticuerpos	Comentarios
Anti-PP1P ^k (fenotipo p)	Se asocian a abortos recurrentes primer trimestre
Lu ^a , Lu ^b	Ags poco desarrollados en el feto Acs adsorbidos por la placenta
Le ^a , Le ^b	No activos a 37 °C No se expresan en el feto
Acs de los sistemas: Yt, Do, LW, Ch/Rg, Cr, Kn, In Acs: Cost, Er, Sc1, Sc2, Sc3, Xg ^a , Ok ^a , MER2, JMH, GIL, Emm, AnWj, Sd ^a , Duclos, PEL, ABTI, HLA	No se han descrito casos de EHRN grave Un caso por anti-Duclos
Vel Lan, At ^a , Jr ^a	Sólo formas leves IgM. Poco expresado en el feto Sólo formas leves. Un caso reciente grave por anti-Jr ^a

- Doppler con determinación del pico sistólico de velocidad en la arteria cerebral media (PSV-ACM).

No obstante, la intervención activa del obstetra raramente será necesaria antes de las 20 semanas de gestación, salvo en los casos excepcionales de gestantes altamente sensibilizadas y con antecedentes de haber inducido EHRN grave.

Si el **título es igual o superior a 128** (15 U/ml), o se produce un aumento rápido del mismo respecto a la titulación precedente (>2 diluciones), se recomienda repetir las determinaciones seriadas cada **dos semanas**, y la consulta de valoración obstétrica cada una o dos semanas a partir de las 20 semanas de gestación.

Se finalizará la gestación alrededor de las 34 o 36 semanas, dado que en esta fase es cuando existe mayor riesgo de agravamiento de la inmunización materna y de afectación fetal.

Si antes de las 32 semanas, el título crítico se acompaña de ascitis o de

otros signos indirectos ecográficos de anemia, y el Doppler muestra un PSV-ACM > 1,5 MoM, se realizará una cordocentesis para valorar objetivamente el grado de anemización fetal y una eventual transfusión. Después de las 32 semanas se planificará la extracción fetal en un entorno adecuado de acuerdo con el equipo perinatal.

Pruebas funcionales para predecir el grado de afectación fetal

El estudio de la actividad lítica de un anticuerpo resulta especialmente útil en aquellas situaciones en las que habiendo alcanzado o superado el título crítico no se detectan signos obstétricos indirectos de afectación fetal. El objetivo es disponer de la mayor información posible para valorar la conveniencia o no de realizar una cordocentesis y establecer la periodicidad adecuada de los controles. Un resultado que muestre ausencia de capacidad lítica en el anticuerpo materno sirve de apoyo al obstetra para mantener

una actitud conservadora y evitar exploraciones invasivas innecesarias en ese momento (Tabla 5).

Existen diferentes ensayos celulares¹⁴ que miden la capacidad de los Acs maternos para promover las interacciones entre los hematíes y los monocitos o los linfocitos K (Figura 3).

- La adherencia y fagocitosis de los hematíes por los monocitos son me-

didadas con la técnica conocida como **MMA (monocyte monolayer assay)** o actividad fagocítica mononuclear. La fiabilidad de los resultados parece depender en gran manera de la subclase de inmunoglobulina implicada, y se han descrito falsos positivos asociados a la presencia de anticuerpos que contienen mayoritariamente IgG3.

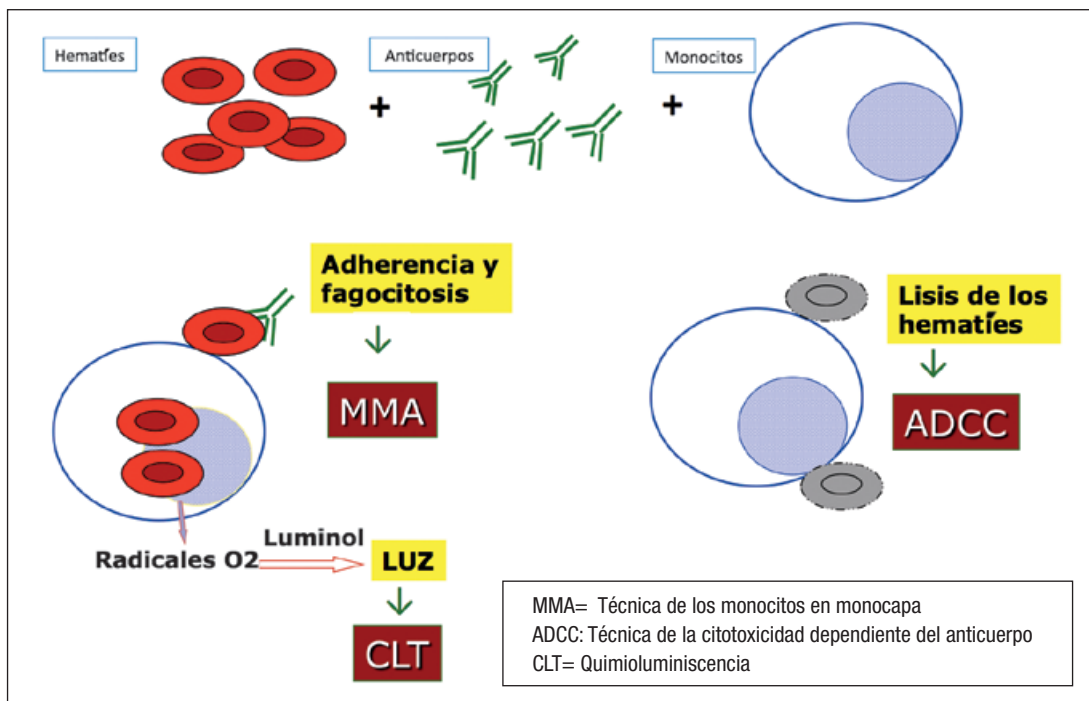


Figura 3. Pruebas funcionales *in vitro*. Las tres técnicas se basan en la incubación de hematíes portadores del antígeno Diana con los correspondientes anticuerpos y monocitos.

Tabla 5. Indicaciones de la quimioluminiscencia

1. Si al alcanzar el título crítico de 128 no se observan signos indirectos de afectación fetal: para apoyar o evitar la cordocentesis.
2. Ante un incremento súbito del título.
3. Cuando la afectación del feto anterior fue superior a la esperada de acuerdo con el título o con la concentración de anticuerpo.
4. Anticuerpos de especificidad desconocida y/o con capacidad hemolítica incierta.

- La lisis de los hematíes inducida por monocitos o linfocitos K es evaluada con las técnicas de **M-ADCC** o **K-ADCC** (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assays with monocytes or K lymphocytes*) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Con la técnica de M-ADCC se valora la interacción de los hematíes sensibilizados con anti-D IgG y el receptor FcγI; y con la técnica de K-ADCC se valora la interacción con el receptor FcγIII. Así mismo, con la primera técnica se detectan preferentemente anticuerpos IgG3, y con la técnica de K-ADCC es posible identificar diferencias funcionales entre diversos anticuerpos monoclonales humanos anti-D IgG1, indistinguibles en los ensayos que utilizan monocitos. En Holanda se emplea de manera habitual la técnica de M-ADCC para predecir el grado de afectación fetal.
- La respuesta metabólica de los monocitos en presencia de hematíes sensibilizados se mide con la técnica de CLT (*Chemiluminescence*) o de **Quimioluminiscencia**. Esta técnica se emplea ordinariamente en el Reino Unido, y tiene la ventaja, respecto a las anteriores, de no requerir isótopos radiactivos. Aunque no exenta de errores, la capacidad predictiva de la técnica se ha demostrado superior a la de las anteriormente descritas.

En los casos de **antecedentes mayores** (hidrops, muerte intraútero o muerte perinatal) en los que la hemólisis se inicie antes de las 18 semanas de gestación, se realizará un tratamiento materno con gammaglobulinas intravenosas

combinado con plasmaféresis a partir de la semana 14 (0,8g/kg+20g cada día).

Esta pauta se finalizará cuando ya sea factible la cordocentesis y la posibilidad de realizar una transfusión intraútero (TIU), a partir de las 18 o 20 semanas.

La última transfusión se realizará antes de las 32 semanas para permitir la extracción fetal hacia las 34 semanas.

Referencias

1. Urbaniak, S. J. Noninvasive approaches to the management of RhD hemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfusion*, 2008; 48(1):2-5.
2. Lee, D., Contreras, M., Robson, S. C., Rodeck, C. H., Whittle, M. J. Recommendations for the use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis. *Transfus Med.*, 1999; 9: 93-7.
3. Koelewijn, J. M., de Haas, M., Vrijkotte, T. G. M., van der Scoot, C. E., Bonsel, G. J. Risk factors for RhD immunisation despite antenatal and postnatal anti-D prophylaxis. *BJOG*, 2009; 116: 1307-1314.
4. Caine, M. E., Mueller-Heubach, E. Kell sensitization in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1986; 154: 85-90.
5. Bowel, P. J., Brown, S. E., Dike, A. E., Inskip, M. J. The significance of anti-c alloimmunization in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, 1986; 93: 1044-4048.
6. García Bueno, M. J., Fernández Jiménez, B., Muñiz-Díaz, E., Parra, R. Donación autóloga en gestante con anticuerpos antieritrocitarios anti-U y anti-He". *Med Clin.*, 2005; 124(7):679.
7. Muñiz Díaz, E., Oyonarte, S., Rodríguez Villanueva, J., Parra, J., Santiago, J. C. Protocolo de diagnóstico y prevención de la enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido. *Boletín de la SETS*, 2008.
8. Gooch, A., Parker, J., Wray, J., Querishi, H. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. *British Society for Haematology*, 2007.

9. May-Wewers, J., Kaiser, J. R., Moore, E. K., Blackall, D. P. Severe neonatal hemolysis due to a maternal antibody to the low-frequency Rh antigen C(w). *Am J Perinatol.*, 2006; 23(4): 213-217.
10. Coluzzi, S., De Nicoló, M. C., Quattrocchi, L., Neri, L., Ferruzzi, I., Girelli, G. Should pre-transfusion screening RBC panels contain W_r(a+) cells? *Transfusion Medicine*, 2010; 20(5): 337-340.
11. Baía, F., Muñoz-Díaz, E., Boto, N., Salgado, M., Montero, R., Ventura, T., Sousa, H., Alves, B., Nogués, N., Koch, C. A simple approach to confirm the presence of anti-D in sera with presumed anti-D+ C specificity. *Blood Transfusion*, 2013; 11(3):449-451.
12. Adenij, A. A., Fuller, I., Dale, T., Lindow, S. W. Should we continue screening rhesus D positive women for the development of atypical antibodies in late pregnancy? *J Matern Fetal Neonatal Med.*, 2007; 20: 59-61.
13. Dajak, S., Stefanovic, V., Capkun, V. severe haemolytic disease of fetus and newborn caused by red blood cell antibodies undetected at first-trimester screening. *Transfusion*, 2011; 51: 1380-1388.
14. Hadley, A. G. Laboratory assays to determine the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. En: Hadley AG, Shoothill P, editors. *Alloimmune disorders of pregnancy*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. pp.141-149.

Conducta en el diagnóstico y seguimiento de gestantes isoimmunizadas

SALVADOR OYONARTE*

Desde que en 1968 la profilaxis mediante administración de inmunoglobulina anti-D a las gestantes Rh-negativas se convirtió en una práctica estándar, la incidencia de la isoimmunización Rh en las mujeres en edad reproductiva ha descendido,¹ aunque todavía se estima que de 1 a 6 de cada 1.000 nacidos vivos presentan algún grado de enfermedad hemolítica debida al anticuerpo anti-D.^{2,3} Además, la frecuencia relativa de la isoimmunización a causa de otros anticuerpos eritrocitarios, especialmente el anti-Kell y anti-c, está creciendo en importancia.¹ En España

* MD.PhD. Director Centro de Transfusión Sanguínea de Sevilla, España. soyonarte@aehh.org

han surgido especificidades poco frecuentes o desconocidas y un aumento considerable en los casos de enfermedad hemolítica perinatal (EHP), como consecuencia de la llegada masiva de inmigrantes.

En el laboratorio y en la clínica obstétrica se ha generado recientemente un progreso significativo en cuanto al diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la EHP. Conocer el genotipo RHD fetal por medio del plasma materno, y en el plano obstétrico, la ecografía y el doppler con determinación del pico sistólico de velocidad de la arteria cerebral media se han afianzado como las herramientas más útiles para el control del feto y la valoración del grado de afectación fetal que creemos justifican la revisión de los protocolos de actuación ante la isoimmunización en el embarazo.

Sistemas de grupos sanguíneos de mayor interés en la isoimmunización

Aunque el sistema de grupo sanguíneo Rh está integrado actualmente por cuarenta y cinco antígenos, cinco de estos (D, E, C, c y e) tienen mayor importancia clínica y transfusional. La presencia del antígeno D confiere la positividad Rh, mientras que su ausencia indica la negatividad Rh. Algunos individuos presentan una pequeña cantidad de antígeno D (fenotipo D débil) o presentan un antígeno D incompleto (fenotipo D parcial), por lo que sólo expresan débilmente el antígeno Rh(D). La negatividad-Rh se presenta entre el 4% y el 8% de las personas de raza negra y en

alrededor del 15% de las personas de origen caucásico.⁴

En 1991⁵ fue localizado, en el brazo corto del cromosoma 1, el locus Rh, que está constituido por dos genes, el gen RhD y el gen RhCE. El primero codifica la información necesaria para la síntesis del polipéptido D, donde se localiza el antígeno Rh(D), en tanto que el gen RhCE codifica para los polipéptidos, donde se localizan los antígenos C/c y E/e. Ambos genes están presentes en los individuos Rh (D) positivo, mientras que en los Rh (D) negativo únicamente se encuentra el gen RhCE.

El grupo sanguíneo Kell está formado por veinticuatro antígenos, de los cuales tiene importancia, por su mayor inmunogenicidad y frecuencia, el K (Kell1 o K1). Su antígeno es el k (Kell2, K2 o Cellano). El 92% de la población de origen caucásico y el 98% de la de origen africano son negativos para el antígeno K.⁶

Se dice que existe incompatibilidad Rh cuando la madre es Rh(D) negativo y el padre Rh(D) positivo. La frecuencia de esta situación depende de la distribución de los antígenos eritrocitarios en la población. En nuestro medio se estima que la incompatibilidad Rh sucede en el 12% de las parejas, aproximadamente. Cuando existe incompatibilidad, el feto puede heredar el carácter Rh(D) positivo paterno, lo cual ocurrirá en el 100% de las parejas si el padre es homocigoto para el antígeno Rh(D) (D,D), y sólo en el 50% si el padre es heterocigoto (D). Aproximadamente el 40% de los individuos Rh(D) positivos son heterocigotos.

Las altas proporciones de negatividad para el antígeno Kell en la población hacen que la incompatibilidad

Kell sea menos frecuente. Además, la mayoría de los individuos Kell positivos son heterocigóticos (97,8% en los de origen caucásico y 100% entre los de origen africano),⁶ por lo que en la mayoría de las parejas en que exista incompatibilidad Kell, el feto será Kell-negativo.

Fisiopatología de la isoimmunización

La isoimmunización es el proceso por el cual una mujer, expuesta a antígenos no presentes en su propia sangre, desarrolla anticuerpos contra tales antígenos. En el 90% de los casos, el antígeno Rh(D) es el responsable de la isoimmunización, aunque otros antígenos del sistema Rh pueden también serlo (antígeno c, fundamentalmente), así como antígenos pertenecientes a otros sistemas del grupo sanguíneo (Kell, Fy^a, Jk^a).

La isoimmunización puede ser debida, entre otras causas, a hemorragia transplacentaria feto-materna, transfusión de componentes sanguíneos, trasplantes de órganos y tejidos, hemoterapia intramuscular o intercambio de sangre y jeringas.

Se ha establecido,⁷ usando el test de Kleihauer, que la hemorragia feto-materna se produce de manera espontánea en un volumen y frecuencia crecientes con el avance de la gestación. No obstante, las cantidades de sangre fetal transfundida a la madre no suelen ser suficientes para estimular el sistema inmune materno, por lo que es muy raro, salvo que la madre haya sido sensibilizada previamente por transfusiones, que la isoimmunización se produzca en

el curso del primer embarazo (0,4% a 2% de todos los casos).

Sin embargo, cuando se produce una hemorragia feto-materna de mayor cantidad (como en el parto o tras técnicas invasivas), los linfocitos B maternos reconocen el antígeno fetal y se inicia la producción de inmunoglobulinas M, que no cruzan la barrera placentaria (sensibilización primaria). Los linfocitos B memoria esperarán una nueva exposición al antígeno, y si ésta se ocasiona en un embarazo posterior, aunque sea de pequeña cuantía, proliferarán rápidamente y producirán inmunoglobulina G (sensibilización secundaria). Las IgG, de menor peso molecular, cruzarán la placenta y provocarán la hemólisis (principalmente en el bazo fetal) de los eritrocitos portadores del antígeno, ocasionando anemia fetal (enfermedad hemolítica perinatal (EHP)). En respuesta, el feto produce eritropoyetina que estimula el hígado, el bazo y la médula ósea fetal para producir más glóbulos rojos, y cuando se sobrepasa la capacidad de aquellos, son también estimulados órganos no habitualmente eritropoyéticos como riñones, glándulas suprarrenales e intestino. Los glóbulos rojos producidos en estos órganos son habitualmente inmaduros, nucleados, y aparecen en la circulación como eritroblastos (Eritroblastosis fetal).

Las formas más graves de isoimmunización (representadas por el *hidrops fetalis* y la muerte) ocurren en el 20-25% de los casos, presentándose la mitad de estos casos entre las semanas 18 y 34 de gestación. En otro 25% de los casos la afectación fetal será menos intensa, pero presentarán *kernicterus* en

el periodo postnatal si no son adecuadamente tratados. El resto de los casos solo mostrarán una leve afectación tras el nacimiento.⁸

Esta intensidad diferente de presentación de la enfermedad depende de la inmunogenicidad del antígeno, del volumen y el número de eventos inmunizantes, de la capacidad de respuesta del receptor y de que se haya o no efectuado la profilaxis con gammaglobulina anti-D. Por el contrario, la incompatibilidad ABO entre madre y feto protege parcialmente de la inmunización.⁹

El mecanismo fisiopatológico de la anemia fetal en la isoinmunización anti-Kell es diferente, pues se debe fundamentalmente a la supresión de la eritropoyesis, inducida directamente por una acción peculiar de los anticuerpos anti-Kell.¹⁰ Por otra parte, el antígeno Kell presenta una inmunogenicidad mucho menor que el antígeno responsable de la isoinmunización Rh, lo que explica que sólo el 5% de las personas Kell negativas sometidas a transfusión incompatible desarrollen respuesta inmune con formación de anticuerpos.¹¹

Diagnóstico de la isoinmunización

En toda gestante, independientemente de que sea Rh(D) positivo o negativo, se debe realizar tan pronto como sea posible, y siempre en el primer trimestre de gestación, la determinación del grupo ABO y del factor Rh(D), y una investigación de anticuerpos eritrocitarios irregulares o Coombs indirecto. Para el tipaje Rh(D) se recomienda emplear un

reactivo monoclonal (IgM) que no reconozca las variantes DVI.

Si no existe isoinmunización, es conveniente repetir las pruebas entre las 24 a 34 semanas. Si existe isoinmunización, se deben realizar pruebas adicionales para determinar su especificidad, cuantificar y evaluar su significado clínico. Si el anticuerpo hallado es capaz de causar EHP se debe trasladar a la gestante a un centro con experiencia en el manejo de gestantes isoinmunizadas.

Métodos de valoración diagnóstica en la isoinmunización

La valoración diagnóstica de las gestantes isoinmunizadas comprende múltiples aspectos, entre ellos:

Valoración de los antecedentes obstétricos y perinatales

La isoinmunización suele agravarse en embarazos sucesivos. Por ello, es muy importante valorar y diferenciar el tipo de antecedente. Se consideran antecedentes mayores la muerte intrauterina (MIU) o en el período postnatal (MPN) en un embarazo previo. Se consideran antecedentes menores el requerimiento de exanguinotransfusión, transfusión o fototerapia posnatales.

Título de anticuerpos maternos

La determinación seriada del título de anticuerpos maternos (Coombs indirecto) continúa usándose para determinar el grado de isoinmunización. Por convención, los valores de los títulos de anticuerpos se informan como un número quebrado que expresa la mayor dilución

en que se ha producido una reacción de aglutinación (por ejemplo, 1/32). Es frecuente que los resultados varíen entre diferentes laboratorios, pero en un mismo laboratorio el título no debe variar más de una dilución. Por ello, un título inicial de 1/8 que sube hasta 1/16 no necesariamente indica un agravamiento del cuadro. En Europa, la cantidad de anti-D circulante se compara con un estándar internacional y se expresa en UI/ml. (por ejemplo, un título de 1/128 equivale a 15 UI/ml). También se puede utilizar el sistema ELAT (*Enzyme-Like Antiglobulin Technique*) para cuantificación en mcg/ml o en UI (UI=mcg/ml).

En la isoinmunización se ha definido el concepto de “título crítico”, que señala el título que se asocia con un riesgo elevado de desarrollo de *hidrops fetal*. Este título puede variar entre instituciones, con base en la correlación con los resultados de EHP de cada centro, aunque se ha recomendado un punto de corte de 1/128 (15 UI/mL) para indicar la realización de técnicas invasivas en la isoinmunización anti-D, ya que por debajo de este nivel sólo suelen producirse afectaciones leves.¹²

Se ha demostrado que las diferentes subclases de anticuerpos IgG tienen diferente potencial hemolítico,¹³ por lo que su estudio puede aportar información sobre la gravedad de la enfermedad.¹⁴ Así, en las gestantes sensibilizadas con título de anticuerpos anti-D mayor que 1/128 y con predominio de la subclase IgG3, y más aún cuando no haya presencia de IgG1, se considera significativamente menos grave.

El “título crítico” de 1/128 sólo es admisible para la isoinmunización anti-D. Para la isoinmunización anti-Kell

se sugiere que el “título crítico” puede situarse en 1/32.¹⁵

Estudio de los antígenos paternos

Es importante determinar al comienzo del embarazo, en una muestra de sangre periférica, el estado antigénico paterno y su cigocidad, para establecer la compatibilidad o incompatibilidad de la pareja respecto del antígeno causante de la isoinmunización, y calcular el riesgo de transmisión hereditaria del antígeno al feto. No obstante, no se debe olvidar que se estima que la paternidad puede ser falsa en un 8% de los casos,¹⁸ por lo que aun en el caso de padre antígeno negativo se debe realizar a la madre el seguimiento estándar para las gestantes no sensibilizadas, que incluye controles de Coombs indirecto entre las 24 y 34 semanas de gestación.

Estudio de los antígenos fetales

Cuando el padre es homocigótico para el antígeno causante de la isoinmunización, el 100% de los fetos serán portadores del antígeno, por lo que no es necesario el estudio del estado antigénico fetal. Sin embargo, cuando el padre es heterocigótico, o su estado antigénico es desconocido, cabe la opción de determinar si el antígeno causante de la isoinmunización está presente en el feto, para saber si existe un riesgo real de afectación fetal.

El fenotipo fetal (expresión de los antígenos en los glóbulos rojos) puede determinarse mediante estudio serológico de una muestra de sangre fetal obtenida por cordocentesis. También pueden emplearse técnicas de genética molecular para estudiar el genotipo

fetal, tras amplificación del ADN fetal mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en amniocitos del líquido amniótico obtenido por amniocentesis después de las 16 o las 17 semanas de gestación,¹⁹ o más precozmente entre las 10 y las 13 semanas de gestación, a partir de muestras obtenidas por biopsia corial. Pero estas técnicas son invasivas y se asocian con hemorragia feto-materna^{20,21} que podría incrementar el nivel de anticuerpos maternos,^{22,23} y por tanto, empeorar la condición fetal. El estudio del genotipo fetal durante el primer trimestre está especialmente indicado cuando existen antecedentes serios que hagan sospechar el desarrollo de hemólisis grave antes de las 18 semanas de gestación, pues, en los casos en que no haya incompatibilidad, permite evitar el tratamiento innecesario.

Actualmente es posible detectar, en el segundo trimestre, células fetales RhD-positivas en la sangre de madres RhD-negativas mediante técnicas de PCR²⁴ o citometría de flujo.²⁵ También se han podido localizar, mediante PCR, secuencias de los genes que codifican los antígenos Rh(D) positivos en el ADN fetal libre en el plasma o suero materno.^{26,27} Todas estas técnicas permiten determinar de forma no invasiva el estado antigénico fetal.

Amniocentesis para la valoración de la anemia fetal

La valoración de la anemia fetal mediante el estudio seriado de la concentración de bilirrubina en líquido amniótico a través de la determinación, por densidad óptica, de la desviación de la longitud de onda a 450 nm (Δ DO 450),

fue introducida en la práctica clínica por Liley, en 1961,²⁸ quien desarrolló una curva al correlacionar el Δ DO 450 y los resultados clínicos posnatales en cien gestantes con edad gestacional de 27 semanas o superior y sensibilizadas al antígeno Rh.

La curva de Liley fue útil durante más de dos décadas, pero la mejora en la supervivencia de los fetos de menor edad gestacional hizo necesaria una valoración más precoz de los fetos en riesgo. Esta necesidad llevó a extrapolar la curva de Liley hasta etapas más precoces de la gestación, pero estos intentos han sido inútiles.²⁹ Además, la amniocentesis no está exenta de riesgo de agravamiento de la enfermedad, por lo que el desarrollo de técnicas no invasivas para la valoración de la anemia fetal ha ocasionado el abandono de la práctica de amniocentesis con este propósito en la isoinmunización.^{30,31}

El mecanismo fisiopatológico en la isoinmunización anti-Kell, más ligado a la supresión de la eritropoyesis que a la hemólisis, hace en estos casos especialmente inútil el estudio de la bilirrubina en líquido amniótico mediante amniocentesis.³²

Valoración ecográfica para la anemia fetal

Aunque se han descrito numerosos signos ecográficos indirectos que permiten sospechar la anemia fetal³³ (aumento del grosor placentario, hepatomegalia, esplenomegalia, aumento del perímetro abdominal, engrosamiento de la vena umbilical, polihidramnios...), estos no son capaces de predecir la gravedad de la anemia,³⁴ por lo que el papel de la

ecografía clásica en la valoración del estado fetal en la isoimmunización se limita, prácticamente, al establecimiento de la edad gestacional y a la detección de *hidrops*. No obstante, el *hidrops* no se observa ecográficamente hasta que el feto padece una anemia grave, y en esta situación los resultados terapéuticos son peores que cuando el tratamiento se inicia en fetos no hidrópicos.³⁵

Valoración Doppler para la anemia fetal

La idea de que en los fetos anémicos se producen cambios hemodinámicos, fundamentalmente secundarios a la disminución de la viscosidad sanguínea,³⁶ lleva a investigar la posible correlación entre diferentes parámetros Doppler, medidos en distintos puntos del árbol circulatorio fetal, con la concentración de hemoglobina o el hematocrito fetal. Entre los parámetros estudiados, la medición Doppler del pico de velocidad máxima en la arteria cerebral media (VM-ACM) parece ser la mejor prueba no invasiva para diagnosticar la anemia fetal.³⁷

La valoración de la VM-ACM puede realizarse con un ángulo cercano a cero entre el haz ultrasónico y la dirección del flujo sanguíneo, muestra baja variabilidad inter e intraobservador, cuenta con nomogramas disponibles que la relacionan con la edad gestacional,³⁸ y establece su relación inversa con la concentración de hemoglobina fetal.³⁹ Un estudio multicéntrico³⁸ de ciento once fetos con riesgo de anemia debida a isoimmunización, concluyó que un punto de corte de 1,50 Múltiplos de la Mediana (MoM) de la VM-ACM consi-

gue predecir la anemia fetal moderada y grave en fetos no sometidos a transfusiones previas, con un 100% de sensibilidad y un 88% de especificidad. También se ha observado la normalización de la VM-ACM tras la corrección de la anemia mediante transfusión intravascular intrauterina.⁴⁰

Sin embargo, los cambios en las características físicas de la sangre fetal tras la primera transfusión, a causa del reemplazo de aquella por sangre de adulto, requieren establecer diferentes puntos de corte para predecir la anemia fetal en estas situaciones. Así, se ha propuesto un punto de corte de 1,68 MoM que predeciría la anemia fetal grave con un 100% de sensibilidad y un 94% de especificidad, y un punto de corte de 1,32 MoM para predecir la anemia moderada con 100% de sensibilidad y un 63% de especificidad.⁴¹

Aunque se debe tener en cuenta, cuando se usa clínicamente, que los valores negativos no descartan la anemia fetal,⁴² la utilidad de la valoración de la VM-ACM tanto en casos de fetos no transfundidos como previamente transfundidos ha sido corroborada por otros autores,⁴³ entre los que nos incluimos.⁴⁴ Así, en nuestra experiencia, el valor de la VM-ACM, expresado en MoM, se correlaciona bien con la concentración de Hb fetal, también expresada en MoM (Figura 1), mediante la ecuación:

$$\text{Concentración de Hb} = 0,9848 - 0,5012 \times \text{VMACM} + 0,4270 \times \text{VMACM}^2 - 0,1478 \times \text{VMACM}^3$$

La forma de la curva, con mayor pendiente cuando los valores de VM-ACM son más elevados, explica el hecho de la mayor sensibilidad de este

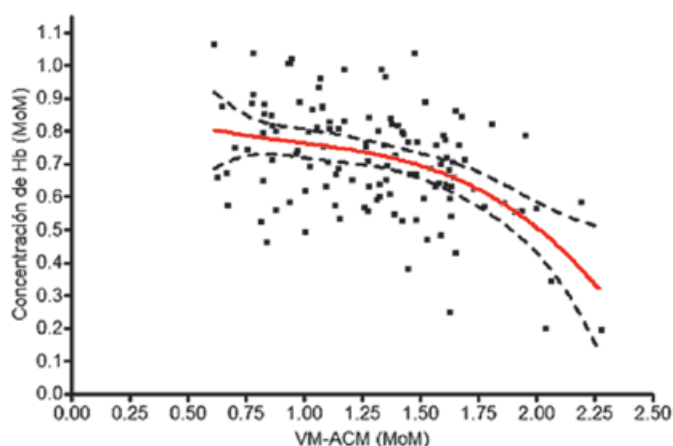


Figura 1. Correlación entre la concentración de Hb y la velocidad máxima de la ACM, ambos expresados en múltiplos de la mediana.

parámetro para detectar casos con anemia grave, y su muy limitado valor para diferenciar entre fetos no anémicos y anemia leve.

Un ejemplo de la relación entre la valoración de la VM-ACM y la corres-

pondiente determinación de la concentración de Hb pre y postransfusional en una de las gestantes isoinmunizada contra el antígeno Rh atendidas en nuestra unidad, ilustra su uso clínico (Figura 2). Como se observa en la gráfi-

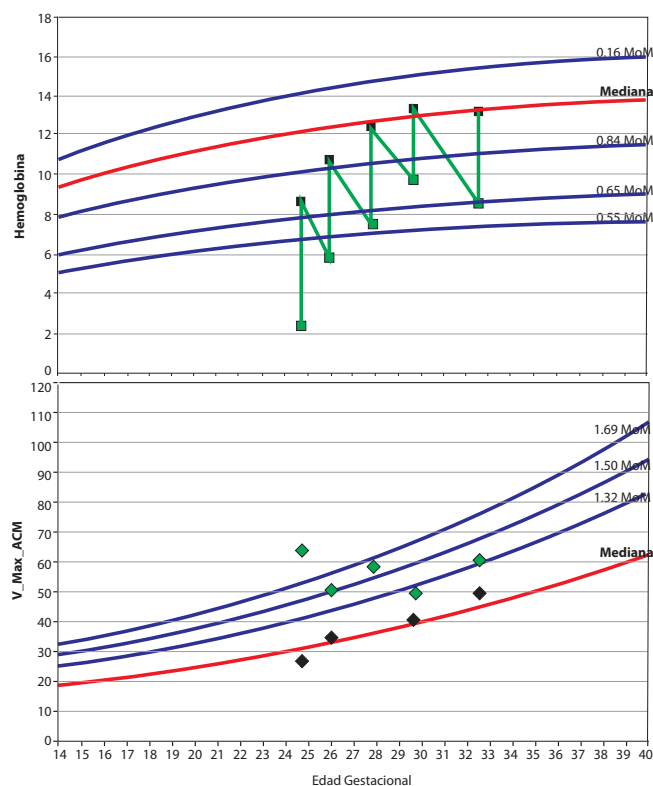


Figura 2. Relación entre la valoración de la VM-ACM y la correspondiente determinación de la concentración de Hb pre y postransfusional en una de las gestantes atendidas en nuestra unidad por isoinmunización anti-D.

ca, los valores de VM-ACM superiores a los puntos de corte mencionados se corresponden con las concentraciones de Hb patológicas observadas mediante muestreo de sangre fetal por cordocentesis, y la corrección de éstas mediante transfusión intravascular fetal consigue la normalización de los valores de VM-ACM. No obstante, aunque este caso es muy demostrativo, admitimos que no en todos nuestros casos se ha observado una correlación tan perfecta.

Cordocentesis

La cordocentesis, seguida o no de transfusión intravascular fetal, es el patrón de oro para el diagnóstico de anemia fetal, pues permite la determinación directa de la concentración de hemoglobina. Se realiza insertando una aguja de 20 gauge bajo guía ultrasónica continua, preferiblemente en el sitio de inserción del cordón en la placenta

(Figura 3). Tras comprobar la situación intravascular de la aguja, se extrae 1 mL de sangre fetal para la evaluación inmediata de la concentración de hemoglobina pretransfusión, mediante un analizador portátil. Para minimizar el efecto de la evolución ascendente de la concentración de hemoglobina a lo largo de la gestación, la concentración de hemoglobina se expresa en múltiplos de la mediana (MoM), a partir de curvas de normalidad del valor de la mediana de Hb en función de la edad gestacional previamente publicados³⁸ o mejor, calculados mediante casuística propia. La anemia se considera leve cuando el valor de Hb se sitúa entre 0,84 MoM y 0,65 MoM, moderada cuando se sitúa entre menos de 0,65 MoM y 0,55 MoM, y grave cuando es menor de 0,55 MoM.³⁸

La cordocentesis no está exenta de riesgos, pues se ha asociado a infección, rotura prematura de membranas, parto prematuro; hemorragia, hemato-

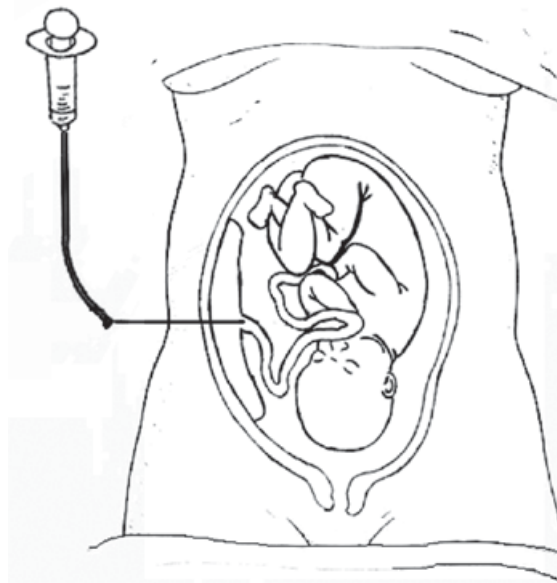


Figura 3. Técnica de la cordocentesis, seguida o no de transfusión intravascular fetal

ma o trombosis en el lugar de la punción en el cordón; bradicardia fetal, desprendimiento prematuro de la placenta normalmente inserta y hemorragia feto-materna que puede empeorar la isoinmunización.^{45,46} En general se ha estimado que la cordocentesis se asocia a un incremento del riesgo de pérdida fetal de 1,4%.⁴⁷ Por ello es importante la evaluación previa mediante métodos no invasivos, y proceder a realizar la cordocentesis únicamente cuando exista la firme sospecha de anemia fetal. En nuestro Centro son indicaciones para la realización de una cordocentesis:

- Deterioro progresivo de los signos ecográficos indirectos (balonización cardiaca, ascitis incipiente, *hidrops*).
- Índices Doppler por encima del punto de corte.
- Los hallazgos de forma aislada de altos títulos de anti-D, sobre todo cuando dicha elevación resulta a expensas especialmente de la subclase IgG1, no son por sí solos indicación en ausencia de otros criterios ecográficos y Doppler y en ausencia de antecedentes. En estos casos solemos realizar un control más frecuente de la gestante, y en especial después de la semana 29 de gestación.
- La elevación de más de dos diluciones en el título de anticuerpos sobre el basal, ausencia de otros criterios ecográficos y Doppler, no es indicación de cordocentesis.

En los casos en que la determinación de la Hb fetal pone de manifiesto la existencia de anemia, se procede a realizar la transfusión intravascular fetal en el mismo momento.

Técnicas terapéuticas en la anemia fetal

El objetivo del manejo clínico actual de la isoinmunización es evitar el *hidrops* y la muerte fetal secundarios a la anemia, para conseguir que el feto alcance la madurez pulmonar fetal, hacia las 35 semanas, y planificar con seguridad la finalización de la gestación.

Transfusión intrauterina

Actualmente el tratamiento de elección, tras el diagnóstico de anemia fetal, es la transfusión intravascular fetal (TIV), que se realiza con el objetivo de remontar los parámetros sanguíneos (hematocrito o hemoglobina) a los valores normales para la edad gestacional, y se efectúa en el mismo acto de la cordocentesis diagnóstica. La transfusión intraperitoneal introducida por Liley⁴⁸ está prácticamente en desuso.

Aunque algunos autores prefieren usar sangre de la propia gestante para la transfusión,⁴⁹ es más generalizado el uso de sangre de donante, que debe ser negativa para el antígeno responsable de la isoinmunización, compatible para el sistema ABO, irradiada (para evitar la reacción de “injerto contra huésped”), leucodepleccionada y negativa para anticuerpos contra citomegalovirus. La cantidad de sangre a transfundir dependerá de la concentración inicial de hemoglobina, el volumen fetoplacentario en relación con la edad gestacional y la concentración de hemoglobina en la sangre donante, y se puede calcular mediante uno de los algoritmos publicados para tal fin.⁵⁰ El volumen a transfundir se sitúa habitualmente entre 10 mL y 100 mL.

En los fetos hidróticos o con anemia extremadamente grave se debe proceder a recuperar los valores normales de hemoglobina de manera gradual, para permitir al sistema cardiovascular fetal adaptarse a los cambios de la viscosidad sanguínea y evitar su desequilibrio hemodinámico.⁵¹

Una vez finalizada la transfusión, y tras esperar uno o dos minutos, se extrae otra muestra de sangre fetal para la evaluación de la concentración de hemoglobina postransfusión, que permite conocer el grado de recuperación conseguido. En un plazo no superior a dos semanas después de la primera transfusión, se procede a una segunda valoración para determinar el gradiente de descenso de la hemoglobina con la valoración Doppler de la VM-ACM, y establecer el momento para realizar sucesivas transfusiones. Habitualmente es necesario repetir las transfusiones en intervalos de dos a tres semanas. Actualmente, la mayoría de autores recomiendan proceder con transfusiones intrauterinas hasta las 35 semanas de gestación para programar el parto hacia la semana 36 o 37.⁵²

Un estudio basado en 740 transfusiones intrauterinas realizadas en 254 fetos centra su atención en las complicaciones relacionadas con este procedimiento,⁵³ y obtuvo que las complicaciones directamente relacionadas con la TIV se dieron en 3,1% de los fetos o 1,6% de los procedimientos (de ellas, siete muertes fetales, dos muertes neonatales, dos casos de infección intrauterina, un caso de rotura prematura de membranas y quince cesáreas de emergencia), siendo los factores que más se asociaron a estas complica-

ciones la punción arterial, la punción transamniótica del cordón, el no usar parálisis fetal y una edad gestacional avanzada. Por ello, los autores de este estudio concluyen que para evitar pérdidas fetales innecesarias, el tratamiento con TIU debe ser iniciado sólo en los casos en que exista una seria sospecha de anemia fetal; que las complicaciones son menos frecuentes si la TIV es realizada en el cordón, a través de la placenta, o intrahepáticamente; que se deben evitar, por el alto riesgo de complicaciones serias, la punción arterial y la punción transamniótica del cordón; que el aplicar rutinariamente parálisis fetal mejora la seguridad del procedimiento; y que en los casos de edad gestacional avanzada, sobre todo cuando la cordocentesis sea técnicamente difícil, se debe contemplar la alternativa de finalizar la gestación.

La supervivencia perinatal general de la isoinmunización luego del tratamiento con TIV realizada en centros con experiencia se sitúa alrededor del 84%, siendo mayor en los fetos no hidróticos (92%) que en los hidróticos (70%).⁵⁴ No obstante, cuando los fetos hidróticos sobreviven, la incidencia de problemas neurológicos a largo plazo no es mayor en ellos que en los fetos no hidróticos.⁵⁵

Otros tratamientos disponibles

El perfeccionamiento técnico y consiguiente extensión del uso de la TIV como tratamiento patrón de la isoinmunización en fase prenatal, ha hecho caer en desuso otras técnicas de tratamiento. Entre estas se encuentra la plasmaféresis,⁵⁶ que busca retirar los

anticuerpos de la circulación materna y la administración de grandes dosis de inmunoglobulina endovenosa,⁵⁷ cuyo mecanismo de acción, aunque se han sugerido diversas hipótesis, todavía no se ha establecido definitivamente. El uso conjunto de plasmaféresis y administración de inmunoglobulinas intravenosas sólo consigue retrasar el momento de realizar la primera TIV y es, además, extremadamente caro. Por ello sólo se usa en casos excepcionales, cuando existen antecedentes de *hidrops* de presentación muy precoz, o de muerte intrauterina precoz. Cuando está indicado el tratamiento, se comienza a las 14 semanas de gestación en espera de realizar una transfusión intraperitoneal a las 16 o 18 semanas, y se prosigue con TIV a partir de las 18 o 20 semanas. En estos casos, la metodología es realizar dos plasmaféresis de 2.000 mL en un intervalo de 48 h (días 1 y 3), seguidas de la administración durante dos días consecutivos (días 3 y 4) de inmunoglobulina endovenosa a dosis de 0,8 g/kg+20 g cada día.

Prevención de la isoimmunización Rh

En gestantes Rh (D) negativo, no sensibilizadas, cuya pareja sea Rh(D) positivo o se desconozca su grupo Rh(D), está indicada la administración de Ig anti-D en las siguientes situaciones:

- 300 mcg dentro de las 72 horas siguientes al parto de un feto Rh (D) positivo. Esta dosis es suficiente para proteger de una sensibilización causada por una hemorragia feto-materna de 30 mL. Si se sospecha un volumen de hemorragia feto-

materna superior (por ejemplo, en caso de placenta previa o *abruptio placentae*) puede ser útil la cuantificación de la hemorragia mediante el test de Kleihauer, para ajustar la dosis de Ig anti-D. Si por cualquier motivo se omitió la administración de la gammaglobulina anti-D dentro de las primeras 72 horas, se recomienda su administración incluso hasta 28 días después del parto.⁵⁸

- 300 mcg a las 28 semanas de gestación. Esta práctica permite reducir la incidencia de isoimmunización desde el 2% hasta el 0,1%.⁵⁹
- 50 mcg (durante el primer trimestre) o 300 mcg (en el segundo trimestre o posterior) en todas las mujeres que sufren un aborto espontáneo o inducido, embarazo ectópico o hemorragia vaginal de probable origen uterino.
- 50 mcg (durante el primer trimestre) o 300 mcg (en el segundo trimestre o posterior) en todas las exploraciones que comporten riesgo de hemorragia feto-materna como biopsia corial, amniocentesis, cordocentesis, versión cefálica externa, etc.

Esquema de protocolo de actuación

1. Protocolo en gestantes no sensibilizadas (Ver Figura 1 en Capítulo 22)

1.1. En gestantes **Rh positivo no sensibilizadas** se repetirá el Coombs indirecto entre las 24 y 34 semanas. También se repetirá si es transfundida, se sospecha hemorragia feto-materna por procedimientos de diagnóstico prenatal, o en casos de trauma abdominal.

1.2. En gestantes **Rh negativo, no sensibilizadas** se repetirá el Coombs indirecto antes de las 28 semanas de gestación. Si no se detectan anticuerpos, se procederá a la profilaxis antenatal mediante la administración de la gammaglobulina Rh, y si aparecen anticuerpos, debe seguirse el protocolo de acuerdo con las gestantes sensibilizadas.

2. Protocolo en gestantes sensibilizadas (Ver Figura 2 en Capítulo 22)

Toda gestante Rh (D) negativo o positivo, sensibilizada por un anticuerpo, debe ser evaluada teniendo en cuenta la significación clínica del anticuerpo y los antecedentes obstétricos. En caso de antecedentes obstétricos, o de presencia de anticuerpos capaces de provocar una enfermedad hemolítica perinatal (EHP), es necesario remitirla a un centro con experiencia en el manejo clínico prenatal de la isoimmunización.

2.1. Las gestantes con anticuerpos no significativos clínicamente de clase IgM confirmados, en ausencia de componente IgG. Es el caso de anticuerpos de las especificidades anti-Le^a, anti-M, anti-P1, anti-I, etc. Anticuerpos frecuentes en las gestantes, generalmente de clase IgM, y que no afectarán al feto. Estas gestantes pueden continuar con un seguimiento similar al de las gestantes Rh negativas no sensibilizadas.

2.2. Las gestantes con anticuerpos clínicamente significativos de clase IgG, y fundamentalmente de especificidad anti-D, requieren la realización, simultánea o progresiva, de diferentes estu-

dios que ayudan a predecir la magnitud potencial del problema generado por la confirmación de la incompatibilidad materno-fetal:

- Titulación o cuantificación del anticuerpo materno.
- Estudio del fenotipo del padre para determinar el grado de cigosidad del antígeno.
- Análisis del genotipo Rh(D) fetal para confirmar la incompatibilidad.
- Pruebas para valorar o predecir el grado de afectación fetal.

Las gestantes se someterán a un “control de valoración CV” periódico con:

- Ecografía para detectar signos precoces de *hidrops*.
- Estudio Doppler de la arteria cerebral media.
- Monitorización del título del anticuerpo.

2.2.1. Cuando no hay antecedentes obstétricos se procederá al seguimiento de la gestante a partir de las 20 semanas de gestación, en función del título del anticuerpo:

2.2.1.1. Si el **título de anticuerpos es inferior a 1/128** (15 UI/mL) raramente se acompaña de enfermedad grave, por lo que puede repetirse coincidiendo con las consultas de valoración (CV), cada 3 o 4 semanas, desde las 20 SG.

2.2.1.2. Si el **título de anticuerpos es igual o superior a 1/128** (15 UI/mL), o hay una elevación rápida del título con respecto al basal (mayor de dos diluciones) y no existen malos antecedentes, se realizará un control cada dos semanas,

a partir de la semana 20, y se practicará una cordocentesis cuando se detecten hallazgos ecográficos y/o Doppler.

2.2.2. Cuando hay antecedentes obstétricos. Se debe comenzar antes de las 10 semanas del evento anterior, realizando CV cada dos semanas (Anexo 1).

2.2.2.1. En los casos de **antecedentes menores**, como fototerapia, transfusión o exanguinotransfusión, se procederá con CV cada dos semanas, comenzando en la semana 20. Pueden seguirse los mismos criterios que en el caso de título igual o superior a 1/128 y sin antecedentes.

2.2.2.2. En los casos de **antecedentes mayores** con muerte intrauterina precoz, en los que pueda sospecharse hemólisis antes de las 18 SG, se procederá a realizar un tratamiento con gammaglobulinas intravenosas entre las semanas 14 a 16, combinado o no con plasmáferesis en función de la gravedad y precocidad de los antecedentes, seguido de transfusión intraperitoneal en las semanas 16 a 18, para continuar con transfusión intravascular a partir de las semanas 18 o 20.

Referencias

- Geifman-Holtzman, O., Wojtowycz, M., Kosmas, E., Artal, R. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. *Obstet Gynecol.*, 1997; 89:272-5.
- Chávez, G. F., Mulinare, J., Edmonds, L. D. Epidemiology of Rh hemolytic disease of the newborn in the United States. *JAMA*, 1991; 265:3270-4.
- Martin, J. A., Hamilton, B. E., Ventura, S. J., Menacker, F., Park, M. M. Births: Final data for 2000. *Natl Vital Stat Rep.*, 2002; 50:1-101.
- Iturrioz, R. Nuevas aportaciones al conocimiento de la estructura genética de la población vasca. *Cuadernos de Antropología-Etnografía*, 1984; 295-312.
- Cherif-Zahar, B., Mattei, M. G., Le Van Kim, C., Bailly, P., Cartron, J. P., Colin, Y. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization. *Hum Genet.*, 1991; 86:398-400.
- Moise, K. J. Jr. Non-anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 2000; 92:75-81.
- Bowman, J. M., Pollock, J. M., Penston, L. E. Fetomaternal trans-placental hemorrhage during pregnancy and after delivery. *Vox Sang.*, 1986; 51:117-21.
- Bowman, J. M. Hemolytic disease (erythroblastosis fetalis). En: Creasy RK, Resnik R, Eds.: *Maternal-fetal medicine*. 4th ed. Philadelphia: Saunders, 1999:736-767.
- David, M., Smidt, J., Chen, F. C., Stein, U., Dudenhausen JW. Risk factors for fetal-to-maternal transfusion in Rh D-negative women--results of a prospective study on 942 pregnant women. *J Perinat Med.*, 2004; 32:254-7.
- Vaughan, J. I., Manning, M., Warwick, R. M., Letsky, E. A., Murray, N. A., Roberts, I. A. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. *N Engl J Med.*, 1998, Mar 19; 338:798-803.
- Babinszki, A., Lapinski, R. H., Berkowitz, R. L. Prognostic factors and management in pregnancies complicated with severe kell alloimmunization: experiences of the last 13 years. *Am J Perinatol.*, 1998; 15:695-701.
- Nicolaides, K. H., Rodeck, C. H. Maternal serum anti-D antibody concentration and assessment of rhesus isoimmunisation. *Br Med J.*, 1992; 304:1155-6.
- Contreras, M., Garner, S. F., de Silva, M. Prenatal testing to predict the severity of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Curr Opin Hematol.*, 1996; 3:480-4.
- Lambin, P., Debbia, M., Puillandre, P., Brosard, Y. IgG1 and IgG3 anti-D in maternal serum and on the RBCs of infants suffering from HDN: relationship with the severity of the disease. *Transfusion*, 2002; 42:1537-46.
- McKenna, D. S., Nagaraja, H. N., O'Shaughnessy, R. Management of preg-

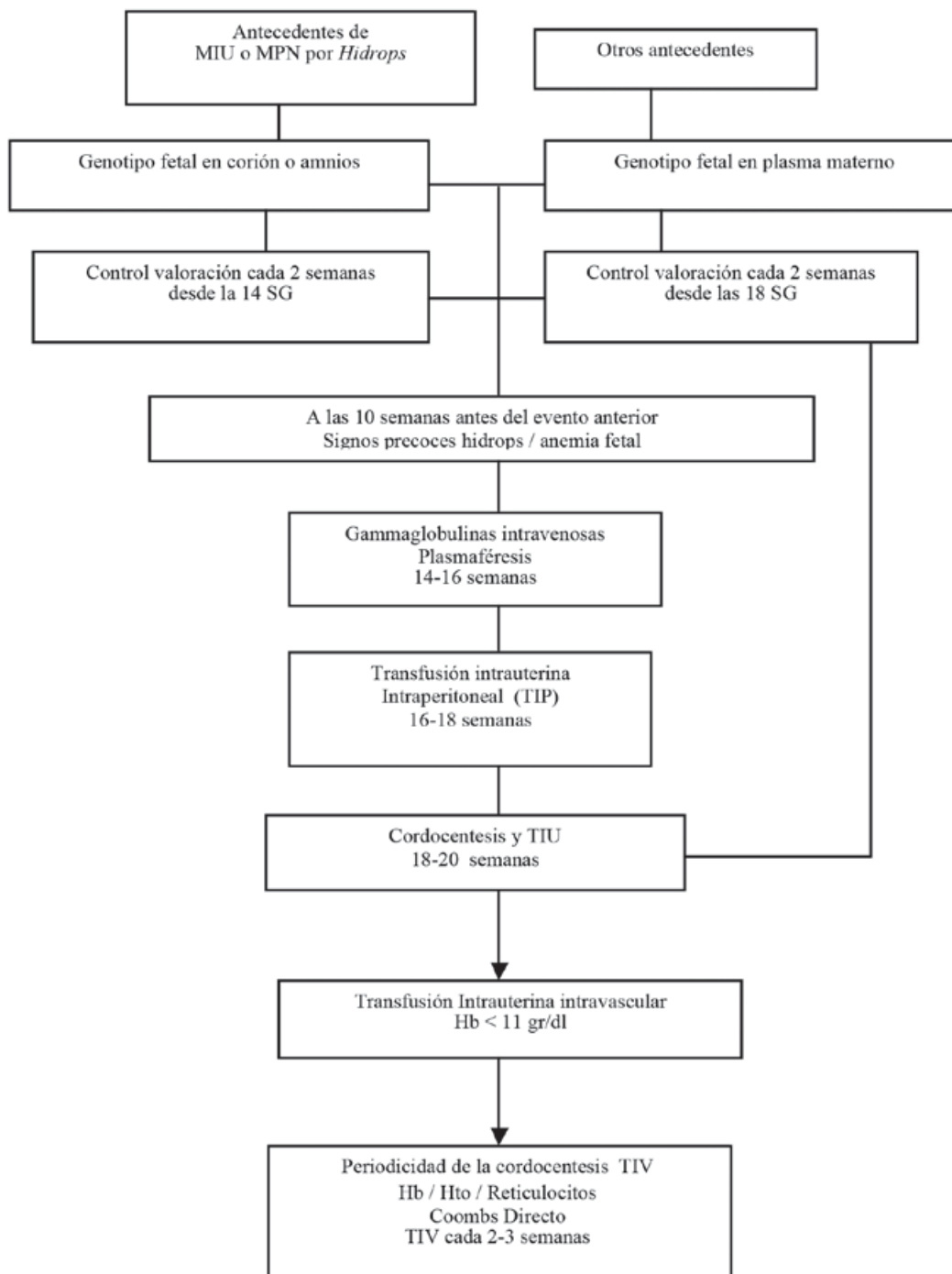
- nancias complicated by anti-Kell isoimmunization. *Obstet Gynecol.*, 1999; 93:667-73.
16. Leggat, H. M., Gibson, J. M., Barron, S. L., Reid, M. M. Anti-Kell in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.*, 1991; 98:162-5.
 17. Freire-Lizama, T., Oepkes, D., Denomme, G., Seaward, G., Fernandes, B., Ryan, G. The value of serial antibody titre assessment in Kell alloimmunized pregnancies (abstract). *Am J Obstet Gynecol.*, 2001, 184:132.
 18. Cerda-Flores, R. M., Barton, S. A., Marty-González, L. F., Rivas, F., Chakraborty, R. Estimation of nonpaternity in the Mexican population of Nuevo Leon: a validation study with blood group markers. *Am J Phys Anthropol.*, 1999; 109:281-93.
 19. Bennett, P. R., Le Van Kim, C., Colin, Y., Warwick, R. M., Cherif-Zahar, B., Fisk, N. M., Cartron, J. P. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med.*, 1993; 329:607-10.
 20. Van Selm, M., Kanhai, H. H., Van Loon, A. J. Detection of fetomaternal haemorrhage associated with cordocentesis using serum alpha-fetoprotein and the Kleihauer technique. *Prenat Diagn.*, 1995; 15:313-6.
 21. Chitrit, Y., Caubel, P., Lusina, D., Boulanger, M., Balledent, F., Schwinte, A. L., Herrero, R. Detection and measurement of fetomaternal hemorrhage following diagnostic cordocentesis. *Fetal Diagn Ther.*, 1998; 13:253-6.
 22. MacGregor, S. N., Silver, R. K., Sholl, J. S. Enhanced sensitization after cordocentesis in a rhesus-isoimmunized pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.*, 1991; 165:382-3.
 23. Hoch, J., Giers, G., Bald, R., Hansmann, M., Hanfland, P. [Antibody induction after intrauterine interventions]. (abstract) *Infusionsther Transfusionsmed*, 1993; 20 Suppl 2:70-3.
 24. Lo, Y. M., Bowell, P. J., Selinger, M., Mackenzie, I. Z., Chamberlain, P., Gillmer, M. D., Elliott, P., Pratt, G., Littlewood, T. J., Fleming, K. A. et al. Prenatal determination of fetal rhesus D status by DNA amplification of peripheral blood of rhesus-negative mothers. *Ann N Y Acad Sci.*, 1994 ; 731:229-36.
 25. Geifman-Holtzman, O., Bernstein, I. M., Berry, S. M., Holtzman, E. J., Vadnais, T. J., DeMaria, M. A. et al. Fetal RhD genotyping in fetal cells flow sorted from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol.*, 1996; 174:818-22.
 26. Lo, Y. M., Hjelm, N. M., Fidler, C., Sargent, I. L., Murphy, M. F., Chamberlain, P. F., Poon, P. M., Redman, C. W., Wainscoat, J. S. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med.*, 1998; 339:1734-8.
 27. Harper, T. C., Finning, K. M., Martin, P., Moise, K. J. Jr. Use of maternal plasma for noninvasive determination of fetal RhD status. *Am J Obstet Gynecol.*, 2004; 191:1730-2.
 28. Liley, A. W. Liquor amni analysis in the management of the pregnancy complicated by resus sensitization. *Am J Obstet Gynecol.*, 1961; 82:1359-70.
 29. Nicolaidis, K. H., Rodeck, C. H., Mibashan, R. S., Kemp, J. R. Have Liley charts outlived their usefulness?. *Am J Obstet Gynecol.*, 1986; 155:90-4.
 30. Pereira, L., Jenkins, T. M., Berghella, V. Conventional management of maternal red cell alloimmunization compared with management by Doppler assessment of middle cerebral artery peak systolic velocity. *Am J Obstet Gynecol.*, 2003; 189:1002-6.
 31. Nishie, E. N., Brizot, M. L., Liao, A. W., Carvalho, M. H., Toma, O., Zugaib, M. A comparison between middle cerebral artery peak systolic velocity and amniotic fluid optical density at 450 nm in the prediction of fetal anemia. *Am J Obstet Gynecol.*, 2003; 188:214-9.
 32. Berkowitz, R. L., Beyth, Y., Sadovsky, E. Death in utero due to Kell sensitization without excessive elevation of the delta OD450 value in amniotic fluid. *Obstet Gynecol.*, 1982; 60:746-9.
 33. Whitecar, P. W., Moise, K. J. Jr. Sonographic methods to detect fetal anemia in red blood cell alloimmunization. *Obstet Gynecol Surv.*, 2000; 55:240-50.
 34. Nicolaidis, K. H., Fontanarosa M, Gabbe SG, Rodeck CH. Failure of ultrasonographic parameters to predict the severity of fetal anemia in rhesus isoimmunization. *Am J Obstet Gynecol.*, 1988; 158:920-6.
 35. Van Kamp, I. L., Klumper, F. J., Bakkum, R. S., Oepkes, D., Meerman, R. H., Scherjon, S.

- A., Kanhai, H. H. The severity of immune fetal hydrops is predictive of fetal outcome after intrauterine treatment. *Am J Obstet Gynecol.*, 2001; 185:668-73.
36. Mari, G., Rahman, F., Olofsson, P., Ozcan, T., Copel, J. A. Increase of fetal hematocrit decreases the middle cerebral artery peak systolic velocity in pregnancies complicated by rhesus alloimmunization. *J Matern Fetal Med.*, 1997; 6:206-8.
 37. Segata, M., Mari, G. Fetal anemia: new technologies. *Curr Opin Obstet Gynecol.*, 2004; 16:153-8.
 38. Mari, G., Deter, R. L., Carpenter, R. L., Rahman, F., Zimmerman, R., Moise, K. J. Jr., Dorman, K. F., Ludomirsky, A., González, R., Gómez, R., Oz, U., Detti, L., Copel, J. A., Bahado-Singh, R., Berry, S., Martínez-Poyer, J., Blackwell, S. C. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med.*, 2000; 342:9-14.
 39. Mari, G., Detti, L., Oz, U., Zimmerman, R., Duerig, P., Stefos, T. Accurate prediction of fetal hemoglobin by Doppler ultrasonography. *Obstet Gynecol.*, 2002; 99:589-93.
 40. Detti, L., Oz, U., Guney, I., Ferguson, J. E., Bahado-Singh, R. O., Mari, G. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. Doppler ultrasound velocimetry for timing the second intrauterine transfusion in fetuses with anemia from red cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol.*, 2001; 185:1048-51.
 41. Stefos, T., Cosmi, E., Detti, L., Mari, G. Correction of fetal anemia on the middle cerebral artery peak systolic velocity. *Obstet Gynecol.*, 2002; 99:211-5.
 42. Alshimmiri, M. M., Hamoud, M. S., Al-Saleh, E. A., Mujabel, K. Y., Al-Harmi, J. A., Thalib, L. Prediction of fetal anemia by middle cerebral artery peak systolic velocity in pregnancies complicated by rhesus isoimmunization. *J Perinatol.*, 2003; 23:536-40.
 43. Deren, O., Onderoglu, L. The value of middle cerebral artery systolic velocity for initial and subsequent management in fetal anemia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 2002; 101:26-30.
 44. Santiago, C., Manzanares, S., Castillo, M. J., Oyonarte, S., Díaz, F., Montoya, F. Valoración del estudio doppler de la arteria cerebral media como método diagnóstico de la anemia fetal. *Prog Obstet Ginecol.*, 2003; 46:15-23.
 45. Ghidini, A., Sepúlveda, W., Lockwood, C. J., Romero, R. Complications of fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol.*, 1993; 168:1339-44.
 46. Daffos, F., Capella-Pavlovsky, M., Forestier, F. Fetal blood sampling during pregnancy with use of a needle guided by ultrasound: a study of 606 consecutive cases. *Am J Obstet Gynecol.*, 1985; 153:655-60.
 47. Tongsong, T., Wanapirak, C., Kunavikantikul, C., Sirirhotiyakul, S., Piyamongkol, W., Chanprapaph, P. Fetal loss rate associated with cordocentesis at midgestation. *Am J Obstet Gynecol.*, 2001; 184:719-23.
 48. Liley, A. W. Intrauterine transfusion of foetus in haemolytic disease. *Br Med J.*, 1963; 2:1107-9.
 49. Gonsoulin, W. J., Moise, K. J. Jr., Milam, J. D., Sala, J. D., Weber, V. W., Carpenter, R. J. Jr. Serial maternal blood donations for intrauterine transfusion. *Obstet Gynecol.*, 1990; 75:158-62.
 50. Mandelbrot, L., Daffos, F., Forestier, F., MacAleese, J., Descombey, D. Assessment of fetal blood volume for computer-assisted management of in utero transfusion. *Fetal Ther.*, 1988; 3:60-6.
 51. Radunovic, N., Lockwood, C. J., Álvarez, M., Plecas, D., Chitkara, U., Berkowitz, R. L. The severely anemic and hydropic isoimmune fetus: Changes in fetal hematocrit associated with intrauterine death. *Obstet Gynecol.*, 1992; 79:390-3.
 52. Klumper, F. J., van Kamp, I. L., Vandenbussche, F. P., Meerman, R. H., Oepkes, D., Scherjon, S. A., Eilers, P. H., Kanhai, H. H. Benefits and risks of fetal red-cell transfusion after 32 weeks gestation. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol.*, 2000; 92:91-6.
 53. Van Kamp, I. L., Klumper, F. J., Oepkes, D., Meerman, R. H., Scherjon, S. A., Vandenbussche, F. P., Kanhai, H. H. Complications of intrauterine intravascular transfusion.

- sion for fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol.*, 2005; 192:171-7.
54. Schumacher, B., Moise, K. J. Jr. Fetal transfusion for red blood cell alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol.*, 1996; 88:137-50.
55. Hudon, L., Moise, K. J. Jr., Hegemier, S. E., Hill, R. M., Moise, A. A., Smith, E. O, Carpenter, R. J. Long-term neurodevelopmental outcome after intrauterine transfusion for the treatment of fetal hemolytic disease. *Am J Obstet Gynecol.*, 1998; 179:858-63.
56. Graham-Pole, J., Barr, W., Willoughby, M. L. Continuous-flow plasmapheresis in management of severe rhesus disease. *Br Med J.*, 1977; 1:1185-8.
57. Voto, L. S., Mathet, E. R., Zapaterio, J. L, Orti, J., Lede, R. L., Margulies, M. High-dose gammaglobulin (IVIg) followed by intrauterine transfusions (IUTs): A new alternative for the treatment of severe fetal hemolytic disease. *J Perinat Med.*, 1997; 25:85-8.
58. Bowman, J. M. Controversies in Rh prophylaxis. Who needs Rh immune globulin and when should it be given? *Am J Obstet Gynecol.*, 1985; 151:289-94.
59. Bowman, J. M. The prevention of Rh immunization. *Transfus Med Rev.*, 1988; 2:129-50.

Anexo 1.

Protocolo de seguimiento en gestantes sensibilizadas con antecedentes obstétricos



Enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido

Pruebas inmunohematológicas en el posparto

VIRGINIA CALLAO MOLINA*
ISABEL PLASENCIA FORNER**
AMPARO BERNARDEZ***
CASI RIOL RODRÍGUEZ****

- * *Médico especialista en Hematología y Hemoterapia. Doctora en Medicina y Cirugía. Jefe de sección Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. callao_vir@gva.es*
- ** *Diplomada universitaria en Enfermería. Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España.*
- *** *Técnico especialista de Laboratorio. Diplomada universitaria en Enfermería. Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana. España. ampa_bv@hotmail.es*
- **** *Diplomada universitaria en Enfermería. Laboratorio de Inmunohematología. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. cruzriol@hotmail.com*

La enfermedad

Recuerdo fisiopatológico

La enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (EHFRN) es un proceso hemolítico progresivo que se desarrolla en la circulación fetal, debido al paso transplacentario de anticuerpos maternos de clase IgG que sensibilizan los hematíes del feto (Figura 1).

En la mayoría de casos se trata de aloanticuerpos que reconocen anti-

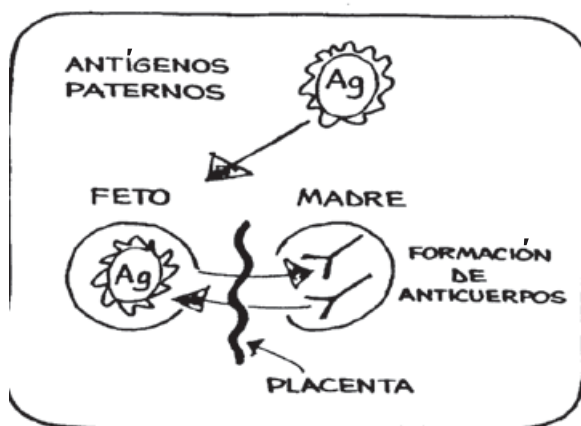


Figura 1. Enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido

genos eritrocitarios fetales de origen paterno, originando una hemólisis extravascular de los hematíes fetales que produce una anemia progresiva de tipo regenerativo y liberación de bilirrubina. No se han descrito casos de hemólisis intravascular dependiente de complemento, y en raras ocasiones se debe a la presencia de autoanticuerpos maternos.

El proceso hemolítico varía desde una forma grave de hemólisis intraútero que se inicia en fases tempranas de la gestación y que puede producir la muerte fetal (por hipoxemia y fallo multiorgánico), hasta un proceso leve que no se detecta hasta el momento del parto o días después (Figura 2).

Tras el nacimiento es posible que aparezca anemia (en ocasiones grave y requiere soporte transfusional) e ictericia que en los casos más graves puede producir un cuadro de afectación del SNC (Kernicterus) (Figura 3).

La sensibilización de los hematíes fetales con anticuerpos maternos no necesariamente conlleva la aparición de la enfermedad. Se deben tener en

cuenta aspectos como el significado clínico de los anticuerpos implicados y otros datos clínico-analíticos de hemólisis.

Formas de la enfermedad

Según los anticuerpos implicados y el origen de los mismos, existen diferentes formas de la enfermedad:

EHFRN por incompatibilidad ABO

Es el cuadro más frecuente y suele tener escasa repercusión clínica aunque se han descrito cuadros graves.¹⁷

No se requiere una aloinmunización materna, ya que los anticuerpos implicados son naturales. Puede aparecer en el primer embarazo.

En la mayoría de casos se trata de mujeres de grupo O que tienen títulos elevados de aglutininas inmunes anti-A o anti-B, pero también se ha descrito en mujeres de grupos A, A2 o B.⁸

Dado que en la mayoría de casos la afectación fetal es mínima, el diagnóstico de esta forma de la enfermedad generalmente se realiza en el momento del parto.

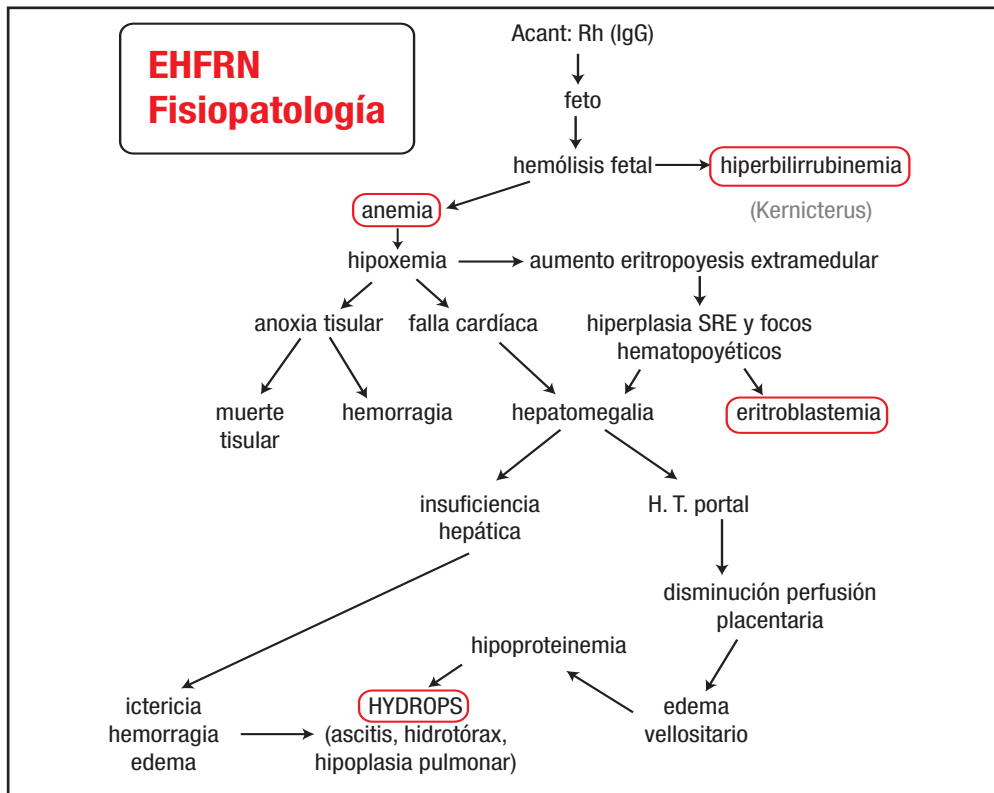


Figura 2. Fisiopatología de la EHFRN

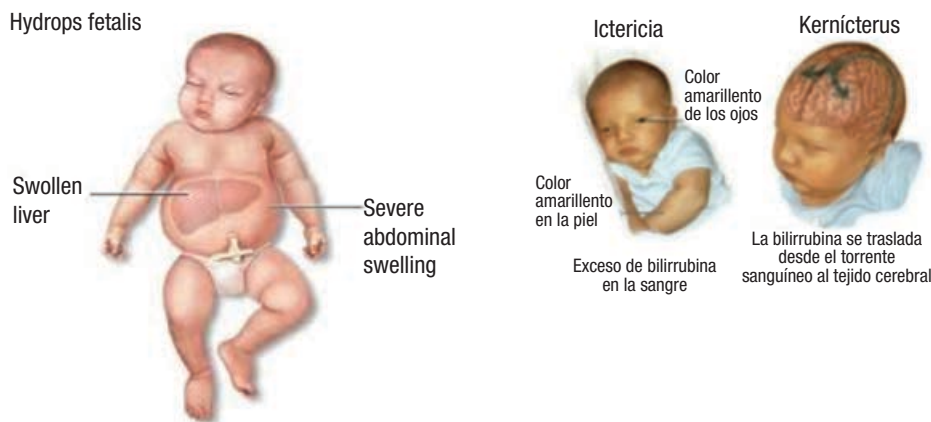


Figura 3. Hydrops fetalis y Kernicterus

EHFRN por anticuerpos irregulares

Se requiere una aloinmunización de la madre frente a antígenos presentes en los hematíes del padre y de los que ella carece. Esta aloinmunización se debe a un antecedente transfusional o de hemorragia transplacentaria (gestaciones, abortos). En el primer caso, la enferme-

dad puede aparecer en la primera gestación, y en el segundo, a partir de la segunda gestación.

Afortunadamente, en la mayoría de casos, la sospecha diagnóstica se produce durante la gestación, de modo que es posible realizar un seguimiento analítico y obstétrico a la madre y una va-

loración del estado fetal y tratamiento intraútero, si fuera necesario.

Sin embargo, en algunas ocasiones, en las que no se ha realizado el control de la gestante, la enfermedad se detecta en el momento del parto o en días posteriores.

EHFRN por anticuerpos frente al antígeno D. Es el cuadro más grave, sin embargo, afortunadamente en la actualidad se ha reducido su incidencia, debido a la

utilización de la gammaglobulina anti-D como medida profiláctica (Figura 4).

EHFRN por anticuerpos frente a otros sistemas antigénicos (Figura 5). La gravedad depende del anticuerpo implicado. Su incidencia ha aumentado en los últimos años, al reducirse la incidencia de casos por anti-D y debido a la realización de estudios de anticuerpos irregulares a gestantes de grupo Rh(D) positivo.¹⁸

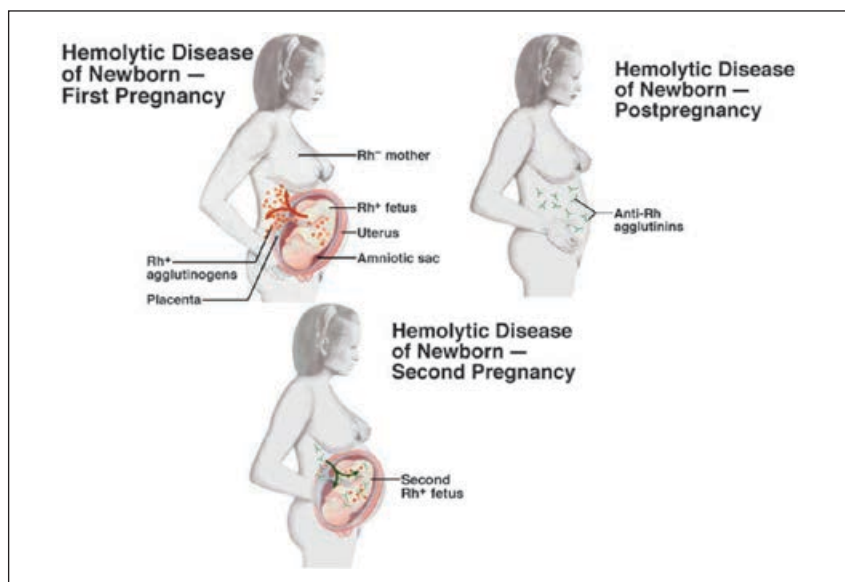


Figura 4. EHFRN por anticuerpos anti-Rh(D)

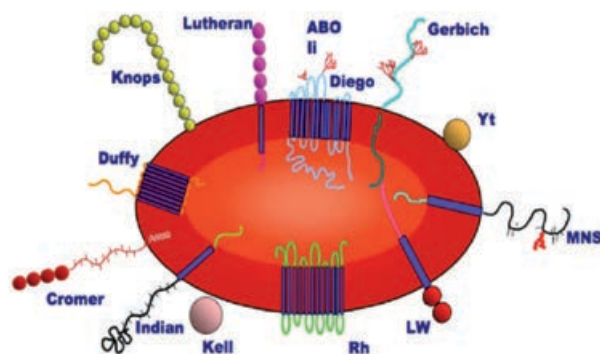


Figura 5. Algunos sistemas de grupo sanguíneo

Diagnóstico de la enfermedad en el posparto

La enfermedad se puede diagnosticar durante la gestación o bien en el posparto.

El diagnóstico realizado durante la gestación se detalla en otro de los capítulos del libro.

Tras el nacimiento del niño, la sospecha diagnóstica surge en el momento de la realización de las pruebas de laboratorio o bien tras alerta desde el servicio de pediatría (en casos en los que existe afectación clínico-analítica evidente).

El **diagnóstico posparto** se basa en la valoración de diferentes aspectos que se detallan a continuación:

Detección del proceso hemolítico en el recién nacido

Lo realiza el pediatra cuando aparecen datos clínicos de hemólisis en el recién nacido y en los casos en los que se ha diagnosticado la enfermedad durante la gestación, y por tanto, se procede a un control estricto del bebé.

Se basa en evaluar la presencia de:

- Datos clínicos: palidez, ictericia...
- Analítica básica: hemoglobina baja, bilirrubina elevada

La concentración de hemoglobina de la sangre de cordón es el parámetro aislado que mejor se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. El valor pronóstico de la bilirrubina es, por sí solo, menor, pero asociado a la hemoglobina es importante.

- Estudio de parámetros de hemólisis (LDH, reticulocitos...).

Se deben descartar otras causas de hemólisis (diagnóstico diferencial: infecciones, sufrimiento fetal, enfermedades congénitas, etc.).

Confirmación del origen inmune de la hemólisis

Se basa en demostrar la presencia de anticuerpos de clase IgG adheridos a la membrana de los hematíes del recién nacido (RN). Para ello se utiliza la técnica de la prueba directa de antiglobulina (PDAG).

La negatividad de la PDAG no excluye la causa inmune de la hemólisis.⁷ Se deben utilizar técnicas complementarias para asegurar o descartar el diagnóstico.

Identificación del anticuerpo implicado

Se realiza de forma distinta, según el tipo de enfermedad.

EHFRN por incompatibilidad ABO

Se basa en demostrar incompatibilidad ABO materno-fetal y la presencia de anticuerpos de clase IgG de origen materno que afectan al feto.

Se utilizan las siguientes técnicas:

- Estudio de grupo sanguíneo ABO del RN y de la madre.
- Estudio del eluido de los hematíes del RN: se enfrenta a hematíes A, B y O, con el fin de confirmar la especificidad de los anticuerpos.
- Estudio de isohemaglutininas inmunes en plasma materno (se puede obviar, si se ha realizado el estudio del eluido de los hematíes del RN).

- Descartar la presencia de anticuerpos irregulares en el plasma materno. En algunos casos puede coincidir una EHFRN por acs. irregulares con una EHFRN por incompatibilidad ABO. En ese caso, se realizan también las técnicas que se detallan a continuación:

EHFRN por anticuerpos irregulares

Se basa en demostrar que la afectación fetal se debe a la presencia de anticuerpos irregulares de origen materno.

Se utilizan las siguientes técnicas:

Estudio e identificación de anticuerpos irregulares en el plasma materno: estudio básico para el diagnóstico.

- **Fenotipo eritrocitario materno y del RN:** se realiza el fenotipo que nos interese según el anticuerpo o anticuerpos implicados.
- **Estudio del eluido de los hematíes del RN:** se enfrenta a hematíes de fenotipo complementario para identificar los anticuerpos implicados.
- **Pruebas de compatibilidad con hematíes del padre,** cuando sea necesario.

Técnicas utilizadas para el diagnóstico de EHFRN en el posparto

Tipaje de grupos sanguíneos ABO y Rh(D)

Sirve para evaluar si existe incompatibilidad materno-fetal y para decidir la necesidad de administrar gammaglobulina anti-D a la madre, en las 72 horas posparto.

1. Muestra materna

- Tipaje ABO convencional (pruebas globular y sérica)
- Rh(D): se aconseja utilizar un reactivo que no detecte la variante DVI. Ante reacciones débiles, y mientras no se confirma el tipaje, se debe valorar como Rh(D) negativo a todos los efectos.

2. Muestra del RN (sangre de cordón/ sangre periférica)

- Tipaje ABO: únicamente se realiza el estudio de la parte globular
- Tipaje Rh(D): en caso de resultado negativo, descartar variantes débiles. Ante la duda, considerarlo como Rh(D) positivo, a efectos de administración de la gammaglobulina anti-D a la madre.

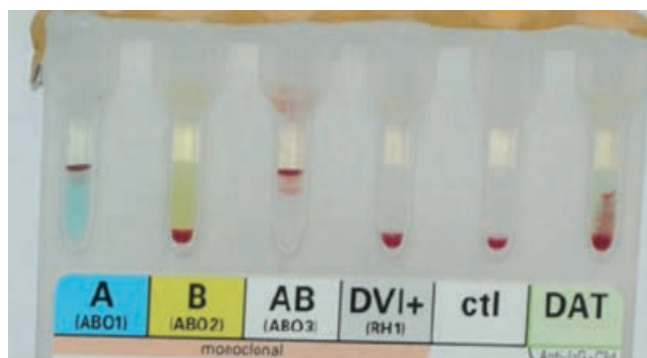


Figura 6. Estudio inmunohematológico del neonato

Prueba directa de antiglobulina o test directo de Coombs

Se realiza en la muestra de sangre de cordón o de sangre periférica del RN, anticoagulada con EDTA.

Sirve para detectar la presencia *in vivo* de anticuerpos adheridos en la membrana de los hematíes.

Se basa en la utilización del reactivo antiglobulina humana, que facilita la aglutinación de los hematíes recubiertos de anticuerpos de clase IgG.

Es una prueba básica para el diagnóstico de la EHFRN, pero no debe valorarse de forma aislada, sino acompañada de otras pruebas clínico-analíticas.

La intensidad de la PDAG no siempre se relaciona con la gravedad de la enfermedad: en la mayoría de casos de enfermedad grave, la PDAG es fuertemente positiva; y si la enfermedad es leve, la prueba suele ser débilmente positiva, pero esta premisa no siempre se cumple.¹²

Según Dinesh, el valor predictivo positivo de la prueba para la EHFRN es del 23%. La sensibilidad es del 86%.³

Su **positividad** orienta a que, el proceso hemolítico que se sospecha en el paciente, sea de causa inmunológica.

Un neonato con una PDAG positiva tiene 59% de probabilidad de desarrollar un proceso hemolítico significativo.⁵

Su **negatividad** sugiere fuertemente que el RN no está afectado,⁶ sin embargo, no se descarta en absoluto que la hemólisis sea de causa inmunológica:

- Existen casos en los que el número de moléculas de IgG adheridas a la membrana es pequeño y no se detectan en esta prueba.
- Existen casos graves en los que la intensa hemólisis de los hematíes no permite detectar los anticuerpos adheridos a la membrana.⁷
- Si la sospecha diagnóstica es firme, se deben realizar pruebas complementarias antes de descartar la enfermedad.

Técnicas de elución

La elución se fundamenta en la capacidad de deshacer la unión antígeno-anticuerpo, utilizando métodos físicos o químicos (cambios de pH o de temperatura, ultrasonidos, detergentes, disolventes orgánicos...)

Las técnicas de elución permiten desprender los anticuerpos adheridos a la membrana de los hematíes para su pos-

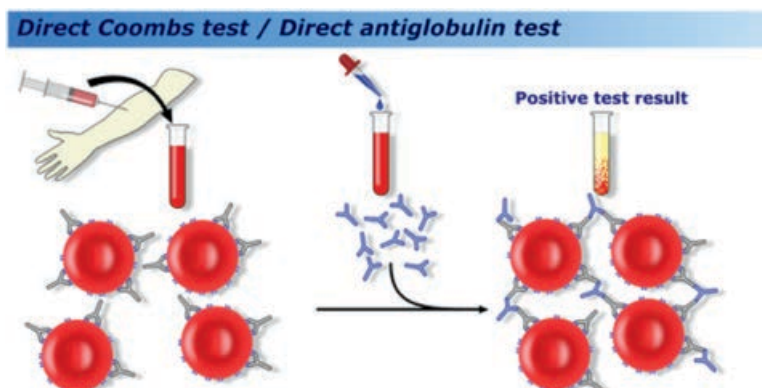


Figura 7. Prueba directa de antiglobulina

terior estudio. Se obtiene una muestra de plasma que denominamos eluido.

Existen diferentes técnicas de elución (congelación/descongelación, calor, cloroquina, éter, EDTA-glicina). Esta última es la técnica de elección para estudiar hematíes recubiertos de IgG.³ La técnica de congelación/descongelación (Lui) es muy eficiente para el estudio de anticuerpos del sistema ABO (Tabla 1).

El estudio del eluido permite determinar la especificidad de los anticuerpos implicados en el proceso, enfrentándolo a hematíes con el fenotipo que nos interesa.

Estas técnicas son útiles, además, para confirmar o descartar la presencia de anticuerpos, en caso de que la PDAG sea negativa, pero la sospecha clínica sea firme.

Escrutinio de anticuerpos irregulares (Prueba indirecta de antiglobulina o test indirecto de Coombs)

Sirve para detectar la presencia de anticuerpos irregulares en una muestra de suero, plasma o eluido.

Se fundamenta en la prueba indirecta de antiglobulina, basada en la utilización del reactivo antiglobulina humana, que permite la aglutinación de los hematíes recubiertos por anticuerpos IgG y/o complemento, tras una sensibilización *in vitro* de los mismos (Figura 8).

A diferencia del test directo, se precisa de una incubación del plasma problema junto a hematíes de fenotipo conocido. Se deben utilizar diferentes hematíes con fenotipo complementario, en los que estén representados la mayoría de antígenos de los sistemas clínicamente significativos (Figura 9).

Si la prueba es positiva, se debe completar con estudios de identificación para determinar la especificidad de dichos anticuerpos.

Identificación de anticuerpos irregulares

Son técnicas dirigidas a identificar los anticuerpos irregulares detectados en la técnica de escrutinio (Figura 10).

Tabla 1. Algunos métodos de elución

Método	Objeto	Inconvenientes
Calor (56°C)	Anticuerpos de clase IgM . Anticuerpos fríos	Escasa sensibilidad para resto de auto/aloanticuerpos
Congelación-descongelación (Lui)	Anticuerpos de clase IgM . EHFRN por ABO<	Escasa sensibilidad para resto de auto/aloanticuerpos
Elución por éter	Anticuerpos de clase IgG	No es útil para detectar anticuerpos de tipo IgM
EDTA-Glicina	Anticuerpos de clase IgG e IgM Alta sensibilidad Protege la membrana	Desnaturaliza los antígenos sistema Kell

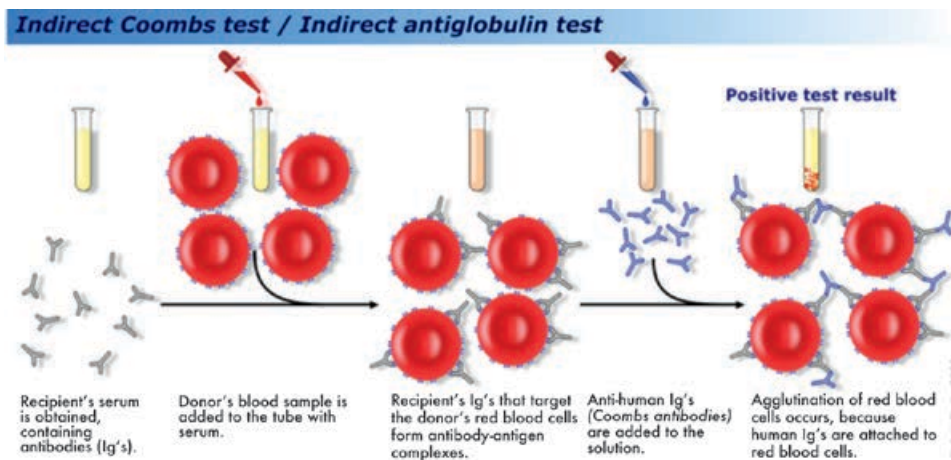


Figura 8. Prueba indirecta de antiglobulina

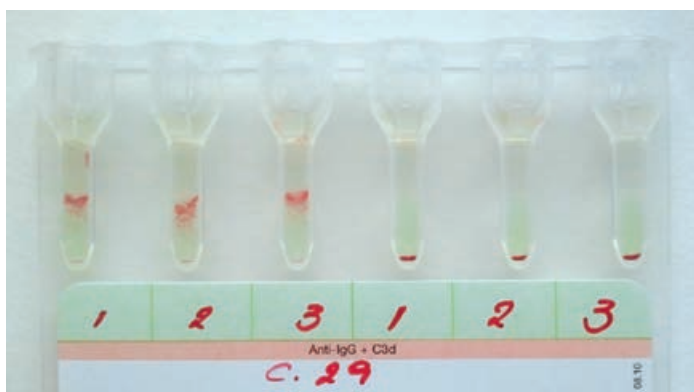


Figura 9. Dos pruebas de escrutinio de anticuerpos, una positiva y otra negativa

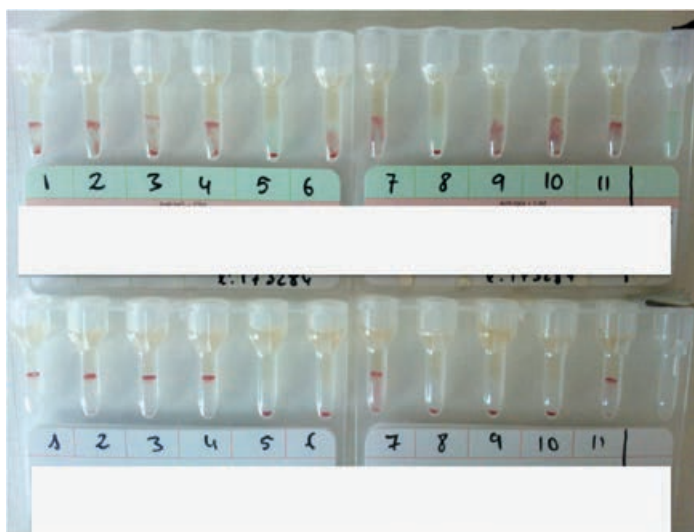


Figura 10. Paneles de identificación de anticuerpos, en antiglobulina y en enzimas

Se basan en enfrentar el plasma o suero problema a uno o varios paneles de hematíes de diferente fenotipo, utilizando como base diversas técnicas que potencian o inhiben las reacciones (Liss, antiglobulina, enzimas, PEG).

Hay que tener en cuenta una serie de consideraciones:

- No todos los anticuerpos que se detectan tienen significado clínico.
- En casos de madres Rh(D) negativo, que han recibido la gammaglobulina anti-D durante la gestación, encontramos un estudio compatible con un anticuerpo de especificidad anti-D. La evaluación de los antecedentes nos permitirá diferenciar entre un anticuerpo pasivo y una aloinmunización, información necesaria para decidir la administración de la gammaglobulina anti-D en las 72 horas después del parto (si el RN es Rh(D) negativo).
- Si el estudio de anticuerpos irregulares es negativo, con las técnicas convencionales, se deben utilizar técnicas complementarias para asegurar el diagnóstico (descartar un anticuerpo contra un antígeno privado o de baja incidencia). Es útil trabajar con los hematíes del padre.
- En casos en los que se sospecha la presencia de múltiples anticuerpos o bien de un anticuerpo contra un antígeno público o de alta frecuencia, se deben utilizar técnicas complementarias para llegar al diagnóstico (adsorciones, fenotipo y/o genotipo eritrocitario, pruebas cruzadas con hematíes carentes de antígenos públicos, etc.).

Estudios con hematíes del padre

Sirven para demostrar la presencia de anticuerpos maternos contra un antígeno de baja incidencia, presente en los hematíes del padre y en los del niño.

Se realizan en casos en los que el estudio de anticuerpos irregulares en plasma materno es negativo con las técnicas convencionales, pero la PDAG es positiva y la sospecha clínico-analítica es clara.

- Pruebas cruzadas con hematíes del padre: se realizan con el plasma de la madre (siempre que no haya incompatibilidad ABO) o con el eluido de los hematíes del RN.
- Fenotipo o genotipo paterno.

Estudio de isohemaglutininas inmunes en plasma materno

Se basa en determinar el título de aglutininas inmunes anti-A y/o anti-B en el plasma de la madre, con el fin de confirmar la implicación de estas proteínas en la afectación fetal (Figura 11).

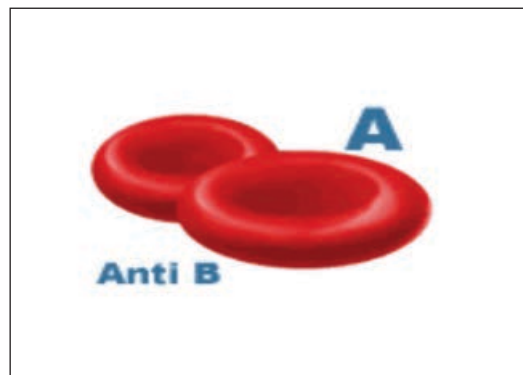


Figura 11. Determinación del grupo ABO

Un título > 256 se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. Sin embargo, títulos bajos, no excluyen el diagnóstico.

En la actualidad es una prueba que tiene poco valor en la práctica clínica. Únicamente tiene utilidad ante la sospecha de EHFRN por incompatibilidad ABO, en el caso de que el estudio del eluido no sea concluyente o no se disponga de la técnica para su realización.

Cuantificación de la hemorragia feto-materna

En el momento del parto se produce una hemorragia feto-materna (HFM) significativa que puede aumentar el riesgo de aloinmunización materna y por tanto de afectación fetal en las siguientes gestaciones. Según Uriel, en más del 96% de casos el volumen de HFM es <1,15 mL.¹⁴

Se sabe que una dosis de 100 µg (500UI) de gammaglobulina anti-D es suficiente para prevenir la aloinmunización provocada por una HMF de hasta 4 mL. Las hemorragias mayores son raras, pero impredecibles (0,3%-1%), y no estarían cubiertas por dicha dosis.

Existe la posibilidad de valorar el volumen de HFM, con el fin de ajustar la dosis de gammaglobulina anti-D necesaria para evitar la sensibilización de la madre.

Las técnicas más utilizadas para la cuantificación de la HFM son: la elución ácida (Test de Kleihauer-Betke) y la citometría de flujo (CMF)

El método de la **elución ácida** se basa en las diferencias que existen entre la hemoglobina F de los hematíes fetales y la hemoglobina A de los hematíes maternos (Figura 12).

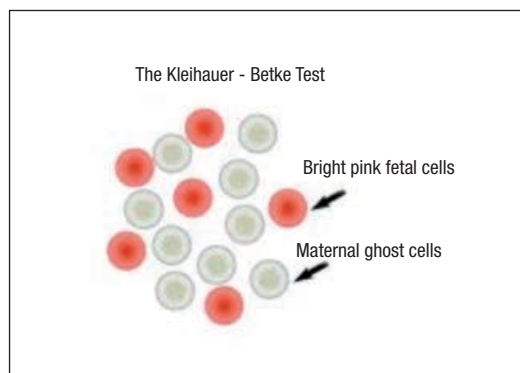


Figura 12. Test de Kleihauer- Betke

La **citometría de flujo** detecta en la circulación materna una población minoritaria de hematíes Rh(D) positivo fetales marcados con un fluorocromo conjugado con un anticuerpo monoclonal IgG anti-D.

La elución ácida se utiliza como técnica de *screening*, y la CMF se recomienda como método de referencia y de confirmación ante un *screening* positivo.^{1,2}

Recomendaciones para el estudio materno-fetal en el posparto

Existe controversia en torno a las pruebas inmunohematológicas que se deben realizar en el posparto.

Históricamente se efectúa el estudio de la PDAG a todos los recién nacidos, además del tipaje ABO Rh(D); y de manera sistemática, en muchos casos se realiza también el tipaje ABO Rh(D) y el escrutinio de anticuerpos irregulares a la madre.

Sin embargo, la introducción de la profilaxis con gammaglobulina anti-D ha generado muchos casos de resultados falsos positivos en 3%-6% de las muestras (Dalton, Parker), que produ-

cen un aumento de estudios de laboratorio complementarios y ansiedad en los padres. Hay evidencia de que la administración de la gammaglobulina anti-D a la madre no se relaciona con mayor riesgo de afectación fetal.

Por otra parte, estudios recientes demuestran que la positividad de la PDAG no es buena predictora de hiperbilirrubinemia.

Numerosos autores defienden que la PDAG no se debe generalizar, sino realizar únicamente en casos concretos:

- Dinesh defiende que la ictericia, más que la positividad de la PDAG, es la primera alerta en la mayoría de casos de EHFRN y cuestiona la importancia de generalizar dicha prueba.⁵
- Levine comenta que la PDAG no es ni diagnóstica ni predictiva de la gravedad de la enfermedad y no se correlaciona bien con el nivel de bilirrubina. Defiende la no generalización de la prueba.¹¹
- Tatopoulous dice que la realización sistemática de la PDAG en RN de madre O aumenta la capacidad de predecir hiperbilirrubinemia grave. Sin embargo, cree que la generalización de la prueba es cuestionable.¹³
- James y su grupo son partidarios de no generalizar la realización de la PDAG, tal como recomienda el *British Committee for Standards in Haematology* (Tablas 1 y 2).^{6,9}

No obstante, otros autores (Serrenten, Dillon) consideran la PDAG como la base del diagnóstico de la enfermedad y opinan que se debe realizar en todos los RN de madre O.⁴

A continuación se detallan las recomendaciones del *British Committee for Standards in Haematology*⁶ y del *Scientific Coordinating Comitee of the AABB*, para los tests en el posparto.¹⁹

Pruebas pretransfusionales

En los casos de EHFRN en los que se indica una transfusión sanguínea o una exanguinotransfusión, se deben realizar pruebas de compatibilidad pretransfusional.¹⁵

- Transfusión sanguínea
 - Muestra de sangre anticoagulada con EDTA del RN y si es posible de la madre.
 - Información sobre el tipaje ABO y Rh(D) de ambos y estudio de anticuerpos irregulares de la madre (también se puede realizar en el plasma del RN).
 - Los hematíes a transfundir deben ser compatibles ABO con el plasma del RN y carentes del antígeno contra el que va dirigido al anticuerpo materno.
 - Prueba cruzada entre los hematíes a transfundir y plasma del RN (también se puede realizar con el plasma de la madre)
- Exanguinotransfusión

Se siguen los mismos pasos que en la transfusión convencional, pero teniendo en cuenta que se debe infundir sangre total; por tanto, es necesario que el plasma sea también compatible con los hematíes del RN (Figura 13).

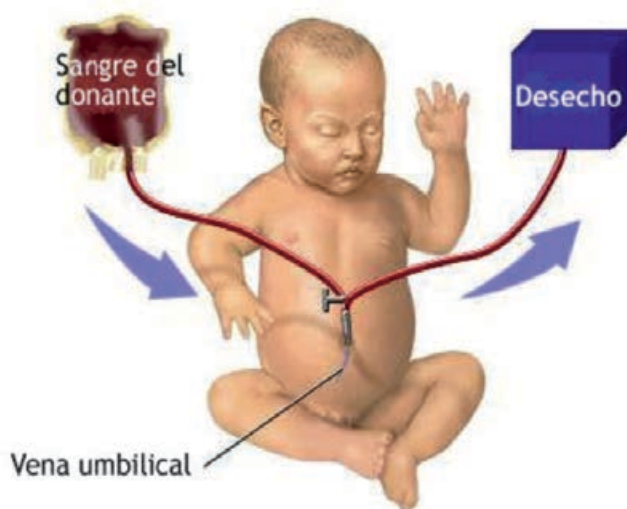
Tener en cuenta que, si se realiza transfusión intra-útero previamente, el componente sanguíneo debe ser irradiado.

Tabla 2. Determinaciones recomendadas en muestra materna

Determinaciones en muestra materna	
ABO/Rh(D)	- Únicamente cuando no se conoce o cuando existen menos de dos determinaciones previas. - En pruebas pretransfusionales
Escrutinio de anticuerpos irregulares	- Cuando no se conoce - En pruebas pretransfusionales
Identificación de anticuerpos irregulares	- Si es la primera vez que se detectan aloanticuerpos
Titulación	- No indicada
Cuantificación de HFM	- En madres Rh(D) negativo y RN Rh(D) positivo
Diagnóstico de EHFRN	- ABO/Rh(D) - Estudio de anticuerpos irregulares, si no se conoce - Test frente a hematíes paternos, si es necesario

Tabla 3. Determinaciones recomendadas en muestra del recién nacido

Determinaciones en muestra del RN	
Si la madre es Rh(D) negativo	-Tipaje Rh(D). No PDAG
Si la madre tiene anticuerpos irregulares	-ABO/Rh(D) -PDAG -Eluido y fenotipo eritrocitario -Estudios de Hb y Br
Clínica de EHFRN, pero la madre con escrutinio negativo	-ABO/Rh(D) -PDAG -Eluido -Descartar incompatibilidad ABO feto-materna -Estudios con hematíes del padre

**Figura 13.** Exanguinotransfusión

Conclusiones

La EHFRN es una patología que todavía existe en nuestro medio. Afortunadamente cada vez es más frecuente el diagnóstico precoz, lo que permite un manejo adecuado y evita casos de enfermedad grave. Esto se ha conseguido gracias al trabajo multidisciplinar de obstetras y hematólogos y a la aplicación de protocolos consensuados y técnicas inmunohematológicas avanzadas.

El laboratorio de Inmunohematología tiene un papel fundamental, también en el posparto, en varios aspectos fundamentales:

1. Diagnóstico de la enfermedad, en casos en los que no se ha detectado durante la gestación.
2. Ayuda en la evaluación de afectación fetal, en los casos diagnosticados.
3. Ayuda en la decisión de administrar la gammaglobulina anti-D a la madre.
4. Cuantificación de la hemorragia feto-materna para el ajuste de dosis de la gammaglobulina anti-D.
5. Realización de las pruebas pretransfusionales en los casos en los que se necesite transfusión sanguínea o exanguinotransfusión.

Disponemos de diversas técnicas, cuya utilización adecuada es básica para realizar un enfoque objetivo de la situación materno-infantil.

La realización sistemática de la PDAG a todos los RN no está justificada.

Cada laboratorio debe decidir cuáles son las pruebas analíticas a realizar

en el posparto, en las muestras de las madres y de los RN, con base en estudios propios o en las recomendaciones de expertos.

Referencias

1. Austin, E. et al. Guidelines for the Estimation of Fetomaternal Haemorrhage. Working Party of the British Committee for Standards in Haematology, Transfusion Taskforce. 2009.
2. Agarwal, P., Sekhar, Das, S., Gupta, R., Khetan, D., Chaudhary, R. Quantification of feto-maternal hemorrhage: selection of techniques for a resource-poor setting. *Gynecol Obstet Invest.*, 2011; 71(1):47-52.
3. Burin des Roziers, N., Squalli, S. Removing IgG antibodies from intact red cells: comparison of acid and EDTA, heat, and chloroquine elution methods. *Transfusion*, 1997, May; 37(5):497-501.
4. Dillon, A., Chaudhari, T., Crispin, P., Shadbolt, B., Kent, A. Has anti-D prophylaxis increased the rate of positive direct antiglobulin test results and can the direct antiglobulin test predict need for phototherapy in Rh/ABO incompatibility? *J Paediatr Child Health*, 2011, Jan; 47(1-2):40-3.
5. Dinesh, D. Review of positive direct antiglobulin tests found on cord blood sampling. *J Paediatr Child Health*, 2005, Sep-Oct; 41(9-10):504-7.
6. Gooch, A., Parker, J., Wray, J., Qureshi, H. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. *British Committee for Standards in Haematology*, 2006, Jul.
7. Heddel, N. M. et al. Three examples of Rh haemolytic disease of the newborn with a negative direct antiglobulin test. *Transfus Med.*, 1995, Jun; 5(2):113-6.
8. Herschel, M., Karrison, T., Wen, M., Caldarelli, L., Baron, B. Isoimmunization is unlikely to be the cause of hemolysis in ABO-incompatible but direct antiglobulin test-negative neonates. *Pediatrics*, 2002, Jul; 110(1 Pt 1):127-30.
9. James, R. M., McGuire, W., Smith, D. P. The investigation of infants with RhD-negative

- mothers: can we safely omit the umbilical cord blood direct antiglobulin test? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*, 2011, Jul; 96(4):F301-4.
10. Kumlien, G., Sarman, I., Shanwell, A. A case of neonatal ABO immunization which was difficult to diagnose. The mother with blood group A2 and the infant with negative direct antiglobulin test. *Lakartidningen*, 2000, Sep 20; 97(38):4138-40.
 11. Levine, D. H., Meyer, H. B. Newborn screening for ABO hemolytic disease. *Clin Pediatr (Phila)*, 1985, Jul; 24(7):391-4.
 12. Petz, L. and Garraty, G. Hemolytic disease of the fetus and newborn. In: *Inmune Hemolytic Anemias*. Chapter 13. Second edition, 2004.
 13. Tatopoulos, A., Hubert, C., Vieux, R., Hascoët, J. M. What blood tests to predict severe hyperbilirubinemia in early maternity discharge. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 2010, May; 39(3):218-23.
 14. Uriel, M., Subirá, D., Plaza, J., Castañón, S., Cañamares, M., Recasens, J. D. Identification of feto-maternal haemorrhage around labour using flow cytometry immunophenotyping. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 2010, Jul; 151(1):20-5.
 15. Transfusion guidelines for neonates and older children. *British Journal of Haematology*, 2004. 124, 433-453.
 16. Geaghan, S. M. Diagnostic laboratory technologies for the fetus and neonate with isoimmunization. *Semin Perinatol*, 2011, Jun; 35(3):148-54.
 17. Bhat, Y. R., Kumar, C. G. Morbidity of ABO haemolytic disease in the newborn. *Pediatric Int Child Health*, 2012, May; 32(2):93-6.
 18. Karagol, B. S., Zenciroglu, A., Okumus, N., Karadag, N., Dursun, A., Hakan, N. Hemolytic disease of the newborn caused by irregular blood subgroup (Kell, C, c, E, and e) incompatibilities: report of 106 cases at a tertiary-care centre. *Am J Perinatol.*, 2012, Jun; 29(6):449-54.
 19. Judd, W. J. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited. *Transfusion*, 2001, Nov (41); 1445-52.

Contribución de las técnicas moleculares a la EHFRN

NÚRIA NOGUÉS*
CARLOS COTORRUELO**

Asignación objetiva del grupo RhD en la gestante

Como ya se ha comentado en el Capítulo 5 del Sistema Rh, aproximadamente entre 1%-2% de los individuos de población caucásica son portadores de una variante RhD, y presentan una expresión alterada del antígeno D. Durante la determinación del grupo RhD de las gestantes, esta expresión alterada se pone de manifiesto, ya sea por reacciones de intensidad inferior a la habitual ($\leq 2+$) con uno o con los dos reactivos anti-D que se utilizan habitualmente, o bien por una discordancia entre la reac-

* *Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. nnogues@bst.cat*

** *Profesor asociado. Área Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Investigador adjunto. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina. ccotrru@fbioyf.unr.edu.ar*

tividad de uno y otro. Estos patrones de reactividad se ven representados con una frecuencia aun mayor en poblaciones de raza negra o multiétnicas.

Entre las numerosas variantes RhD descritas se encuentran algunas, como la variante DVI, con una expresión parcial de los epítomos D y con riesgo evidente de inmunización frente a los epítomos D no expresados, por lo que las gestantes DVI se consideran como RhD negativo. Por otro lado, existe un grupo relativamente reducido de variantes D débil que representan en su conjunto más del 90% de las muestras con una expresión débil del antígeno D. Se trata de las variantes D débil tipo 1, 2 y 3, cuya base molecular está bien caracterizada y se determinan de forma sencilla mediante métodos de genotipaje (Ver *Tipaje molecular* en el Capítulo 5 Sistema Rh). Las gestantes portadoras de alguna de estas variantes no se sensibilizan frente a un antígeno D normal, y por tanto, son consideradas RhD positivo, evitando así la administración innecesaria de la gammaglobulina anti-D. La identificación inequívoca de estas y otras variantes clínicamente significativas solo es posible mediante aproximaciones de tipificación molecular, ya que la reactividad que presentan con diferentes reactivos anti-D no es suficientemente concluyente. La implementación progresiva de técnicas de tipaje molecular, hoy en día centralizadas mayoritariamente en centros de referencia, permite reconocer estas variantes alélicas y asignar de forma objetiva el grupo RhD de las gestantes, con base en la evidencia recogida sobre el riesgo de aloinmunización potencial de la variante RhD concreta identificada.

Análisis del genotipo fetal

Uno de los ámbitos en los que la contribución de las técnicas de tipificación molecular de grupos sanguíneos ha sido más relevante es, sin duda, el diagnóstico prenatal. En la actualidad, la determinación del genotipo fetal es posible para la gran mayoría de especificidades de grupo sanguíneo asociadas a un riesgo de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido. La identificación prenatal del grupo sanguíneo fetal resulta especialmente útil para reconocer aquellos fetos negativos para el antígeno contra el que la madre está sensibilizada, y evitar así una monitorización más agresiva.

Inicialmente, el genotipaje fetal solo se llevaba a cabo a partir del material obtenido mediante procedimientos invasivos, como la biopsia corial o la amniocentesis. Sin embargo, el descubrimiento de la presencia de ADN fetal en el plasma de las gestantes¹ abrió la posibilidad de utilizar el plasma materno como fuente alternativa de ADN fetal. Este ADN de origen fetal presente en el plasma materno procede de la placenta y representa un pequeño porcentaje del ADN total circulante en el plasma; de hecho, el componente mayoritario es de origen materno. No obstante, la concentración de ADN fetal aumenta progresivamente durante la gestación y puede llegar a un 10% del total de ADN en plasma materno.²

La determinación no invasiva de grupos sanguíneos fetales a partir del ADN fetal presente en el plasma materno se considera hoy en día una herramienta importante en la identificación y el subsiguiente manejo de gestaciones

con riesgo de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (EHFN).^{3,4}

Análisis del genotipo RHD fetal

La determinación no invasiva del genotipo *RHD* fetal en gestantes D negativo sensibilizadas es una de las primeras aplicaciones que se pusieron a punto en diagnóstico prenatal a partir del plasma materno. Desde entonces, se han desarrollado y validado diversos protocolos para la genotipificación *RHD* fetal no invasiva, que están actualmente en uso en muchos países.⁵⁻⁸ Las diferentes aproximaciones técnicas para determinar el genotipo *RHD* fetal a partir del plasma materno se comentan en el Capítulo del Sistema Rh.

La incorporación de esta determinación no invasiva en el seguimiento de las gestantes con isoinmunización anti-D ha supuesto un importante avance en cuanto al manejo y prevención de la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, identificando las gestaciones realmente de riesgo, en las que el feto se confirma como D positivo. Por el contrario, si el feto es D negativo se descarta el riesgo de enfermedad hemolítica, y por tanto, el seguimiento se limita al habitual en una gestación normal.

En el caso de gestantes D negativo no sensibilizadas, la genotipificación *RHD* fetal no invasiva permite restringir la administración de la gamma globulina anti-D antenatal a aquellas gestantes portadoras de un feto RhD positivo (aprox. 60%), para evitar una exposición innecesaria a quienes no la requieran. En este sentido, diversos estudios realizados a gran escala en diferentes centros europeos (Tabla 1) han demostrado la viabilidad de la aplicación de esta prueba a todas las gestantes D negativo, sin comprometer la sensibilidad ni la fiabilidad de los resultados.⁹⁻¹² Avalados por estos datos, los primeros países en introducir programas de *screening* no invasivo del gen *RHD* fetal en todas las gestantes D negativo a nivel nacional, son Holanda y Dinamarca,¹² cuya experiencia ayudará sin duda a la implementación definitiva de esta determinación en otros países

Determinación no invasiva del genotipo fetal para otros grupos sanguíneos

Aparte de la isoinmunización anti-D, existen otras especificidades de grupo sanguíneo (como el Rhc y el Kell, en

Tabla 1. Genotipificación *RHD* fetal en gestantes D negativo no sensibilizadas: estudios a gran escala

	Nº muestras analizadas	Semanas de gestación (Mediana)	Equivalente (mL) de plasma testado*	Nº réplicas	Exones <i>RHD</i>	Sensibilidad (%)
Van der Schoot <i>et al</i> (9)	1257	30	0,25	3	7	99,6
Finning <i>et al</i> (10)	1869	28	0,07	3	5,7	99,7
Müller <i>et al</i> (11)	1022	25	0,19	2	5,7	99,7
Clausen <i>et al</i> (12)	2312	25	0,08-0,17	3-4	5,7/7,10/5,10	99,9

*Calculado por réplica mediante la fórmula: (input ADN en PCR/volumen eluido x volumen de plasma)

población caucásica) que pueden ser causa de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, y para las que se han desarrollado estrategias de genotipificación fetal no invasiva a partir del plasma materno.¹³ Confirmar o descartar la incompatibilidad feto-materna en estos casos no es tan sencillo, ya que se trata de detectar una única diferencia nucleotídica en el contexto del ADN de plasma en el que está mayoritariamente representado el alelo homocigoto materno. A pesar de esta dificultad intrínseca, existen protocolos para la determinación de estos polimorfismos a partir del ADN fetal presente en el plasma materno, que se han desarrollado y validado en centros de referencia internacionales.^{14,15}

Estudio de la cigosidad *RHD*

Como ya se ha comentado en el Capítulo 5 del Sistema Rh, la determinación del fenotipo Rh completo en un individuo RhD positivo nos da una idea de la posibilidad de que sea homocigoto (D/D) o hemicigoto (D/d) para el gen *RHD*. Sin embargo, solo las técnicas moleculares permiten asignar con mayor precisión el estado *RHD* hemicigoto u homocigoto de un individuo, y así evitar las presunciones obtenidas mediante la determinación del genotipo más probable.

El estudio de la cigosidad en el ADN es de fundamental importancia para brindar un asesoramiento genético riguroso sobre el riesgo de enfermedad hemolítica fetoneonatal en futuros embarazos de madres sensibilizadas con anti-D. El análisis molecular de la cigosidad *RHD* paterna permite estable-

cer la probabilidad de que una madre D negativo sensibilizada tenga un hijo D negativo que no sea afectado por esta patología. En la población caucásica, la frecuencia del fenotipo D negativo es aproximadamente del 15% y la tasa de padres D positivo hemicigotos corresponde al 56%. En el 50% de estos casos, el haplotipo con la delección del gen *RHD* es transmitido al feto. Con esta incidencia, el 28% de los hijos de madres D negativo y padres D positivo serán D negativo. Además, la determinación de la cigosidad *RHD* paterna por métodos moleculares permite un mejor manejo de los embarazos en curso de pacientes aloinmunizadas. En estos casos, si el padre es homocigoto para el gen *RHD*, se deberán extremar los controles prenatales, ya que la probabilidad de que el feto sea D positivo es del 100%.

Referencias

1. Lo, Y. M. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.*, 1997; 350: 485-487.
2. Lo, Y. M. D., Tein, M. S., Lau, T. K., Haines, C. J. et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 1998; 62: 768-75.
3. Illanes, S., Soothill, P. Management of red cell alloimmunisation in pregnancy: the noninvasive monitoring of the disease. *Prenat Diagn.*, 2010; 30:668-673.
4. Daniels, G., Finning, K. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat. Diagn.*, 2009; 29: 101-107.
5. Finning, K. M. et al. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*, 2002; 42: 1079-1084.
6. Gautier, E., Benachi, A. et al. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a

- two-year experience. *Am J Obstet Gynecol*, 2005; 192: 666-9.
7. Daniels, G. et al. Fetal blood group from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sanguinis*, 2004; 87: 225-232.
 8. Brojer, E., Zupanska, B., Guz, K., et al. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion*, 2005; 45:1473-1480.
 9. Van der Schoot, C. E. et al. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol.*, 2006; 13: 53-56.
 10. Finning, K. et al. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ*, 2008; 336(7648):816-8.
 11. Müller, S. et al. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion*, 2008; 48(11):2292-301.
 12. Clausen, F. B., Christiansen, M., Steffensen, R., et al. Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in RhD negative pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion*, 2012; 52(4):752-758.
 13. Finning, K., Martin, P., Summers, J., Daniels, G. et al. Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c and E blood groups on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion*, 2007; 47: 2126-2133.
 14. Gutensohn, K., Muller, S. P., Thomann, K. et al. Diagnostic accuracy of noninvasive polymerase chain reaction testing for the determination of fetal rhesus C, c and E status in early pregnancy. *BJOG*, 2010; 117:722-729.
 15. Scheffer, P. G., van der Schoot, C. E., Page-Christiaens, G. C., de Haas, M. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. *BJOG*, 2011; 118:1340-1348.

Trombocitopenia fetal neonatal aloinmune

CARMEN CANALS SURÍS*
EDUARDO MUÑIZ-DÍAZ**

Fisiopatología y prevalencia

La trombocitopenia fetal/neonatal aloinmune (TFNA) se produce como consecuencia de la destrucción de las plaquetas fetales/neonatales inducida por aloanticuerpos anti-plaquetarios presentes en el suero materno y dirigidos contra algún antígeno plaquetario específico que el feto o recién nacido (RN) ha heredado del padre. Se trata de una complicación de la gestación potencialmente muy grave, que en las situaciones de trombocitopenia extrema ($<20 \times 10^9/L$ plaquetas) puede cursar con una hemorragia intracraneal (HIC) en el feto o RN (20%-30% de casos) y

* *Facultativa adjunta. Laboratorio de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. ccanals@bst.cat*

** *Jefe de la División de Inmunohematología. Banc de Sang i Teixits. Barcelona, España. emuniz@bst.cat*

ocasionarle la muerte o producirle secuelas neurológicas irreversibles. La TFNA se inscribe en el grupo de citopenias aloinmunes y, como tal, muestra muchas similitudes con la enfermedad hemolítica del RN (EHRN) por incompatibilidad Rh(D), si bien, y a diferencia de ésta, la sensibilización se produce en un 30% de casos en el curso de la primera gestación.¹

Los anticuerpos de especificidad anti-HPA-1a representan el anticuerpo más prevalente, y están presentes en más del 75% de casos de TFNA en los que la investigación de anticuerpos antiplaquetarios en el suero materno resulta positiva.² En estudios prospectivos de seguimiento de gestantes HPA-1b1b se ha observado una prevalencia

de TFNA por anticuerpos anti-HPA-1a de 1 caso cada 1.000 nacimientos.³⁻⁴ Aproximadamente un 10% de mujeres HPA-1b1b se inmunizan durante la gestación de un feto HPA-1a positivo. La aloinmunización materna está muy ligada a la expresión del antígeno HLA de clase II DRB3*0101. Las mujeres DRB3*0101 positivo producen una respuesta inmune eficiente frente al antígeno HPA-1a, mientras que las DRB3*0101 negativo raramente se sensibilizan.⁵⁻⁶ El riesgo de TFNA por anticuerpos anti-HPA-1a puede representarse esquemáticamente en un modelo piramidal, como el expuesto en la Figura 1. En la población caucásica, el fenotipo HPA-1a negativo se presenta en cerca de un 3% de los individuos.

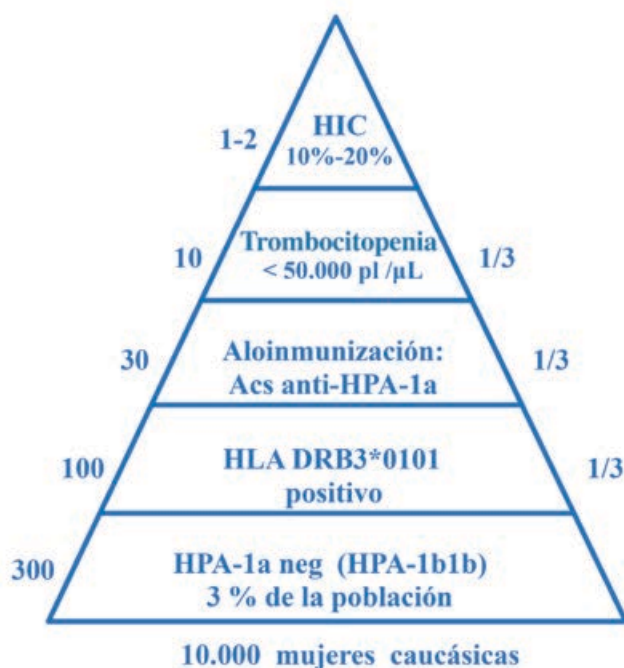


Figura 1. Prevalencia de TFNA por anticuerpos anti-HPA-1a. Los estratos representan el riesgo de aloinmunización por gestación de un feto HPA-1a positivo, el riesgo de trombocitopenia significativa (<50.000 plaquetas / μL) y de hemorragia intracraneal (HIC) en una muestra de 10.000 mujeres caucásicas. Modelo piramidal modificado, de Donald M. Arnold.⁷

Un tercio de estos son positivos para el antígeno HLA DRB3*0101, y presentan riesgo de aloinmunización frente al antígeno HPA-1a. Alrededor de un 30% de las mujeres HPA-1b1b DRB3*0101 positivo se sensibiliza durante la gestación de un feto HPA-1a positivo. De éstas, aproximadamente en un tercio de los casos el feto/RN presenta una trombocitopenia significativa (<50.000 plaquetas/ μ L), de los cuales entre el 10% y el 20% sufre una HIC.⁷

Tras los anticuerpos de especificidad anti-HPA-1a, los de especificidad anti-HPA-5b son los más frecuentemente identificados en un 10% a un 15% de pacientes con TFNA de la población caucásica. Los casos debidos a esta especificidad suelen presentar una trombocitopenia más moderada, con una menor repercusión clínica.⁸ El sistema HPA-5 es un polimorfismo localizado en la glicoproteína (GP) Ia con una densidad antigénica mucho menor a la GPIIb/IIIa. Esta característica puede justificar la menor gravedad de la trombocitopenia en estos casos. Los anticuerpos dirigidos frente a HPA-1b, HPA-5a o a los antígenos de los sistemas HPA-2, 3, 4 o 15 son mucho más infrecuentes en TFNA. Recientemente ha sido publicado el primer caso de TFNA diagnosticado en España por anticuerpos anti-HPA-2b, especificidad muy raramente identificada en esta patología.⁹ Los casos generados por anticuerpos frente a antígenos del sistema HPA-3, aunque infrecuentes, muestran unas características clínicas y una gravedad similares a los producidos por anti-HPA-1a.¹⁰ Anticuerpos anti-HPA-4b, que son detectados con relativa frecuencia en TFNA en Japón y, en gene-

ral, en la población asiática, han sido implicados en muy pocos casos en la población caucásica, uno de ellos en España.¹¹ En algunas series publicadas, los anticuerpos anti-HPA-15 se detectan con una frecuencia equiparable a los del sistema HPA-5.¹² Debido a que la GP CD109 está presente en células progenitoras hematopoyéticas CD34+, los anticuerpos anti-HPA-15 pueden inducir también anemia en algunos casos.¹³ Finalmente, en los últimos años se ha publicado sobre el tema de los anticuerpos implicados que van dirigidos contra antígenos de baja frecuencia, sólo presentes en las plaquetas del padre.¹⁴⁻¹⁵

Diagnóstico clínico

La presentación clínica más habitual de una TFNA es la de un neonato hijo de una madre que ha logrado una gestación y un parto sin complicaciones que, al nacer o pocas horas después, desarrolla un cuadro de diátesis hemorrágica. La manifestación clínica más frecuente es la púrpura cutánea en forma de petequias y/o equimosis, pero en ocasiones se acompaña de sangrado digestivo, pulmonar, hemorragia vítrea o retiniana, hematuria y, en los casos más graves, de HIC.¹⁶ En algunos casos se trata de un neonato totalmente asintomático, sin diátesis hemorrágica, en el que la trombocitopenia se descubre de forma casual en una analítica solicitada por otras causas. Generalmente son recién nacidos (RN) que no presentan otras alteraciones biológicas destacables, y en los que no se encuentran otras causas que justifiquen la trombocitopenia, como infecciones bacteria-

nas o víricas, coagulación intravascular diseminada u otras alteraciones congénitas asociadas a trombocitopenia.

La cifra de plaquetas es variable, y alcanzan en muchos casos cifras <20.000 plaquetas/ μL , y tiende a disminuir en las primeras 24 a 72 horas de vida. La duración de la trombocitopenia es variable, recuperándose normalmente en pocos días, aunque en algunos casos persiste varias semanas. Cuando se conoce el antecedente de un hijo afecto de TFNA, la trombocitopenia tiende a ser más grave que en el caso anterior. El neonato puede presentar también anemia cuando existe un sangrado significativo, o en aquellos eventos en que estén implicados aloanticuerpos contra antígenos del sistema HPA-15.

La complicación más grave de la TFNA, la HIC, suele aparecer entre un 10% y un 20% de pacientes con TFNA sintomática. En más de un 90% de neonatos con TFNA que sufren una HIC están implicados anticuerpos anti-HPA-1a. La HIC ocurre en más del 70% de los casos en el período prenatal (*intra útero*), y en más del 50% antes de la semana 28 de gestación.¹⁷ Puede tratarse de hemorragias intraparenquimatosas o intraventriculares, y causan la muerte en más del 30% de casos, o bien producen secuelas neurológicas muy graves en más del 50% de los mismos. En algunos pacientes, la forma de presentación de la TFNA es una hidrocefalia aislada, una historia de abortos recurrentes o una anemia fetal no explicada que en ocasiones causan un *hydrops fetalis*.¹⁸ Ante una de estas circunstancias, es aconsejable descartar la presencia de aloanticuerpos antiplaquetarios.

Diagnóstico diferencial

La trombocitopenia es una alteración hematológica relativamente frecuente, presente en un 1% de todos los neonatos, pero que llega a afectar hasta a un 25% de los pacientes que ingresan en una unidad de cuidados intensivos, y que se manifiesta por diátesis hemorrágica más o menos grave. Existen muchas causas de trombocitopenia neonatal, como infecciones congénitas o perinatales, hipoxia crónica fetal, asfixia perinatal, alteraciones de la megacariocitopoyesis o patología autoinmune materna, entre otras. Un 10% de los RN de gestantes con PTAI (púrpura trombocitopénica autoinmune) presentan una trombocitopenia grave, <50.000 plaquetas/ μL , debida al paso transplacentario de los autoanticuerpos antiplaquetarios IgG maternos.¹⁹

El momento de aparición, el grado de trombocitopenia y la evolución, orientan mucho sobre la posible etiología en cada caso.²⁰ En la Tabla 1 se muestran las distintas causas de trombocitopenia neonatal, clasificadas en función del momento de aparición. Una trombocitopenia que surge pasados tres días de vida, la mayoría de las veces es debida a una sepsis o a un cuadro de enterocolitis necrotizante. La causa más común de una trombocitopenia de aparición precoz es la hipoxia fetal crónica, producida por hipertensión o diabetes durante la gestación. En estos casos la trombocitopenia suele ser leve o moderada. En el diagnóstico diferencial se debe tener presente que en algunas ocasiones coexisten diversas circunstancias asociadas a trombocitopenia neonatal.

Tabla 1. Causas de trombocitopenia fetal/neonatal de acuerdo con el momento de aparición

Fetal	Neonatal Aparición precoz < 72 h	Neonatal Aparición tardía > 72 h
Aloinmune Infección congénita: Ej: CMV Toxoplasma Rubeola VIH Aneuploidía Ej: Trisomía 18 Trisomía 13 Trisomía 21 Autoinmune Ej: PTAI LES EH grave por anti-D Hereditaria	Hipoxia crónica fetal Ej: HTA gestacional Retraso crecimiento IU Diabetes Asfixia perinatal Infección perinatal Ej: E. Coli Streptococcus grupo B Haemophilus influenzae CID Aloinmune Autoinmune Infección congénita Trombosis Leucemia congénita Sd. Kasabach-Merritt Enfermedades metabólicas Ej: Acidemia metilmalónica Acidemia propiónica Hereditaria	Sepsis tardía Enterocolitis necrotizante Infección congénita Ej: CMV Toxoplasma Rubeola VIH Autoinmune Sd. Kasabach-Merritt Enfermedades metabólicas Ej: Acidemia metilmalónica Hereditaria Ej: TAR TAMCC

CMV: citomegalovirus; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; PTAI: púrpura trombocitopénica autoinmune; LES: lupus eritematoso sistémico; EH: enfermedad hemolítica; HTA: hipertensión arterial; IU: intrauterino; CID: coagulación intravascular diseminada; TAR: trombocitopenia con ausencia de radio; TAMCC: trombocitopenia amegacariocítica congénita.

Debe sospecharse una etiología aloinmune en aquellos neonatos que presenten una trombocitopenia no justificada, que ocurra desde el nacimiento o en las primeras horas de vida, en RN de una madre sana, después de una gestación y un parto sin complicaciones. Ante la sospecha de una TFNA, debe confirmarse el diagnóstico en el laboratorio, con el objetivo de demostrar la aloinmunización materna o, en su defecto, hacer evidente la existencia de alguna incompatibilidad antigénica materno-fetal. El diagnóstico inmunohematológico es fundamental en todos los casos, incluso en aquellos en que la

trombocitopenia sea moderada, facilitando la correcta asesoría a la pareja en cuanto a un tratamiento adecuado en futuras gestaciones.

Diagnóstico inmunohematológico

Ante la sospecha clínica de TFNA deben realizarse una serie de estudios dirigidos fundamentalmente a la detección e identificación de aloanticuerpos específicos anti-HPA en el suero materno. También es aconsejable descartar la presencia de autoanticuerpos antiplaquetarios, aunque no haya evidencia

del diagnóstico de PTAI en la madre. Para estudiar la existencia, o no, de alguna incompatibilidad HPA materno-fetal, es conveniente estudiar el genotipo plaquetario de la madre, del padre y del neonato. Esta información es esencial, ya que nos permite confirmar la especificidad de los aloanticuerpos identificados, a la par que ofrecer un asesoramiento correcto a la pareja de cara a futuras gestaciones. Así mismo, el estudio de TFNA debe completarse con una prueba cruzada, enfrentando el suero de la madre a las plaquetas del padre, con el propósito de excluir anticuerpos contra un antígeno de baja frecuencia (especificidad privada), especialmente cuando se han descartado los aloanticuerpos más comunes.

Existen múltiples metodologías para la investigación de anticuerpos antiplaquetarios en el suero materno. Algunas técnicas, como las basadas en la inmunofluorescencia, utilizan suspensiones de plaquetas intactas. Otros métodos de estudio, basados en la “captura de antígenos”, consisten en enfrentar el suero problema a glicoproteínas (GPs) plaquetarias aisladas, fijadas a un soporte sólido (pocillos de microplaca o microesferas de poliestireno). Al utilizar GPs aisladas, resultan especialmente útiles para la investigación de sueros que contengan mezclas de anticuerpos, o en los que están presentes anticuerpos frente a antígenos HLA de clase I. Así mismo, existen en la actualidad diferentes técnicas para la determinación del genotipo plaquetario. Las técnicas de investigación de anticuerpos antiplaquetarios y de tipificación de los antígenos HPA se han expuesto en el Capítulo 6 de la Sección I.

En el diagnóstico inmunohematológico de TFNA es muy importante combinar la utilización de diversas técnicas serológicas para asegurar la detección de los posibles aloanticuerpos presentes en el suero materno.²¹ Debido a las características de las distintas GPs de la membrana plaquetaria, algunas especificidades son detectadas con un tipo de técnicas, y no con otras. Por ejemplo, los anticuerpos frente a los antígenos del sistema HPA-15 se detectan únicamente mediante la técnica de MAIPA, enfrentando el suero problema a plaquetas frescas, ya que la densidad antigénica de la GP CD109 sobre la membrana plaquetaria es muy escasa y su expresión muy inestable.²² Los anticuerpos dirigidos frente a los antígenos HPA-3a y 3b pueden no detectarse debido a cambios conformacionales de la GPIIb, siendo aconsejable para estudiar estas especificidades utilizar técnicas basadas en el uso de suspensiones de plaquetas intactas, preferiblemente frescas.²³ En más de un 30% de ocasiones, el embarazo induce la aparición en el suero materno de anticuerpos anti-HLA dirigidos frente a antígenos paternos.²⁴ Así pues, dado que los antígenos HLA de clase I se expresan en la membrana plaquetaria, una correcta interpretación de los resultados exige el escrutinio de anticuerpos frente a estos antígenos. Así mismo, hay que recordar que las plaquetas expresan antígenos ABO, aunque en general esta expresión es débil. Una incompatibilidad ABO entre los padres, sobre todo si el título de isohemaglutininas en suero materno es elevado, puede interferir en el resultado de las pruebas cruzadas. En estos casos, es conveniente investigar si el

padre presenta una expresión anormalmente elevada de antígenos A o B en las plaquetas.²⁵

Aunque diferentes laboratorios utilizan distintas técnicas de estudio, en general la estrategia de estudio de TFNA incluye las siguientes pruebas (Tabla 2): una investigación de autoanticuerpos maternos, la determinación del grupo ABO y del genotipo plaquetario de la madre, el padre y el neonato, el escrutinio de anticuerpos anti-HLA

de clase I en el suero materno, y la investigación de aloanticuerpos antiplaquetarios en el suero materno mediante una combinación de técnicas, incluyendo pruebas cruzadas frente a las plaquetas del padre. Habitualmente, en un 20% a un 35% de los estudios realizados por sospecha de TFNA se detectan aloanticuerpos específicos.²⁶ En la Figura 2 presentamos los resultados obtenidos en una serie de 378 estudios realizados por sospecha de TFNA en

Tabla 2. Diagnóstico de laboratorio de la TFNA

Pruebas inmunohematológicas	
• Investigación de aloanticuerpos plaquetarios en el suero o plasma materno	– Inmunofluorescencia indirecta, Fase sólida (MAIPA)
• Investigación de autoanticuerpos plaquetarios en el suero o plasma materno	– Inmunofluorescencia directa, Fase sólida (MAIPA)
• Investigación de anticuerpos anti-HLA de clase I en el suero o plasma materno	
• Genotipo HPA de la madre, padre y neonato	
• Prueba cruzada entre el suero o plasma materno y las plaquetas del padre	
• Grupo ABO de la madre, padre y neonato	

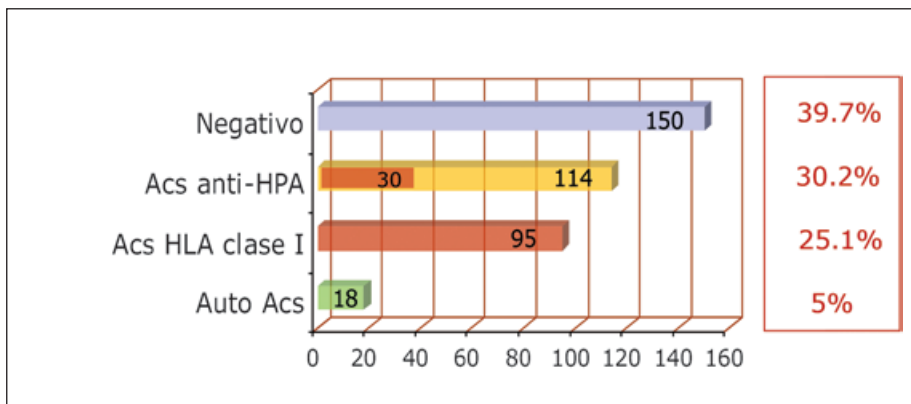


Figura 2. Resultados obtenidos en una serie de 378 estudios realizados por sospecha de TFNA en el Laboratorio de Inmunohematología del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona. En 30 casos se detectaron aloanticuerpos anti-HPA y anti-HLA de clase I en el suero materno. Globalmente, en un total de 125 mujeres se detectaron anticuerpos anti-HLA de clase I (33%)

el Laboratorio de Inmunohematología del Banco de Sangre y Tejidos (BST) de Barcelona. En el 5% de las mujeres encontramos autoanticuerpos IgG maternos, en el 30% de los casos identificamos aloanticuerpos antiplaquetarios específicos, en el 25% se detectaron en el suero materno únicamente anticuerpos anti-HLA de clase I, y en el 40% restante todos los resultados fueron negativos. En la Figura 3 se resumen las especificidades identificadas en esta serie. Aproximadamente, el 75% de los anticuerpos identificados eran anti-HPA-1a, y el 15%, anti-HPA-5b, mientras que otras especificidades se detectaron con mucha menor frecuencia. En dos estudios los anticuerpos implicados eran dirigidos contra un antígeno de baja frecuencia, sólo presente en las plaquetas del padre.

En nuestra experiencia, todas las series publicadas incluyen un porcen-

taje importante de casos en que no se detectan aloanticuerpos antiplaquetarios específicos en el suero materno. Muchos de estos casos pueden ser debidos a alguna de las múltiples causas no inmunes que pueden inducir una trombocitopenia neonatal (Tabla 1). Cuando la presentación clínica es muy sugestiva de TFNA, el hallazgo de una incompatibilidad antigénica materno-fetal refuerza la sospecha de la etiología aloinmune de la trombocitopenia. Aunque sigue siendo un tema controvertido, en aquellos casos en que se encuentra en el suero materno un título elevado de anticuerpos anti-HLA de clase I, no puede descartarse totalmente que la trombocitopenia sea debida a estos anticuerpos. De igual manera, en pacientes en quienes la expresión de antígenos ABO en plaquetas es excepcionalmente elevada, un título elevado de isohemaglutininas IgG maternas se

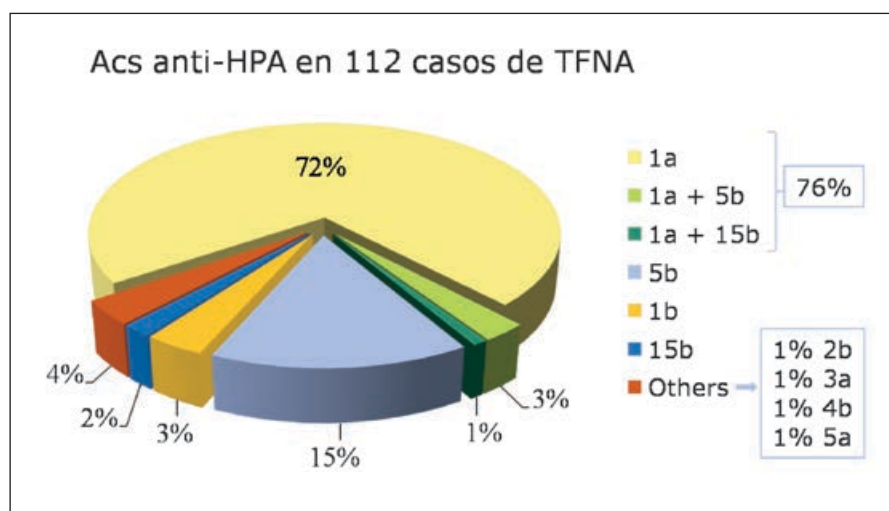


Figura 3. Anticuerpos anti-HPA identificados en una serie de 378 estudios de TFNA realizados en el Laboratorio de Inmunohematología del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona. En dos casos se encontraron a anticuerpos frente a antígenos de baja frecuencia.

asocia a trombocitopenia en un neonato ABO incompatible.²⁷ Es posible que, a pesar de los avances tecnológicos que se han producido en el diagnóstico de la TFNA, en algunos casos sigamos siendo incapaces de detectar los aloanticuerpos maternos responsables del cuadro clínico. Recientemente se han descrito casos de TFNA por anticuerpos anti-HPA-1a de baja afinidad indetectables con las técnicas clásicamente empleadas, pero puestos en evidencia con una nueva metodología denominada *Surface Plasmon Resonance*.²⁸

Cuando en un estudio inmunohematológico de TFNA no se identifiquen aloanticuerpos antiplaquetarios, especialmente si existe alguna incompatibilidad antigénica materno-fetal, es aconsejable realizar un nuevo estudio serológico pasadas cuatro u ocho semanas para intentar confirmar la posible aloinmunización materna. Unas semanas después del parto se produce un aumento significativo del título de aloanticuerpos en el suero de algunas pacientes,²⁹ de forma que es probable descubrir en esta segunda muestra aloanticuerpos indetectables en el primer estudio.

Tratamiento

Si en un neonato se sospecha una TFNA, el tratamiento debe iniciarse sin esperar el resultado del estudio inmunohematológico, el cual consiste fundamentalmente en la transfusión de plaquetas.³⁰ Adicionalmente, como tratamiento complementario, se administran inmunoglobulinas endovenosas (Ig ev) a altas dosis (1g/kg/día durante dos días o 0,4g/kg/día durante cinco días).

Potencialmente, las Ig ev aumentan la supervivencia de las plaquetas y disminuyen la duración del período de trombocitopenia.³¹ Respecto a la transfusión de plaquetas, conviene considerar dos aspectos; en primer lugar, la indicación de la transfusión, y en segundo lugar, el tipo de componente sanguíneo a transfundir.

Se ha evidenciado una gran variabilidad en el uso de plaquetas en neonatos con trombocitopenia en distintos países y en distintas instituciones.³² En neonatología, la indicación de la transfusión debe tener en cuenta, no solo el grado de trombocitopenia y el tipo de diátesis hemorrágica, sino también otros aspectos como el grado de prematuridad, el peso, los días de vida, la existencia de otros factores de riesgo (tipo de patología, coagulopatía, etc.), así como la posible etiología de la trombocitopenia.²⁰ En neonatos a término, totalmente asintomáticos y sin diátesis hemorrágica, el dintel de plaquetas para indicar una transfusión profiláctica es controvertido. La mayoría de guías aconsejan transfundir cuando la cifra de plaquetas sea $<30.000/\mu\text{L}$. Debe realizarse siempre en los primeros días de vida una exploración radiológica (ecografía o tomografía) para descartar la presencia de una HIC (Figura 4). En aquellos casos en que se haya producido una HIC, u otro tipo de hemorragia mayor, es recomendable mantener la cifra de plaquetas por encima de $50.000/\mu\text{L}$. Los neonatos con TFNA presentan un riesgo de sangrado mayor que los neonatos con trombocitopenia debida a otras causas, ya que la unión de los aloanticuerpos a las GPs de la membrana plaquetaria inducen, no solo la des-

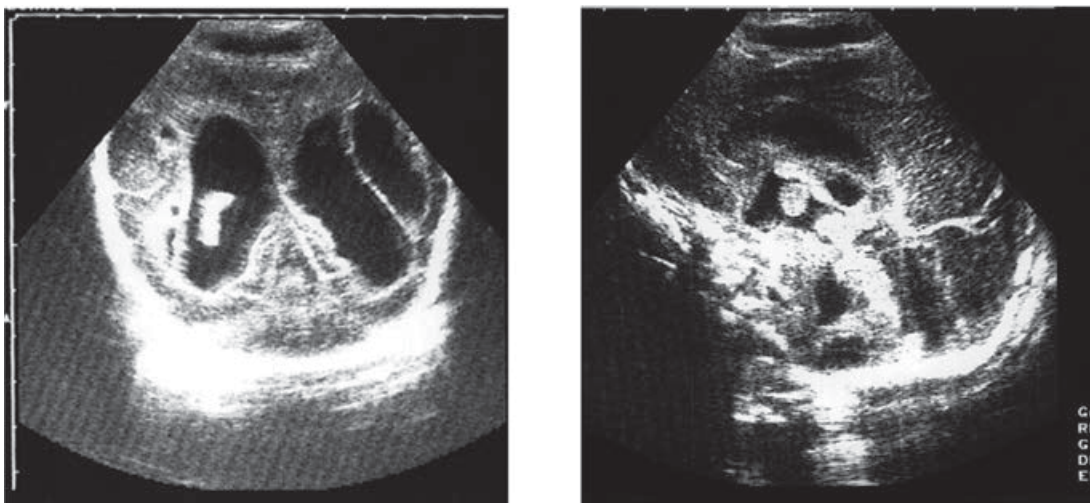


Figura 4. Ecografía cerebral en un neonato afecto de TFNA. A. Corte Coronal. Se observa un coágulo en el ventrículo lateral izquierdo. B. Corte sagital medio. El mismo coágulo en ventrículo superior.

trucción de las plaquetas, sino también su disfunción (trombopatía).³³

Respecto a qué tipo de componente debe transfundirse, siempre que sea posible se transfunden plaquetas de donante único con fenotipo HPA compatible con la madre. Si se ignora la especificidad involucrada y se dispone de ellas, las plaquetas HPA-1a y HPA-5b negativo son compatibles con más del 90% de los casos. Los centros de transfusión y bancos de sangre conectados con los servicios hospitalarios que atienden neonatos, deben mantener un registro de donantes genotipados para los sistemas HPA, para proveer plaquetas compatibles en el menor tiempo posible, cuando se requieran.³⁴ Hasta que no se disponga de plaquetas HPA compatibles, pueden transfundirse plaquetas de mezcla, como opción alternativa e idealmente transitoria. La experiencia ha evidenciado que estas plaquetas consiguen un rendimiento suficiente en la mayoría de casos.³⁵ La transfusión de plaquetas maternas representa una opción frente a la falta de disponibili-

dad de plaquetas compatibles, pero en la práctica suele ser compleja. Si llegan a emplearse, las plaquetas maternas deben ser lavadas y resuspendidas en una nueva solución, para eliminar el aloanticuerpo materno.

Aunque en la mayoría de casos de TFNA la cifra de plaquetas en el neonato tiende a normalizarse en unos pocos días, conviene monitorizar la cifra hasta observar una recuperación sostenida. En casos excepcionales la trombocitopenia persiste varias semanas, en los cuales la administración de Ig ev supone una buena alternativa terapéutica.

Profilaxis antenatal

En ausencia de programas de cribado, la profilaxis antenatal se ofrece a gestantes aloinmunizadas y con antecedentes de TFNA en una gestación anterior. Estas pacientes tienen un riesgo muy elevado de recidiva, y la gravedad tiende a ser mayor en sucesivas gestaciones,³⁶ por lo que es necesario que realicen profilaxis, muy especialmente si se produjo una

HIC en el feto/RN. Cuando la pareja sea heterocigota para el sistema HPA implicado, se debe confirmar la existencia de la incompatibilidad entre la madre y el feto actual. El genotipo plaquetario del feto puede estudiarse en muestras obtenidas mediante amniocentesis o biopsia de corion. En gestantes HPA-1b1b, actualmente es posible estudiar el genotipo HPA-1a fetal en plasma materno, mediante ensayos de PCR a tiempo real.³⁷ Esta nueva estrategia diagnóstica permite conocer si el feto es portador o no del antígeno HPA-1a. Se utiliza una muestra de sangre periférica de la gestante, a partir de la semana 16 de gestación, para evitar las técnicas invasivas. Si se confirma la existencia de incompatibilidad en la gestación actual, es esencial administrar algún tratamiento dirigido a disminuir el riesgo de trombocitopenia grave en el feto.

El tratamiento óptimo para estas pacientes hasta el momento es motivo de controversia. Básicamente se han utilizado dos estrategias: una opción terapéutica consiste en realizar transfusiones intrauterinas de plaquetas compatibles, mientras que la segunda se basa en la administración de dosis altas de Ig e.v. y/o corticoides a la gestante. La realización de cordocentesis seriada, aunque se había utilizado con éxito en muchos casos, es una terapia invasiva que supone un riesgo de interrupción de embarazo superior al 5% de las gestantes.³⁸ La tendencia actual es evitar, de entrada, la cordocentesis y dar a la gestante un tratamiento antenatal, según el grado de riesgo en cada caso.³⁹⁻⁴⁰ En general, es aconsejable programar el parto por cesárea, planificándolo entre las semanas 34 y 37 dependiendo de cada

caso, y teniendo preparadas plaquetas HPA compatibles.

El momento en que debe iniciarse el tratamiento antenatal, las dosis de Ig ev recomendadas y la necesidad o no de dar adicionalmente corticoides, varían en función del riesgo estimado en cada gestante. La valoración del grado de riesgo tiene en cuenta una serie de factores, siendo el más importante la gravedad de la trombocitopenia neonatal en el hijo anterior y si desarrolló una HIC. Si ésta se produjo *in útero* en la gestación anterior, en la evaluación del riesgo es importante tener en cuenta en qué semana de gestación tuvo lugar. La especificidad implicada también ayuda a valorar el grado de riesgo del caso. En general, una aloinmunización frente a los antígenos HPA-1a o HPA-3a se asocia a un mayor riesgo de trombocitopenia grave y de complicaciones hemorrágicas. El título del anticuerpo es otro dato a tener en consideración. En las gestantes portadoras de anticuerpos anti-HPA-1a, se aconseja realizar un seguimiento periódico del título. A pesar de que no todos los estudios han encontrado una buena correlación entre el título de anticuerpos anti-HPA-1a y el grado de trombocitopenia en el feto/neonato, diferentes autores han evidenciado que títulos elevados durante la gestación se asocian a una mayor gravedad de la trombocitopenia.⁴¹ Sin embargo, en la práctica, la historia obstétrica previa continúa siendo el parámetro predictivo más importante.

Cribado sistemático HPA-1a

A diferencia de lo que ocurre en la EHRN por incompatibilidad Rh(D), la

TFNA se produce hasta en un 30% de casos en la primera gestación, en los cuales la trombocitopenia fetal pasa inadvertida en los controles obstétricos, y no se diagnostica hasta que se produzca una HIC *in útero*, o hasta el nacimiento del neonato afectado. Estos casos pueden ser diagnosticados a tiempo si se realiza un cribado a todas las gestantes, al implantar la tipificación sistemática del genotipo HPA-1, y monitorizar la aparición de aloanticuerpos anti-HPA-1a en las gestantes HPA-1a negativo. En los últimos años, algunos países han realizado estudios prospectivos con el objetivo de evaluar realmente la incidencia de TFNA y el riesgo de HIC por esta circunstancia.⁴² A este tipo de programas entraron más de 170.000 gestantes. Un 30% de las mujeres HPA-1a negativo que desarrollaron anticuerpos anti-HPA-1a, tuvieron un hijo con trombocitopenia grave, y de estos, cerca de un 10% sufrió una HIC. Sin embargo, el riesgo de HIC por TFNA en la población general es globalmente muy bajo, ya que menos del 3% de la población es HPA-1a negativo, y únicamente un 10% de las gestantes HPA-1a negativo se aloinmuniza (Figura 1).

El establecimiento de un programa de cribado comportaría unos costes elevados, que deben balancearse con los potenciales beneficios. Es difícil cuantificar realmente los beneficios que alcanzaría su implantación, puesto que no existe un consenso en cuanto al tratamiento prenatal de elección en mujeres aloinmunizadas sin historia previa de TFNA grave. En este sentido, se precisan más estudios encaminados a definir mejor los posibles factores predictivos de gravedad en estos casos. Por

otra parte, el programa permitiría identificar las pacientes HPA-1a negativo con riesgo de sensibilizarse, pero aún no está disponible una “vacuna” anti-HPA-1a para prevenir la aloinmunización, equiparable a la gammaglobulina anti-D. La viabilidad de este tipo de estrategia ha sido demostrada en modelos murinos.⁴³ Actualmente se está desarrollando el proyecto PROFNAIT, avalado por la Comisión Europea, para la obtención de una inmunoglobulina anti-HPA 1a.¹ La eficacia de la administración posparto de esta inmunoglobulina en la prevención de la aloinmunización será posteriormente evaluada en un ensayo clínico randomizado.

Referencias

1. Kjeldsen-Kragh, J., Ni H and Skogen, B. Towards a prophylactic treatment of HPA-related foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Curr Opin Hematol.*, 2012; 19:469-474.
2. Davoren, A., Curtis, B. R., Aster, R. H., McFarland, J. G. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2004; 44:1220-5.
3. Williamson, L. M., Hackett, G., Rennie, J., Palmer, C., Maciver, C., Hadfield, R. et al. The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PIA1, Zwa) as determined by antenatal screening. *Blood* 1998; 92:2280-2287.
4. Kjeldsen-Kragh, J., Killie, M. K., Tomter, G., Golebiowska, E., Randen, I., Hauge, R., Aune, B., Øian, P., Dahl, L. B., Pirhonen, J., Lindeman, R., Husby, H., Haugen, G., Grønn, M., Skogen, B., Husebekk, A. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 2007; 110:833-9.
5. L'Abbe, D., Tremblay, L., Filion, M. et al. Alloimmunization to platelet antigen HPA-1a (PIA1) is strongly associated with both

- HLA-DRB3*0101 and HLA-DQB1*0201. *Hum Immunol.*, 1992; 34:107-114.
6. Anani Sarab, G., Moss, M., Barker, R. N., Urbaniak, S. J. Naturally processed peptides spanning the HPA-1a polymorphism are efficiently generated and displayed from platelet glycoprotein by HLA-DRB3*0101-positive antigen-presenting cells. *Blood*, 2009; 114:1954-1957.
 7. Arnold, D. M., Smith, J. W. and Kelton, J. G. Diagnosis and Management of Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. *Transfusion Medicine Reviews*, 2008; 22:255-267.
 8. Ohto, H., Yamaguchi, T., Takeuchi, C., Tohyama, Y., Sato, A., Morita, S. Anti-HPA-5b-induced neonatal alloimmune thrombocytopenia: antibody titre as a predictor. Collaborative Study Group. *Br J Haematol.*, 2000, Jul; 110(1):223-7.
 9. Esquirol, A., Canals, C., Ibáñez, M., Gracia, M., Farssac, E., Vinyets, I., Tarragó, M., Nogués, N., Muñoz-Díaz, E. Foetal-neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA-2b antibodies present in the serum of a mother initially mistyped as HPA-1a negative. *Blood Transfus.*, 2012; 10:390-392.
 10. Glade-Bender, J., McFarland, J., Kaplan, C., Porcelijn, L., Bussel, J. Anti-HPA3a induces severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J. Pediatr.*, 2001; 138:862-867.
 11. Puig, N., Muñoz-Díaz, E., Monteagudo, E., Ribera, A., Montoro, J. A. Second case of neonatal alloimmune thrombocytopenia by anti-HPA-4b (anti-Yuk^a) in a Caucasian family. *Transf Med.*, 1993; 3:164-165.
 12. Berry, J. E., Murphy, C. M., Smith, G. A., Ranasinghe, E., Finberg, R., Walton, J., Brown, J., Navarrete, C., Metcalfe, P., Ouwehand, W. H. Detection of Gov system antibodies by MAIPA reveals an immunogenicity similar to HPA-5 alloantigens. *Br J Haematol.*, 2000; 110: 735-742.
 13. Novelli, S., Canals, C., Nogués, N., Julià, M. R., Gracia, M., Vinyets, I., Muñoz-Díaz, E. Severe neonatal alloimmune thrombocytopenia with anaemia. *Transfus Med.*, 2010; 20:125-6.
 14. Kaplan, C., Porcelijn, L., Vanlieferinghen, P., Julien, E., Bianchi, F., Martageix, C., Bertrand, G., Jallu, V. Anti-HPA-9w (Maxa) fetomaternal alloimmunization, a clinically severe neonatal alloimmune thrombocytopenia: difficulties in diagnosis and therapy and report on eight families. *Transfusion*, 2005; 45:1799-1803.
 15. Bertrand, G., Bianchi, F., Alexandre, M., Quesne, J., Chenet, C., Martageix, C., Jallu, V., Kaplan, C. HPA-13bw neonatal alloimmune thrombocytopenia and low frequency alloantigens: case report and review of the literature. *Transfusion*, 2007; 47:1510-3.
 16. Bussel, J. & Primiani, A. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: progress and ongoing debates. *Blood Reviews*, 2008; 22:33-52.
 17. Tiller, H., Kamphuis, M. M., Flodmark, O., Papadogiannakis, N., David, A. L., Sainio, S., Koskinen, S., Javela, K., Wikman, A. T., Kekomaki, R., Kanhai, H. H., Oepkes, D., Husebekk, A., Westgren, M. Fetal intracranial haemorrhages caused by fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: an observational cohort study of 43 cases from an international multicentre registry. *BMJ Open*, 2013; 3:1-8.
 18. Stanworth, S. J., Hackett, G. A., Williamsom, L. M. Fetomaternal alloimmune thrombocytopenia presenting antenatally as hydrops fetalis. *Prenatal Diagnos.*, 2001; 21:423-424.
 19. Webert, K. E., Mittal, R., Sigouin, C., Heddle, N. M., Kelton, J. G. A retrospective 11-year analysis of obstetric patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2003; 102:4306-4311
 20. Roberts, I., Stanworth, S. & Murray, N. Thrombocytopenia in the Neonate. *Blood Reviews*, 2008; 22:173-186.
 21. Curtis, B. R. and Mc Farland, J. G. Detection and identification of platelet antibodies and antigens in the clinical laboratory. *Immunohematology*, 2009; 25:125-135.
 22. Ertel, K., Al-Tawil, M., Santoso, S., Kroll, H. Relevance of the HPA-15 (Gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*, 2005; 45:366-373.
 23. Socher, I., Zwingel, C., Santoso, S., Kroll, H. Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: consequences for the diagnosis of alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*, 2008; 48:463-72.

24. Brown, C. J. & Navarrete, C. V. Clinical relevance of the HLA system in blood transfusion. *Vox Sanguinis*, 2011; 101:93-105.
25. Curtis, B. R., Edwards, J. T., Hessner, M. J., Klein, J. P., Aster, R. H. Blood group A and B antigens are strongly expressed on platelets of some individuals. *Blood*, 2000; 96:1574-81.
26. Peterson, J. A., McFarland, J. G., Curtis, B. R., Aster, R. H. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. *Br J Haematol.*, 2013; 161:3-14.
27. Curtis, B. R., Fick, A., Lochowicz, A. J., McFarland, J. G., Ball, R. H., Peterson, J., Aster, R. H. Neonatal alloimmune thrombocytopenia associated with maternal-fetal Incompatibility for blood group B. *Transfusion*, 2008; 48:358-64.
28. Peterson, J. A., Kanack, A., Nayak, D., Bougie, D. W., McFarland, J. G., Curtis, B. R., Aster, R. H. Prevalence and clinical significance of low-avidity HPA-1a antibodies in women exposed to HPA-1a during pregnancy. *Transfusion*, 2013; 53:1309-18.
29. Killie, M. K., Husebekk, A., Kjeldsen-Kragh, J., Skogen, B. A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. *Haematologica*, 2008; 93:870-7.
30. Chakravorty, S., Roberts, I. How I manage neonatal thrombocytopenia. *Br J Haematol.*, 2012; 156:155-62.
31. Negi, V., Elluru, S., Siberil, S. et al. Intravenous Immunoglobulin: An Update on the Clinical Use and Mechanisms of Action. *Journal of Clinical Immunology*, 2007; 27:233-245.
32. Stanworth, S. J. Thrombocytopenia, bleeding, and use of platelet transfusions in sick neonates. *Hematology Am Soc Hematol Educ. Program.*, 2012; 2012:512-6.
33. Goldman, M., Trudel, E., Richard, L., Khalife, S. and Spurrill, G. M. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA-2b (anti-Koa). *Immunohematology*, 2003; 19 (2), 43-46.
34. Allen, D. L., Samol, J., Benjamin, S., Verjee, S., Tusold, A., Murphy, M. F. Survey of the use and clinical effectiveness of HPA-1a/5b-negative platelet concentrates in proven or suspected platelet alloimmunization. *Transfus Med.*, 2004; 14:409-17.
35. Kiefel, V., Bassler, D., Kroll, H., Paes, B., Giers, G., Ditomasso, J., Alber, H., Berns, M., Wiebe, B., Quenzel, E. M., Hoch, J., Greinacher, A. Antigen-positive platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). *Blood*, 2006; 107:3761-3.
36. Bussel, J. B., Zabusky, M. E., Berkowitz, R. L., McFarland, J. G. Fetal alloimmune thrombocytopenia. *N Engl J Med.*, 1997; 337:22-6.
37. Scheffer, P., Ait Soussan, A., Verhagen, O., Page-Christiaens, G., Oepkes, D., de Haas, M., van der Schoot, C. Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1 a. *BJOG*, 2011; 118:1392-1395.
38. Ghevaert, C., Campbell, K., Walton, J. et al. Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2007; 47:901-910.
39. Vinograd, C. and Bussel, J. B. Antenatal treatment of fetal alloimmune thrombocytopenia: a current perspective. *Haematologica*, 2010; 95:1807-1811.
40. Kamphuis, M. M., Oepkes, D. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: prenatal interventions. *Prenat Diagn.*, 2011; 31:712-9.
41. Sainio, S., Javela, K., Tuimala, J., Koskinen, S. Usefulness of maternal anti-HPA-1a antibody quantitation in predicting severity of foetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfus Med.*, 2013; 23:114-120.
42. Kamphuis, M. M., Paridaans, N., Porcelijn, L., De Haas, M., Van Der Schoot, C. E., Brand, A., Bonsel, G. J., Oepkes, D. Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: systematic review. *BJOG*, 2010; 117:1335-43.
43. Tiller, H., Killie, M. K., Chen, P., Eksteen, M., Husebekk, A., Skogen, B., Kjeldsen-Kragh, J., Ni, H. Toward a prophylaxis against fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: induction of antibody-mediated immune suppression and prevention of severe clinical complications in a murine model. *Transfusion*, 2012; 52:1446-57.

Neutropenias neonatales aloimmunes (NNA)

NIEVES PUIG ALCARAZ*

FRANCISCO MARTÍNEZ REIG**

VICENTE LLANES RIBES***

DOLORES PLANELLES SILVESTRE****

MANUEL ÁLVAREZ DO BARRIO*****

JOSÉ MONTORO ALBEROLA*****

ROBERTO ROIG OLTRA*****

* *Especialista en Hematología-Hemoterapia. Doctora en Medicina por la Universidad de Valencia. Jefe de Sección del Servicio de Tipificación Celular Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, Valencia, España. puig_nie@gva.es*

** *Diplomado en Enfermería. Servicio de Tipificación Celular. Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. martinez_frarei@gva.es*

*** *Diplomado en Enfermería. Servicio de Tipificación Celular Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. llanes_vicrib@gva.es*

**** *Doctora en Biología por la Universidad de Valencia. Servicio de Tipificación Celular Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. planelles_dol@gva.es*

***** *Especialista en Análisis Clínicos. Servicio de Tipificación Celular Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. alvarez_man@gva.es*

***** *Especialista en Hematología-Hemoterapia; Jefe del Servicio Tipificación Celular Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. montoro_jos@gva.es*

***** *Especialista en Hematología-Hemoterapia. Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia. Director del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, España. roig_rob@gva.es*

Introducción

En la superficie de los neutrófilos hay unos receptores antigénicos denominados específicos del neutrófilo (aunque el término de específico no es correcto, ya que algunos de ellos están presentes también en otras células). Estos antígenos pueden ser diana de procesos de autoinmunización y además, debido a su polimorfismo, tienen un significado clínico como inductores de la formación de alo o isoanticuerpos que se producen por embarazos, trasplantes o por

transfusiones. Dichos anticuerpos dan lugar a diferentes patologías como las reacciones transfusionales pulmonares o febriles, las neutropenias postrasplante, las neutropenias autoinmunes, medicamentosas o las neutropenias neonatales inmunes pasivas de las que vamos a tratar en este capítulo.

En la actual nomenclatura, los sistemas antigénicos específicos de neutrófilos se denominan HNA (*Human Neutrophil Alloantigens*), y van seguidos de un número que indica la glicoproteína de localización. Los diferentes polimorfismos de la misma glicoproteína se designan alfabéticamente en el orden en que se publicaron. En cuanto a los genes que codifican dichos polimorfismos, se nombran de acuerdo con las guías del *Workshop of Human Gene Mapping*. Las variantes alélicas de los genes se designan con números arábigos separados del gen por un asterisco.¹ Los sistemas específicos de los neutrófilos, implicados en las neutropenias neonatales aloinmunes (NNA), son:

Sistema HNA-1 (NA)

Comprende los antígenos localizados en la glicoproteína de la membrana granulocitaria FcγRIIIb, que es la más inmunogénica del neutrófilo. Es un receptor de baja afinidad para la IgG que es exclusivo de los neutrófilos y reconocido por los anticuerpos monoclonales CD16. El gen que codifica este receptor está en el brazo largo del cromosoma 1 y se denomina FCGR3B. Este receptor se une a los neutrófilos por medio de moléculas glicosil-fosfatidil-inositol (GPI anchor), y en él hay descritos cuatro polimorfismos: HNA-1a (NA1)², HNA-1b (NA2)³, HNA-1c (SH)⁴, y HNA-1d.⁵

Estos alelos están implicados frecuentemente en los casos de neutropenias neonatales aloinmunes; en las cuales también se ha descrito una mayor afinidad del autoanticuerpo por alguno de estos alelos.

Ciertos individuos no expresan FcγRIIIb en los neutrófilos debido a una delección del gen FCGR3B. La frecuencia de esta deficiencia es del 0,1% en Francia, 0,8% en España y del 2% en negros africanos.⁶ Estas personas presentan un fenotipo HNA-1 nulo, y pueden inmunizarse por embarazos, producir isoanticuerpos y causar neutropenia en el neonato.

Sistema HNA-2

El HNA-2⁷ tiene solo un alelo, el HNA-2a, y es el segundo de los sistemas de los neutrófilos en importancia clínica. El HNA-2a está expresado en el 97% de la población caucásica, se encuentra en la membrana del neutrófilo, en la de los gránulos específicos y en la de las pequeñas microvesículas de los neutrófilos. Al igual que el receptor anterior, se une a la membrana por medio del glicosil-fosfatidil-inositol (GPI anchor). El HNA-2a es reconocido por los anticuerpos monoclonales designados como CD177. La expresión del HNA-2a (NB1) es mayor en mujeres que en hombres, aumenta con el embarazo y cuando se dan factores de crecimiento G-CSF.^{8,9}

Los isoanticuerpos anti HNA-2a han sido relacionados con las neutropenias auto y aloinmunes, con el fallo del injerto en los trasplantes de progenitores hematopoyéticos y con las reacciones transfusionales.^{10,11}

Sistema HNA-3

El HNA-3a (5b) y HNA-3b se expresa en neutrófilos, linfocitos y plaquetas. Los aloanticuerpos frente al antígeno HNA-3a son aglutininas relacionadas con un único caso de neutropenia neonatal,¹² con reacciones transfusionales de tipo febril y con graves reacciones pulmonares (TRALI) a veces mortales. El alelo HNA-3b también se ha relacionado recientemente con neutropenias neonatales en la población brasileña.¹³

Sistema HNA-4 (Mart) y sistema HNA-5 (Ond)

El antígeno HNA-4a (Mart) es de alta frecuencia, también expresado en otros leucocitos como linfocitos y monocitos, pero no en plaquetas ni células rojas. Se han descrito como dianas de autoanticuerpos,¹⁴ pero además son capaces de provocar aloinmunización como demuestra el único caso descrito de neutropenia neonatal por anti HNA-4a.¹⁵

No se conocía la implicación clínica del HNA-5a (Ond) hasta el año 2011, cuando se describió el primer caso de neutropenia neonatal por anti HNA-5a.¹⁶

La neutropenia neonatal aloinmune e isoimmune NNA

La NNA se produce por inmunización materna frente a antígenos de neutrófilos presentes en el feto y ausentes en la madre. En el suero materno se encuentran anticuerpos de tipo IgG que atraviesan la placenta y se fijan en los neutrófilos del feto provocando su destrucción. El recién nacido tiene generalmente un número normal o incluso

aumentado de leucocitos totales, pero en cambio presenta una disminución muy marcada de los neutrófilos.

Es una patología muy poco frecuente. Su incidencia real no se conoce debido a que probablemente la mayoría pasa desapercibida, ya que cursa sin complicaciones; sirva de ejemplo: en nuestro laboratorio de inmunología leucoplaquetar, que cubre un área de población de aproximadamente 5×10^6 habitantes, a lo largo de más de veinte años nos han solicitado únicamente setenta y nueve estudios por sospecha de NNA, de los cuales sólo en unos pocos se ha confirmado el diagnóstico. Si tenemos en cuenta el año 2012, en el que se registraron 47.539 nacimientos en nuestra comunidad, conociendo que nos solicitaron durante ese año siete estudios para descartar NNA en esta población y que sólo en uno de ellos encontramos anticuerpos específicos, podríamos suponer que aproximadamente en 1 de cada 6.791 nacimientos se sospecharía esta patología y que sólo en 1 de cada 47.539 se confirmaría.

La neutropenia neonatal inmune pasiva se produce generalmente en niños aparentemente sanos cuya única anomalía es la neutropenia, aunque no debe descartarse su presencia junto a otras patologías. La neutropenia se puede detectar precozmente en el momento del nacimiento. El diagnóstico diferencial debe hacerse principalmente con las neutropenias congénitas crónicas y con las autoinmunes. La NNA puede ocurrir en la primera gestación, aunque es más frecuente diagnosticarla a partir de la segunda o tercera. El grado de afectación es variable, desde neutropenias leves que pasan desapercibidas

a graves en las que prácticamente no hay neutrófilos. En nuestra experiencia de diecisiete NNA producidas por anticuerpos específicos, la neutropenia fue grave, con menos de 100 neutrófilos/ μL en el 23,5% de los niños, moderada, entre 100 y 500 neutrófilos/ μL en el 64,8%, y leve con más de 500 neutrófilos/ μL en el 11,7%. Similares resultados obtuvimos en trece neutropenias neonatales atribuidas a la presencia de autoanticuerpos maternos, con un 30% graves, un 50% moderadas y un 20% leves.

Diagnóstico inmunohematológico

El diagnóstico serológico de las neutropenias neonatales inmunes se realiza buscando los anticuerpos en el suero de la madre. Es importante que el estudio se haga en los primeros días después del parto, pues los anticuerpos pueden disminuir hasta hacerse inapreciables con la cesación del estímulo antigé-

co. El método más directo es la prueba cruzada con los neutrófilos del padre, que se hace por inmunofluorescencia convencional (GIF) o por citometría de flujo (Flow-GIF). En la Figura 1 se ve un ejemplo del histograma de una prueba cruzada granulocitaria. El mayor inconveniente de estas técnicas es la interferencia producida por la presencia muy frecuente en gestantes de anticuerpos anti-HLA, que enmascaran el resultado de las pruebas cruzadas dando falsos positivos. El estudio del suero tras absorber el anti-HLA con un pool de plaquetas o la técnica de MAIGA (*Monoclonal antibody immobilization granulocyte alloantigens*), que evita la interferencia por inmunocomplejos y por los anticuerpos anti HLA, ayudan a establecer el diagnóstico.

También se puede enfrentar el suero de la madre con un panel de neutrófilos de genotipo conocido; el mayor problema es la necesidad de utilizar células frescas con los inconvenientes que esto supone, pero en la actualidad se consi-

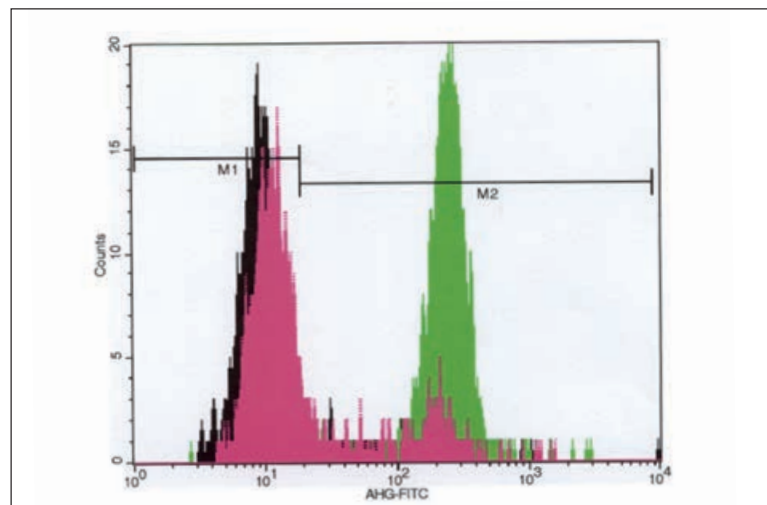


Figura 1. Prueba cruzada positiva por citometría. Histograma comparativo de la fluorescencia obtenida con un suero negativo (rojo) y el suero de una madre con anticuerpos HNA (verde) frente a granulocitos del padre.

güen líneas celulares estables que expresan la mayoría de los antígenos y se utilizan para identificar los anticuerpos anti HNA por citometría de flujo.¹⁷⁻¹⁸

Otra posibilidad es la técnica descrita por los japoneses, *Micro-Mixed Passive Hemagglutination Method* (EG-MPHA), la cual utiliza antígenos granulocitarios que recubren los pocillos en U de placas de Terasaki. La ventaja de este método es la conservación de las placas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.¹⁹

Recientemente se ha incorporado la tecnología Luminex, ampliamente utilizada para los anticuerpos anti-HLA en la detección de anticuerpos anti-HNA, con resultados al parecer muy prometedores.²⁰ La técnica de detección de anticuerpos por fase sólida con el uso de Luminex, ha demostrado ser más sensible y específica para los anticuerpos anti HLA que la clásica de linfocitotoxicidad. Utiliza unas microesferas de latex marcadas con dos colorantes; al usar distintas relaciones entre los dos colorantes se diferencian hasta cien tipos de esferas, únicas y distinguibles por medio de una luz láser. En cada una de estas microesferas se acopla una o varias moléculas. Así los anticuerpos se unen a una molécula específica que está en una determinada microesfera. Luego se usa un detector de anticuerpo con ficoeritrina. Las esferas y el detector de anticuerpos son leídas con el citómetro de Luminex (instrumento con dos lectores láser, uno identifica el código de color de las esferas y el otro el del detector del anticuerpo). Se ha incorporado la detección de anticuerpos antineutrófilos en el kit de detección de anti HLA, esto origina grandes expectativas dado la dificultad que conlleva la

detección y más aun la identificación de este tipo de anticuerpos. El kit de escrutinio (LABScreenTMMulti, One lambda, Inc) permite con un solo tubo de reacción detectar simultáneamente anticuerpos anti HLA de clase 1 (loci A, B, C) y de clase 2 (Loci DR, DQ) y anti HNA (alelos 1a, 1b, 1c, y 2a). En un estudio preliminar que realizamos por dicha técnica, analizamos doce sueros provenientes de madres cuyos hijos habían tenido una neutropenia con sospecha de origen aloinmune pasivo por anticuerpos maternos. Estos sueros se habían analizado en su momento por citometría de flujo convencional, tanto enfrentados a los neutrófilos del padre como de donantes sanos. En cinco de ellos se identificaron anticuerpos frente a antígenos específicos de neutrófilos (tres anti HNA-1a, uno anti HNA-1b y uno anti Fc γ RIIIb, sólo en tres se detectaron anti HLA, en dos anti HLA y autoanticuerpos y en los otros dos no se encontraron anticuerpos. En total obtuvimos concordancia en diez de los doce sueros; de los cinco anticuerpos específicos ya conocidos se detectaron cuatro por Luminex. En cuanto a las sospechas de autoanticuerpos, en uno se obtuvo un resultado concordante, y en el otro no se detectaron; los anti HLA se detectaron todos. La técnica de Luminex parece funcionar bien para la detección de anticuerpos antineutrófilos; tiene la enorme ventaja de no necesitar células frescas y de detectar de modo simultáneo los anticuerpos anti HLA y los antineutrófilos, lo que es de gran utilidad en el estudio de los donantes implicados en reacciones transfusionales pulmonares y en las neutropenias neonatales, sin embargo, para

que sea realmente útil falta incluir el resto de sistemas HNA en las microesferas.

Una vez detectada la presencia de un anticuerpo en el suero materno, el fenotipaje, o mejor, el genotipaje de los neutrófilos de los padres y del neonato nos sirve para confirmar la implicación del anticuerpo encontrado; además nos permite conocer la cigosidad del padre.

En la mayoría de los casos están implicados anticuerpos frente a antígenos del sistema HNA-1 o HNA-2.²¹ En el resto de sistemas específicos de los neutrófilos la inmunización es mucho menos frecuente, aunque se han descrito casos aislados en todos ellos (HNA-3, HNA-4 y HNA-5).¹²⁻¹⁵

En algunas ocasiones el anticuerpo va dirigido frente al receptor FcγRIIIb completo, en mujeres con deficiencia congénita de este receptor.²²⁻²⁵ La frecuencia de esta deficiencia en España es mayor que en otros países europeos, lo que explica que al menos en nuestra experiencia este anticuerpo es el segundo en frecuencia después del HNA-1a como causa de NNA.

Nosotros utilizamos como rutina la citometría de flujo sobre neutrófilos aislados con un gradiente de densidad²⁶ y la absorción de los sueros con plaquetas para eliminar las interferencias por anti HLA. En la Figura 2 se muestra nuestro diagrama de actuación en los

Estudio de NNA: Flow-GIF

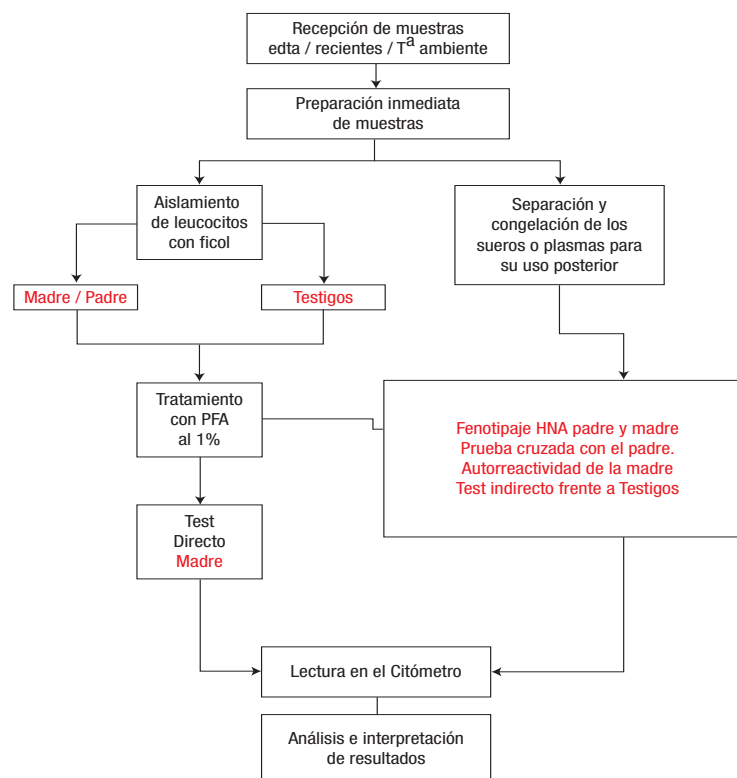


Figura 2. Diagrama de trabajo en estudios de NNA por citometría de flujo. La totalidad de las muestras de sangre extraídas con EDTA (no refrigeradas) se debe procesar en las primeras 24 horas después de su extracción, y fijarlas con PFA. Los sueros o plasmas se mantienen fraccionados y congelados hasta su uso.

estudios de NNA. A la vez que la prueba cruzada entre el suero de la madre y los neutrófilos del padre, realizamos el tipaje HNA de ambos progenitores. Además, para descartar la presencia de autoanticuerpos en la madre, realizamos la prueba directa de antiglobulina sobre los neutrófilos maternos, así como la autorreactividad enfrentando el suero de la madre con sus propios neutrófilos. Siempre comparamos la fluorescencia obtenida con las muestras problema con la obtenida con tres controles negativos.

Para descartar que la positividad de una prueba cruzada sea por anticuerpos anti HLA, analizamos en el mismo tubo la reacción con linfocitos (que siempre contaminan la muestra de neutrófilos) utilizando una ventana según tamaño y granularidad, tal y como se ve en la Figura 3. En el caso de positividad con linfocitos repetimos la prueba

con suero absorbido y confirmamos la presencia de anti HLA con la técnica de linfocitotoxicidad o la de Luminex. Está en discusión la implicación de los anticuerpos anti HLA en esta patología, ya que se han descrito algunos casos sugestivos de neutropenia neonatal aloinmune, en los que sólo se han encontrado estos anticuerpos.^{27,28} Sin embargo, la presencia de anticuerpos anti-HLA es muy frecuente durante las gestaciones en mujeres cuyos hijos no presentan ningún tipo de la citopenia neonatal. Además, el hecho de que los antígenos HLA estén muy bien representados en las células de la placenta, hace que se absorban en ella la mayoría de estos anticuerpos y no lleguen al feto, por lo que en teoría solo podrían afectarse aquellos en los cuales la madre tuviera una gran cantidad de anticuerpos que sobrepasara esta barrera placentaria. Aún así, el hecho de que el

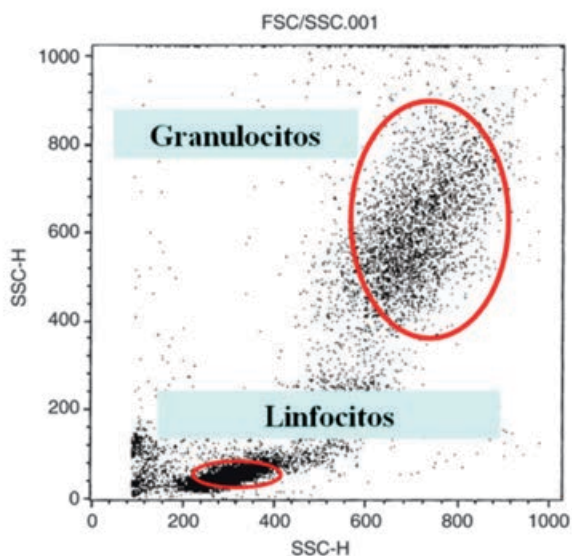


Figura 3. Selección de poblaciones celulares por ventanas (gates) de tamaño y granularidad para analizar por citometría de flujo.

sistema HLA esté bien representado en otras células sanguíneas, como los linfocitos y las plaquetas, no explica fácilmente el que se produzcan citopenias neonatales en un solo tipo de células por este tipo de anticuerpos.

En nuestra experiencia de setenta y nueve estudios realizados por sospecha de NNA, encontramos anticuerpos anti HLA en treinta y dos (40%) madres, y en dieciséis (20%) de ellas como único hallazgo serológico. Nosotros los informamos, pero no los consideramos como responsables de la neutropenia del niño. En otros trece casos (16%) se detectaron autoanticuerpos maternos como probables responsables de la neutropenia del recién nacido, y únicamente en las madres de diecisiete niños (21,5%) detectamos anticuerpos específicos de neutrófilos (diez anti HNA-1a, uno anti HNA-1b, cuatro anti FcγRIIIb y dos no identificados). Dos de los casos fueron partos gemelares dicigóticos, y en ambos, el anticuerpo implicado fue el HNA-1a, en uno de ellos el padre era homocigótico y, aunque sólo tenemos datos de uno de los niños, el otro hermano probablemente también estuvo afectado, pero en menor grado, pues la familia nos refirió que presentó un cuadro infeccioso de onfalitis que evolucionó bien con tratamiento antibiótico; en el segundo caso gemelar, el padre era heterocigótico y se constató que sólo uno de los gemelos (el que había heredado el alelo implicado) tuvo neutropenia. Dos de los anticuerpos anti FcγRIIIb pertenecían a la misma madre en su segunda y tercera gestación. En el primer niño afectado el diagnóstico se hizo posparto debido a que presentó neutropenia con una in-

fección grave que fue finalmente controlada con inmunoglobulinas intravenosas y antibióticos. El segundo niño afectado también tuvo una neutropenia grave (neutrófilos al nacer 0), pero el conocimiento previo del diagnóstico evitó que se produjeran complicaciones. En el estudio familiar de estos niños se encontró que la abuela y dos de sus hijas tenían ausencia completa de los genes FCRGR3; sin embargo, de las tres mujeres (todas multíparas) sólo una se había inmunizado.²⁴

Evolución y tratamiento

La principal manifestación clínica de la NNA, y a menudo la única, son las infecciones, que en nuestra casuística se observó en ocho de los dieciséis niños con anticuerpos específicos en los que tenemos datos (50%). En dos de ellas fueron graves, una onfalitis resistente al tratamiento y un cuadro séptico generalizado, el resto fueron infecciones leves (onfalitis, dérmicas, IRS, otitis) o no hubo sintomatología, y la neutropenia se detectó de modo casual al realizar analíticas por otras causas. En el grupo producido por autoanticuerpos maternos se produjo cuadro infeccioso en cuatro de los diez niños en los que tenemos datos (40%) y sólo en un caso el cuadro fue grave.

En muchos de los casos la administración de antibióticos es suficiente para superar la infección, pero si la neutropenia es grave y/o la infección no remite con los antibióticos se pueden aplicar factores de crecimiento granulocitario (G-CSF) o inmunoglobulinas intravenosas a altas dosis (IgIV). En nuestros casos, de los die-

cisiete con anticuerpos específicos, se trataron dos niños con G-CSF, y en ambos se obtuvo buena respuesta, aunque en uno de ellos se produjo una recaída tras finalizar el tratamiento. Otros dos niños fueron tratados con IgIV, y uno de ellos también tuvo recaída de la neutropenia al cesar el tratamiento que remitió con una segunda tanda de IgIV. Al resto de los neonatos se les administró sólo antibióticos o nada, y evolucionaron espontáneamente hacia la normalización de sus neutrófilos. En casos de infecciones muy graves podría incluso utilizarse transfusión de granulocitos genotipados, pero en nuestra experiencia nunca ha hecho falta.

Especial atención hay que tener en casos producidos por anticuerpos de especificidad anti HNA-2, ya que se ha reportado resistencia al tratamiento con G-CSF, pues la expresión de este alelo en los neutrófilos aumenta con la administración de dichos factores y podría empeorar el cuadro clínico.

En conclusión, la neutropenia neonatal aloinmune es una patología producida por inmunización fetomaternal frente a antígenos específicos de los neutrófilos, es muy poco frecuente (aunque podría haber muchos casos que pasen desapercibidos), su pronóstico es generalmente benigno y no siempre se producen infecciones, aunque cuando aparecen pueden ser graves. La neutropenia se recupera en pocos días, muchas veces sin necesidad de tratamiento, aunque hay casos en que la recuperación es muy lenta y se prolonga por varias semanas e incluso meses.

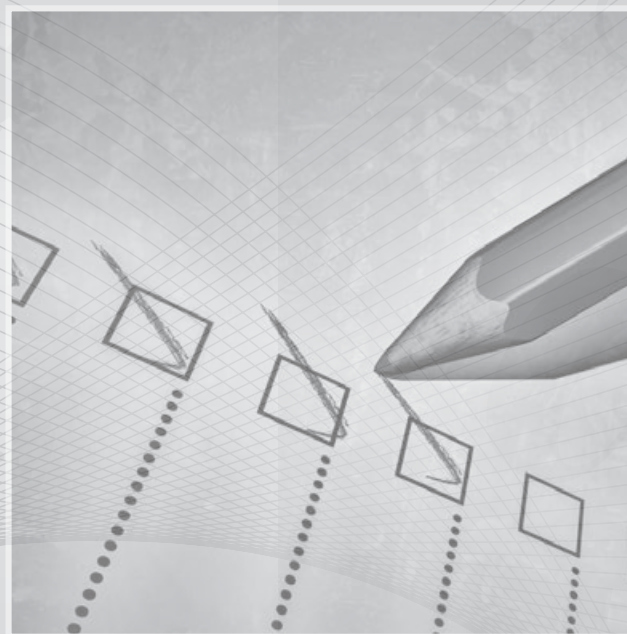
Referencias

1. Bux, J. Nomenclature of granulocyte alloantigens. ISBT Working Party on Platelet and Granulocyte Serology, Granulocyte Antigen Working Party. International Society of Blood Transfusion. *Transfusion*, 1999; 39(6):662-3.
2. Lalezari, P., Bernard, J. E. An isologous antigen-antibody reaction with human neutrophils related to neonatal neutropenia. *J Clin Invest.*, 1966; 45: 1741-1750.
3. Lalezari, P., Radel, E. Neutrophil-specific antigens; Immunology and clinical significance. *Semin Haematol.*, 1974; 11:281-290.
4. Bux, J., Stein, E. L., Bierling, P., Fromont, P., Clay, M., Stroncek, D. et al. Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc gamma receptor IIIb. *Blood*, 1997; 89(3):1027-34.
5. Reil, A., Sachs, U. J., Siahianidou, T., Flesch, B. K., Bux, J. HNA-1d: a new human neutrophil antigen located on Fc γ receptor IIIb associated with neonatal immune neutropenia. *Transfusion*, 2013; Jan 24. doi: 10.1111/trf.12086. [Epub ahead of print]
6. Muñiz-Díaz, E., Madoz, P., de la Calle Martín, O., Puig, L. The polymorphonuclear neutrophil Fc gamma RIIIb deficiency is more frequent than hitherto assumed. *Blood*, 1995; 86(10):3999.
7. Lalezari, P., Murphy, G. B., Allen, F. H. NB1, a new neutrophil antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J Clin Invest.*, 1975; 50:1108-1115.
8. Stroncek, D. F., Jaszcz, W., Herr, G. P., Clay, M. E., McCullough, J. Analysis of the expression of neutrophil antigens after 10 days of granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion*, 1998; 38:663-668.
9. Pocock, C. F., Lucas, G. F., Giles, C., Vassiliou, G., Cwynarski, K., Rezvani, K. et al. Immune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen 2a (NB1) antibodies following unrelated donor stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia: perpetuation by granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Haematol.*, 2001; 113(2):483-5.
10. Stroncek, D. F., Shapiro, R. S., Filipovich, A. H., Plachta, L. B., Clay, M. E. Prolonged neutropenia resulting from antibodies to

- neutrophil-specific antigen NB1 following marrow transplantation. *Transfusion*, 1993b; 33:158-163.
11. Stroncek, D. F. Neutrophil-specific antigen HNA-2a, NB1 glycoprotein, and CD177. *Curr Opin Hematol.*, 2007; 14(6):688-93.
 12. Muñoz-Díaz, E., Madoz, P., García, L., de la Calle, O., Ibáñez, M., Gracia, M. et al. Neutropenia neonatal aloimmune grave inducida por un anticuerpo antigranulocitario de especificidad 5b. *Sangre*, 1996; 41(Supl. 2):9.
 13. Lopes, L. B et al. The incidence of neonatal alloimmune neutropenia due to maternal alloimmunization against human Neutrophil alloantigen-3 in the Brazilian population. *Vox Sanguinis*, 2013; 105 (Suppl. 1), 65-299. 252 Abstracts.
 14. Hartman, K. R., Wright, D. G. Identification of autoantibodies specific for the neutrophil adhesion glycoproteins CD11b/CD18 in patients with autoimmune neutropenia. *Blood*, 1991; 78(4):1096-104.
 15. Fung, L., Pitcher, L. A., Willet, J. E., Reed, C., Mison, L., Bux, J. et al. Alloimmune neonatal neutropenia linked to anti-HNA-4a. *Transfus Med.*, 2003; 13:49-52.
 16. Porcelijn, L., Abbink, F., Terraneo, L., Onderwater-vd Hoogen, L., Huiskes, E., de Haas, M. *Transfusion*. Neonatal alloimmune neutropenia due to immunoglobulin G antibodies against human neutrophil antigen-5a. *Transfusion*, 2011; 51(3):574-7.
 17. Yasui, D., Miyazaki, T., Matsuyama, N., Kojima, Y., Furuta, R. A., Fujisawa, J. et al. Establishment of cell lines stably expressing HNA-1a, -1b and -2a antigen with low background reactivity in flow cytometric analysis. *Transfusion*, 2007; 47:478-485.
 18. Yasui, K., Hirayama, F., Matsuyama, N., Furuta, R. A., Kimura, T., Tani, Y. et al. New cell lines express HNA-1c, -4a, -4b, -5a or -5b for identification of HNA antibodies. *Transfusion*, 2008; 48:1037-1039.
 19. Araki, N., Nose, Y., Kohsaki, M., Mito, H., Ito, K. Anti-granulocyte antibody screening with extracted granulocyte antigens by a micro-mixed passive hemagglutination method. *Vox Sang.*, 1999; 77(1):44-51.
 20. Fromont, P., Prié, N., Simon, P., Cesbron-Gautier, A., Quelvenec, E., Bignon, J. D. et al. Granulocyte antibody screening: evaluation of a bead-based assay in comparison with classical methods. *Transfusion*, 2010; 50(12):2643-8.
 21. Bux, J., Jung, K. D., Kauth, T., Mueller-Eckhardt, C. Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. *Transfus Med.*, 1992; 2(2):143-9.
 22. Huizinga, T. W. J., Kuipers, R. W. A. M., Kleijer, M., Schulpen, T. W. J., Cuypers, H. T. M., Roos, D. et al. Maternal Genomic Neutrophil FcγRrIII deficiency Leading to Neonatal Isoimmune Neutropenia. *Blood*, 1990; 76:1927-32.
 23. Fromont, P., Bettaieb, A., Skouri, H., Floch, C., Poulet, E., Duedari, N. et al. Frequency of the polymorphonuclear neutrophil Fcγ Receptor III deficiency in the French population and its involvement in the development of neonatal alloimmune neutropenia. *Blood*, 1992; 79:2131-4.
 24. Stroncek, D. F. S., Skubitz, K. M., Plachta, L. B., Shankar, R. A., Clay, M. E., Herman, J. et al. Alloimmune Neonatal Neutropenia due to an Antibody to the Neutrophil Fc-gamma Receptor III With Maternal Deficiency of CD16 Antigen. *Blood*, 1991; 77:1572-80.
 25. Puig, N., De Haas, M., Kleijer, M., Pérez, A., Montoro, J. A., Gómez, I., von dem Borne, A. E. G. K. R. Immune neonatal neutropenia caused by anti-FcγRrIII antibodies in a Spanish child. *Transfusion*, 1995; 35(8): 683-687.
 26. Puig, N., Montoro, J. A., Villalba, J. L., Gimeno, M., Ample, I., Molina, J. et al. Neutropenia neonatal aloimmune: estudio por citometría de flujo del primer caso descrito en España con identificación de un anti-NA1. *Sangre*, 1993; 38 (3):235-238.
 27. Hagimoto, R., Koike, K., Sakashita, K., Ishida, T., Nakazawa, Y., Kurokawa, Y. et al. A possible role for maternal HLA antibody in a case of alloimmune neonatal neutropenia. *Transfusion*, 2001; 41(5):615-20.
 28. Tomić, M., Starčević, M., Bux, J., Zach, V., Hundrić-Haspl, Z., Dražić, V. et al. Severe neonatal neutropenia due to anti-human leucocyte antigen B49 alloimmunization only: a case report. *Transfus Med.*, 2003; 13(4):233-7.

Inmunohematología
básica y aplicada

SECCIÓN V



Calidad en el laboratorio
de inmunohematología

Control de la calidad en el laboratorio de inmunohematología

ANA CLAUDIA PERÓN*
DANIEL ALBERTO TÉLLEZ PAZ**
REGINA CARDOSO***
SILVIA BONIFACIO LEÃO****

* *Bióloga, Especialista en Inmunohematología. Consultora y asesora científica para Inmunohematología. MBA en Marketing. Gerente de productos para la línea de inmunohematología en la empresa Bio-Rad/Brasil, Brasil. clauperon@hotmail.com*

** *Bacteriólogo y Laboratorista Clínico. Máster en Medicina Transfusional y Terapia Celular y Tisular. Especialista en Inmunohematología y asesor científico de Biocientífica Ltda. Bogotá, D.C. Colombia. datep100@hotmail.com*

*** *Biomédica. Máster en Biotecnología Médica. Especialista en Inmunohematología. Responsable por el Laboratorio de Inmunohematología del Banco de Sangre del Hospital Sírio Libanês en São Paulo, Brasil. Consultora y asesora científica para Inmunohematología. Docente Coordinadora del Curso de Posgrado en Hemoterapia de la Escuela SENAC en São Paulo, Brasil.*

**** *Bióloga. Especialista en Análisis Clínico e Inmunohematología. Responsable por el Departamento de Control de Calidad del Laboratorio de Inmunohematología Clínica de la Fundación Pró-Sangue/Hemocentro en São Paulo, Brasil. Consultora y asesora científica para Inmunohematología. Brasil. bonifaciosilva@ig.com.br*

Introducción

En los últimos treinta años hemos presenciado una búsqueda incansable de toda la sociedad médica, así como de la sociedad en general, por caminos que garanticen disminuir al máximo los riesgos correspondientes a la terapia transfusional. Esta búsqueda se la debemos a la pandemia de SIDA iniciada en los años ochenta. A partir de este hecho, muchas leyes y mecanismos fueron creados con fines de garantizar la calidad de los procedimientos hemoterapéuticos. Sin duda la reciente exi-

gencia de normas y acreditaciones de los servicios por entidades nacionales e internacionales contribuyen a una total evolución en las técnicas y procedimientos utilizados en la rutina.

El concepto de calidad tuvo su origen en la industria y hoy día se ha implementado de manera definitiva en el área de la salud. Para una gestión de calidad se deben monitorear diversos procesos, entre ellos: gestión de las personas, infraestructura, documentos, errores y reclamaciones, además, observar los resultados y definir medidas preventivas y correctivas.

Muchos países han desarrollado políticas y regulaciones para el funcionamiento de los bancos de sangre y de los servicios de transfusión sanguínea tendientes a conseguir y mantener la calidad y la seguridad en esta práctica.

La confianza en los procedimientos, en los resultados analíticos y en los productos o servicios que utiliza y presta un banco de sangre y servicio de transfusión sanguínea, solo pueden asegurarse con la decisión de mantener un programa de vigilancia permanente sobre todos los procesos, comprendidos desde la promoción de la donación de la sangre hasta el monitoreo posttransfusional del paciente (hemovigilancia), de tal forma que se garantice que los diversos factores causantes de variaciones y fuentes de errores estén en todo momento monitoreados y controlados.

La implementación de un programa de aseguramiento de la calidad debe realizarse en cuatro fases:

- **Fase 1.** Realizar la evaluación de los procesos del banco de sangre o servicio de transfusión con el pro-

pósito de establecer las necesidades de mejoramiento. Dicha evaluación puede hacerse tomando como referentes, estándares o manuales que presenten requerimientos necesarios para la certificación y acreditación de estos servicios.

- **Fase 2.** Iniciar una etapa de autorregulación en la que se implementen los estándares de procedimientos y se satisfagan los requerimientos establecidos como vitales para la obtención de productos y servicios de calidad.
- **Fase 3.** Establecer auditoría interna del programa a cargo de los mismos empleados organizados en equipos de trabajo y una auditoría externa a cargo de una institución de referencia de reconocido prestigio.
- **Fase 4.** Asegurar que el programa una vez implementado se seguirá desarrollando de manera dinámica, en otras palabras, el programa de aseguramiento de la calidad podrá mantenerse si se realiza permanentemente planeación estratégica, control de los procesos, manejo adecuado de la información, auditoría interna y externa, análisis de la información y toma de medidas correctivas (autorregulación), revisión permanente de las políticas de la calidad y diseño de un programa o plan de educación continua para los empleados.

Todos los procesos que se desarrollan en los bancos de sangre y servicios de transfusión son importantes y merecen especial atención y cuidado en su ejecución, para esto se debe concebir un programa de aseguramiento de la ca-

alidad que controle todos y cada uno de los pasos que los componen. Adicional a lo anterior, es necesario identificar los puntos críticos que representan las mayores oportunidades de errores en los procesos, con el propósito de controlarlos y evaluarlos periódicamente.

Aunque diferentes manuales y estándares de calidad recomiendan evaluar y controlar los procesos con la inclusión de controles de calidad internos y externos, una de las maneras de identificar los puntos críticos es a través del reporte de errores. Los bancos de sangre y servicios de transfusión sanguínea deben poner en funcionamiento un sistema de reporte de errores y accidentes, con el propósito de reconocerlos y evitarlos posteriormente. Un error se define como la desviación inadvertida o no autorizada de los procedimientos operativos estándar. De la misma forma, se sugiere la implementación de la gestión de riesgo, definido éste como la combinación entre la probabilidad de que se produzca un evento y sus consecuencias negativas. Si se conocen los riesgos posibles en el proceso, podemos mitigarlos antes de que se transformen en errores.

De lo anterior se deduce que para la identificación y el control de los puntos críticos se requieren la elaboración y la constante revisión de los manuales de procedimientos.

Los manuales de procedimientos son documentos que contienen en forma ordenada y sistemática información e instrucciones necesarias para la mejor ejecución del trabajo. Estos manuales son elaborados por el personal profesional y técnico que trabaja en los bancos de sangre y servicios de transfu-

sión, y por lo general incluyen puntos como:

- Título del proceso y del procedimiento
- Objetivo del procedimiento
- Tipos de muestras que se puede utilizar
- Materiales y reactivos necesarios
- Descripción paso a paso del procedimiento
- Interpretación de los resultados obtenidos
- Limitaciones del procedimiento
- Flujograma
- Recomendaciones
- Referencias bibliográficas
- Fechas de las revisiones y responsables de las mismas
- Anexos de los insertos de los reactivos que se están utilizando en el procedimiento

Los manuales deben ser revisados y actualizados anualmente o al momento de encontrar alguna necesidad, como por ejemplo al detectar una falla no descrita en el manual operativo o por alteraciones en el inserto de un reactivo. En esta tarea debe involucrarse todo el personal del banco de sangre y servicio de transfusión.

En general, es importante evaluar y controlar el cumplimiento estricto de todos los protocolos estandarizados, incluir controles de calidad internos y externos en la ejecución de las pruebas y valorar periódicamente los errores que se cometen en el proceso, para identificar y eliminar su causa.

Los programas o planes de educación continua son fundamentales.

La calidad de los procesos y los resultados depende en gran parte del

personal que labora en los bancos de sangre y servicios de transfusión, razón por la cual es importante que estos tengan procedimientos documentados para identificar las necesidades de capacitación y entrenamiento y el modo de satisfacer esas necesidades. De igual manera, es conveniente definir los criterios que se siguen para calificar al personal y los tiempos y formas en que la idoneidad del personal será evaluada. El programa de educación debe ser continuo, es decir, deben ser valorados e incentivados los encuentros para estudios que van a capacitar cada vez más al personal que labora en los laboratorios de inmunohematología.

Control de calidad de los reactivos

El análisis de los reactivos inmunohematológicos se orienta para garantizar la calidad y la reproducibilidad de las pruebas inmunohematológicas realizadas, y como consecuencia efectuar una transfusión segura a los pacientes.

En la mayoría de los países se exige el cumplimiento de normas específicas de calidad para la comercialización de un producto. En estos casos los reactivos son evaluados previamente, incluso los procesos de producción, almacenamiento, envasado, etiquetado y evaluación de las pruebas de control de calidad. Lo anterior nos ayuda a ratificar su buena calidad y rendimiento. No obstante, muchos problemas relacionados con los reactivos ocurren por fallas humanas al no seguir las instrucciones dadas en los insertos por los fabricantes.

La búsqueda por la calidad es responsabilidad de todos los que traba-

jan en una institución, de manera que debemos asegurar que todo el equipo técnico cumpla con las instrucciones determinadas en los insertos, además de estar capacitados y atentos a detectar posibles resultados discrepantes. Lo anterior se garantiza con la correcta utilización de los manuales de procedimientos e implementación del proceso de educación continua.

Todos los reactivos inmunohematológicos como antisueros, glóbulos rojos, enzimas proteolíticas, potenciadores, diluyentes, tarjetas u otros utilizados, deben ser probados.

Para implementación del aseguramiento de la calidad en los reactivos utilizados en el laboratorio de inmunohematología, es necesaria la elaboración de protocolos que contemplen el recibimiento del producto, los procedimientos de análisis, la frecuencia de realización de las pruebas, los formatos específicos, el análisis de los resultados obtenidos y la conducta frente a los resultados inesperados, e incluso informes de no conformidades con la consecuente aplicación de acciones preventivas y/o correctivas cuando éstas sean necesarias.

Es importante expresar que el control de calidad interno debe ser realizado al recibir el producto (control por lote), debido a que los reactivos pueden sufrir alteraciones durante el transporte, y por posibles modificaciones durante el almacenamiento y el manejo diario.

El primer análisis es la inspección visual o macroscópica, para el cual se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

- **Rótulos:** firmemente adheridos, con la información técnica como: nombre del producto, lote, fecha de caducidad, temperatura de almacenamiento y número de registro (en los países donde los productos deben ser regulados y autorizados).
- **Embalaje:** interno y externo. Chequear el estado general y posibles derrames.
- **Inserto:** escrito en la lengua local, y contiene información como: metodología de la prueba, materiales necesarios, interpretación de los resultados, limitaciones técnicas y observaciones.

Especialmente para los países donde no hay exigencias de registro previo de los productos, es importante la evaluación del certificado analítico de los reactivos, que es un documento elaborado por el fabricante, con informaciones referentes al lote del reactivo recibido, el origen del material, la línea celular para los sueros monoclonales, la composición química y los resultados de las pruebas de referencia que se realizaron para evaluar dicho reactivo.

En la rutina, los parámetros que deberán ser evaluados en cada reactivo son: Apariencia, Especificidad y Sensibilidad.

- **Apariencia**

La evaluación de la apariencia debe ser realizada diariamente, con el fin de observar criterios como: ausencia de precipitados, partículas, turbidez, burbujas (técnicas de aglutinación en columna). Para los reactivos de glóbulos rojos observar la turbidez y hemólisis en el líquido sobrenadante u oscurecimiento del glóbulo rojo.

- **Especificidad**

Las pruebas deben asegurar que los reactivos van a reaccionar solamente con los antígenos y anticuerpos específicos (Tabla 1).

- **Sensibilidad**

La sensibilidad debe ser evaluada por la intensidad de aglutinación provocada por las reacciones antígeno-anticuerpo. Las pruebas deben garantizar que los reactivos reaccionen específicamente (Tabla 2).

Para los demás antisueros y reactivos celulares se deben utilizar los mis-

Tabla 1. Especificidad

Prueba de especificidad	Probar con	Resultado esperado
Antígenos en los glóbulos rojos A ₁ , A ₂ y B	Plasma AB	Negativo
Anticuerpos en los reactivos Anti-A, anti-B y anti-AB	Glóbulos rojos O	Negativo
Anticuerpos en el reactivo Anti-D	Glóbulos rojos RhD negativo	Negativo
Control de Rh	Glóbulos rojos no sensibilizados	Negativo
Antiglobulina humana (AGH)	Glóbulos rojos no sensibilizados	Negativo

Tabla 2. Sensibilidad

Prueba de sensibilidad	Probar con	Resultado esperado
Glóbulos rojos A ₁ , A ₂ y B	Plasma o sueros que contengan los Ac específicos Anti-A y Anti-B.	Reacción de aglutinación mínima de 2+
Antisueros Anti-A, Anti-B y Anti-AB	Glóbulos rojos que contengan los antígenos específicos A ₁ , A ₂ y B.	Realizar titulaciones y pruebas de avidéz. Los títulos y grados de aglutinación ideales pueden variar dependiendo de las normas técnicas establecidas.
Antisuero Anti-D	Glóbulos rojos que contengan el antígeno D.	Realizar titulaciones y pruebas de avidéz. Los títulos y grados de aglutinación ideales pueden variar dependiendo de las normas técnicas establecidas.
Control de Rh	No se aplica prueba de sensibilidad.	
AGH	Glóbulos rojos sensibilizados con anticuerpos (TAD positivo).	Realizar titulaciones. Los títulos y grados de aglutinación ideales pueden variar dependiendo de las normas técnicas establecidas.

mos criterios de evaluación para la sensibilidad y especificidad, considerando siempre la aplicación de cada reactivo.

Para los diluyentes y potenciadores, como liss, albúmina bovina, enzimas proteolíticas, polietilenglicol y otros, es necesario realizar pruebas diarias, teniendo en cuenta que estos reactivos no deben causar hemólisis, aglutinación o rouleaux (fenómeno de apilamiento de los glóbulos rojos). Para la solución salina hay que controlar también el pH.

Todas las pruebas de control de calidad deben ser registradas en formatos específicos, con el nombre del reactivo, el fabricante, el número del lote, la fecha de caducidad, los resultados y el nombre y la firma del responsable de las pruebas (como veremos en la trazabilidad).

Como se ha citado anteriormente, la manipulación de los reactivos puede alterar su calidad; partiendo de este hecho, deben generarse protocolos de control diario de los reactivos. Estos protocolos incluyen la utilización en la rutina de muestras control positivas y negativas conocidas. Las muestras de control deben ser tratadas de manera similar a las de rutina, es decir, no debemos tratar muestras de control de calidad de manera distinta.

Trazabilidad

Al establecer un programa de control de calidad se deben documentar y registrar los resultados obtenidos en las inspecciones de calidad, con el fin de comprobar que los reactivos están dentro de los patrones establecidos por las

normas técnicas. Además, los registros deben contener todos los datos relevantes en la inspección de la calidad y los resultados finales de los análisis con el nombre del responsable técnico y la respectiva aprobación del coordinador de área.

Registro se define como el documento que presenta los resultados, o la prueba de la realización de una actividad, teniendo en cuenta los resultados. Registrar las pruebas de control de calidad en inmunohematología asegura:

- El cumplimiento de los requisitos legales, normas, patrones y especificaciones del reactivo.
- Mostrar las evidencias objetivas de los resultados obtenidos.
- La trazabilidad o, en otras palabras, la capacidad de recuperación del histórico de los resultados obtenidos y de los procedimientos involucrados. De esta manera podemos reconstruir todo el proceso de inspección de calidad.

Por consiguiente, documentar y registrar los resultados avalan la calidad constante.

Al recibir un reactivo, insumo o cualquier material para pruebas de

control de calidad, se deben registrar datos importantes como:

- Fecha de entrada
- Volumen/cantidad recibida
- Producto recibido
- Fabricante
- Lote y fecha de caducidad

Después de la recepción de un reactivo es necesario realizar la inspección visual y luego la inspección propiamente dicha, la cual debe entenderse como la fase donde todos los ensayos son realizados, según los criterios establecidos en los procedimientos operativos estándar.

La inspección visual es la primera fase, como ya mencionamos anteriormente. La Tabla 3 muestra un ejemplo de los registros de dicha inspección para un reactivo de glóbulos rojos A₁, cuyo rótulo no cumple el exigido. Para la inspección visual de los reactivos de glóbulos rojos debemos dar especial énfasis a la presencia de hemólisis.

La inspección es la fase en la que se hacen los ensayos inmunohematológicos. Los resultados obtenidos en todas las etapas de la inspección deben ser registrados, es decir, las pruebas de especificidad, reactividad y titulación.

Tabla 3. Inspección visual

Reactivo: Glóbulos rojos A ₁ Fabricante: Lote: Fecha de caducidad: .../.../...		
Crterios	Cumple / No cumple	¿Por qué no cumple?
Visual	Cumple	---
Rótulo	No cumple	No presenta el número de lote
Embalaje	Cumple	---
Inserto	Cumple	---
Hemólisis	Cumple	---

Dichos registros deben traer datos de los otros reactivos utilizados para las pruebas en cuestión, así como la metodología utilizada (especificados en el inserto del fabricante).

Las Tablas 4 y 5 ilustran el registro de las pruebas de especificidad, reactividad y titulación de un suero Anti-Fy^a. La técnica utilizada para las pruebas es

la misma determinada por el fabricante en el inserto.

La Tabla 6 muestra los registros del control de calidad de los glóbulos rojos utilizados en la tipificación inversa. Los registros deben contener las pruebas de reactividad y especificidad, sin olvidar el origen del plasma usado para las pruebas.

Tabla 4. Registro de especificidad y reactividad

Reactivo: Anti-Fy ^a		Fabricante:.....	Lote:.....	Fecha de caducidad:/...../.....	
Glóbulo rojo utilizado	Fenotipo	Metodología: Tubo	Técnica: AGH	Incubación: 30 min	
		Resultados			
		Fase: Temperatura ambiente	Fase: 37 °C	Fase: AGH	
Glóbulo rojo 00000X	Fy(a-b+)	no se aplica	no se aplica	0	
Glóbulo rojo 00000Y	Fy(a+b+)	no se aplica	no se aplica	2+	

Obs: La línea 1 muestra la prueba de especificidad, y la línea 2, la prueba de sensibilidad (reactividad).

Tabla 5. Ejemplo de registro del título

Reactivo: Anti-Fy ^a		Fabricante:.....	Lote:.....	Fecha de caducidad:/...../.....							
Glóbulo rojo utilizado	Fenotipo	Diluciones									
		1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
		Resultados									
Glóbulo rojo 000000X	Fy(a+b+)	2+	2+	1+	0						

Obs: En el ejemplo el título es 4.

Tabla 6. Especificidad y sensibilidad de glóbulos rojos A₁, A₂ y B

Reactivo: Glóbulos rojos A ₁ , A ₂ y B		Fabricante:.....	Lote:.....	Fecha de Caducidad:/...../.....	
Plasma control		Células A ₁		Células B	
Plasma A – Donante 000000X		0		4+	
Plasma B – Donante 000000Y		4+		0	
Plasma AB – Donante 000000Z		0		0	

Para los glóbulos rojos utilizados en el rastreo e identificación de anticuerpos irregulares, los registros deben contener

las pruebas de reactividad y especificidad, sin olvidar del origen de los sueros usados en las pruebas (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Especificidad de los glóbulos rojos I - II

Reactivo: Glóbulos rojos Rastreo de Ant irregulares Fabricante:..... Lote:... Fecha de caducidad:/.....			
		Rastreo	
Plasma control	Anticuerpo	I	II
Plasma 000X	RAI Pos. (Anti D)	2+	2+
Plasma 000Y	RAI Neg.	0	0
Sobrenadante limpio		Conforme	

El mismo modelo se utilizaría para células I, II y III

Tabla 8. Especificidad de los glóbulos rojos del panel de identificación

Reactivo: G.R. Identificación de Ant irregulares Fabricante:..... Lote:... Fecha de Caducidad:/.....												
		Panel de identificación										
Plasma control	Anticuerpo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Plasma 000X	RAI Pos. (Anti D)	2+	2+	2+	0	0	0	0	2+	0	0	2+
Plasma 000Y	RAI Neg.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sobrenadante limpio		Conforme										

Para el reactivo control del suero de Coombs, los registros deben contener las pruebas de sensibilidad y el origen, el lote y la fecha de caducidad del suero de antiglobulina humana (AGH) (Tabla 9).

Para los potenciadores como albúmina bovina, polietilenglicol y las soluciones de baja fuerza iónica, además de la inspección visual, debemos realizar una reacción que contenga un suero con rastreo de anticuerpos irregulares

Tabla 9. Formato para el reactivo control de suero de Coombs

Reactivo: Control de suero de Coombs Fabricante:..... Lote:..... Fecha de caducidad:/...../.....		
Glóbulos rojos control		Sensibilidad GR control de Coombs
000X (muestra de donante o paciente)	PAD Positiva (adsorbido con suero Anti-D)	3+
000Y	PAD Negativo	0
Sobrenadante limpio		Conforme

positivo con y sin potenciador para comparar el aumento de la reactividad, y un suero con rastreo de anticuerpos irregulares negativo (prueba de especificidad), con el fin de registrar los resultados obtenidos en las reacciones por cruces (Tabla 10).

El inserto del reactivo puede unirse a la inspección de calidad de trazabilidad del método, ya que debemos respetar la metodología utilizada (tubo, microplacas, técnicas de aglutinación en columna). Los criterios de aceptación y rechazo deben ser cuidadosamente evaluados y documentados en los procedimientos operativos estándar.

Control de calidad de los equipos

El laboratorio de inmunohematología requiere la utilización de equipos e instrumentos considerados críticos para la rutina inmunohematológica. Los equipos e instrumentos necesitan cuidados para garantizar su desempeño, de tal manera que este control asegure la calidad de las pruebas.

Entre los equipos básicos utilizados tenemos:

- **Refrigerador para banco de sangre:** poseen alarmas visuales y audibles para prevenir el aumento o disminución de la temperatura fuera de los límites preestablecidos. Preferencialmente debe contener: puerta de vidrio (u otro material transparente), cajones de acero inoxidable y circulación de aire interna que garantice que el ambiente interno mantenga la temperatura ideal. Los reactivos almacenados en el refrigerador deben ser almacenados de acuerdo con las orientaciones del fabricante.
- **Centrífugas serológicas:** utilizadas para evidenciar las reacciones de aglutinación provocadas por la reacción antígeno-anticuerpo. Deben contener compartimentos o soportes adecuados para que se ajusten perfectamente los tubos, las microplacas o las tarjetas, de tal manera que se garantice la velocidad de centrifugación adecuada para cada técnica utilizada.

Tabla 10. Control de calidad de potenciadores

Reactivo:.....	Fabricante:.....	Lote:.....	Fecha de caducidad:/...../.....							
Método en Tubo										
Anti-Suero	Sin potenciador						Con potenciador			
.....	TA	AGH	G.R. Ctl	AGH	G.R. Ctl					
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
RAI + Suero	0	0	1+	1+	---	---	3+	3+	0	0
RAI- Suero	0	0	0	0	2+	2+	0	0	2+	2+
Lote de GR	
Fecha de caducidad/...../.....			/...../.....	/...../.....	/...../.....	

- **Baño-María/Incubador de bloque seco:** el equipo es utilizado para incubación a 37 °C. Los Baño-María también se usan para pruebas de elución con temperaturas de hasta 56 °C. Deben poseer termómetros propios.
- **Pipeteadores automáticos electrónicos o no electrónicos:** son instrumentos utilizados para pipetear los reactivos en las pruebas inmunohe-matológicas. El volumen dispensado debe ser controlado para que las técnicas sean ejecutadas estrictamente.

Puntas y tubos tienen una función importante en la rutina diaria. La sugerencia es que sean desechables, de otra manera debe haber un control rígido sobre el proceso de limpieza y mantenimiento. Además, deben ser de plástico o vidrio transparente de buena calidad, y los tubos deben ser del mismo calibre. Puntas y tubos requieren ser validados en la rutina a fin de evitar interferencias en los resultados de las pruebas.

Antes de la implementación de un equipo o instrumento en la rutina, es conveniente conocer sus características básicas con el fin de evaluar sus prin-

cipales funciones, sobre todo las que puedan afectar directamente los resultados de las pruebas inmunohe-matológicas ejecutadas.

La Tabla 11 muestra los equipos e instrumentos básicos necesarios en un laboratorio de inmunohe-matología y las funciones que deben ser analizadas en la rutina del control de calidad.

Las temperaturas del baño maría, incubadoras de bloque seco y refrigeradores deben ser observadas y registradas diariamente en períodos determinados conforme las normas técnicas vigentes en cada país; lo anterior debe realizarse en formatos específicos con las informaciones básicas necesarias, como tipo de equipo, rango de temperatura de operación, periodicidad y responsable por la lectura. Se deben monitorear diferentes puntos del espacio interno de estos equipos a fin de garantizar que la temperatura sea la misma en todo el ambiente interno (Tabla 12).

No olvidarse del control de la temperatura ambiente del laboratorio, la cual puede interferir en los resultados de las pruebas inmunohe-matológicas.

Estos controles de temperatura pueden ser hechos por sistemas automatizados de control.

Tabla 11. Equipos y las funciones analizadas

Equipo	¿Qué debemos evaluar?
Refrigerador	Temperatura en diferentes puntos /Sistema de alarma
Centrífuga serológica / Centrífuga para tarjetas o microplacas	Rotación (RPM) /Tiempo de centrifugación
Centrífuga lavadora de células	Rotación (RPM) /Tiempo de centrifugación / Volumen de solución salina en los lavados y residual
Baño maría/ Incubador de bloque seco Pipeteador automático	Temperatura Volúmenes

Tabla 12. Formato de registro de temperatura - tabla mensual

Equipo – Baño maría				Rango de temperatura de trabajo – 37 °C				
Periodicidad – Cada 4 horas				Límite máximo y límite mínimo +/- 1°C				
May/13	7H	Resp.	11H	Resp.	15H	Resp.	19H	Resp.
1								
2								
30								

Mantenimiento preventivo y correctivo

Protocolos de mantenimiento preventivo y correctivo deben ser desarrollados para garantizar que los equipos trabajen continuamente. Estos procedimientos deben ser realizados de acuerdo con las recomendaciones existentes en el manual de operaciones de cada equipo.

Se debe elaborar un listado con el plan de mantenimiento preventivo anual que contemple el histórico de cada equipo, como: reparaciones, lubricaciones, ajustes y otros. Este histórico sumado a las recomendaciones contenidas en el manual técnico del equipo son los elementos decisivos para establecer la trazabilidad.

El mantenimiento preventivo consiste en someter el equipo a evaluaciones periódicas según criterios pre-determinados, y tiene como objetivo

conservarlo en las condiciones ideales de utilización, teniendo en cuenta la disminución de defectos y/o desgastes; la prolongación de su vida útil; la disminución de costos y riesgos, y la reducción de los mantenimientos correctivos (Tabla 13).

La Tabla 14 muestra el mantenimiento preventivo realizado mediante una lista de chequeo, la cual se compone de la evaluación de los principales parámetros del equipo.

La Tabla 15 muestra un modelo de formato para el mantenimiento preventivo, donde se definen el equipo, los parámetros y la periodicidad de la calibración (de acuerdo con las normas técnicas vigentes en cada país y/o el manual técnico del equipo), y la periodicidad del mantenimiento preventivo (de acuerdo con el fabricante o con la institución).

Tabla 13. Comparación entre mantenimiento preventivo y correctivo

Mantenimiento preventivo	Mantenimiento correctivo
Simple, mediante una lista de chequeo	Cuando el equipo tiene algún daño
Bajo costo	A veces necesita repuestos
Mejora el desempeño del equipo	Garantiza su funcionamiento

Tabla 14. Lista de chequeo

Equipo	Parámetros de la lista de chequeo
Refrigerador	Temperatura / Sistema de alarma / Funciones del panel / Iluminación / Sensores
Centrífuga serológica	Rotación (RPM) / Tiempo de centrifugación / Funciones del panel / Condiciones eléctricas / Sonidos
Centrífuga lavadora de células	Rotación (RPM) /Tiempo de centrifugación / Volumen de solución salina en los lavados / Funciones del panel / Condiciones eléctricas / Sonidos
Baño maría	Temperatura / Condiciones eléctricas / Termómetro
Centrífuga para tarjetas	Rotación (RPM) / Tiempo de centrifugación / Funciones del panel / Condiciones eléctricas / Sonidos
Incubador para tarjetas	Temperatura / Funciones del panel / Condiciones eléctricas
Pipeteador automático	Volumen y funciones para los pipeteadores automáticos

Tabla 15. Mantenimiento preventivo

Equipo	Calibración		Preventiva
	Periodicidad	Parámetros	Periodicidad
Centrífuga serológica	6 meses	RPM Tiempo	6 meses
Baño maría	6 meses	Temperatura	6 meses
Incubador	6 meses	Temperatura	6 meses
Pipetas de volumen variable	1 año	Volumen	1 año
Refrigerador	6 meses	Temperatura	3 meses

Frente a la adquisición de nuevos equipos hay que elaborarse un plan de calificación que debe ser registrado en un documento que contenga directrices como:

Plan de instalación. La instalación del equipo debe estar de acuerdo con las especificaciones del fabricante y atender las necesidades básicas, como por ejemplo el voltaje del equipo

Plan de operación. Se verifica la funcionalidad del equipo antes de la utilización en la rutina.

Evaluación de desempeño (Validación). Garantiza que el equipo se encuentre de acuerdo con lo esperado

frente a la demanda específica del servicio.

Glosario

El tema de este capítulo requiere presentar algunas de las definiciones importantes.

- **Especificidad:** La capacidad del reactivo de reaccionar selectivamente con el antígeno específico. Corresponde en la práctica al número de resultados negativos con muestras verdaderamente negativas.
- **Sensibilidad:** El límite establecido para detección de reacciones espe-

cíficas. En la práctica, es el número de resultados positivos, comparándose con las muestras verdaderamente positivas.

- **Título:** Una prueba que determina la concentración de anticuerpos presentes en el suero. Para estudiar el título se realizan diluciones seriadas del suero y se ponen a reaccionar contra un hematíe específico que contenga el antígeno correspondiente al anticuerpo que se encuentra en el suero. El título corresponde al inverso de la mayor dilución del tubo que reveló la aglutinación mayor o igual a 1+.
- **Avidez:** Intensidad y velocidad con que el anticuerpo hace aglutinar los glóbulos rojos.
- **Reproducibilidad:** El grado de concordancia entre los resultados obtenidos de las pruebas.
- **Estabilidad:** La capacidad que tiene un reactivo de mantener inalteradas sus características.
- **Calibración:** Conjunto de operaciones que establece condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento de medida o valores representados por una medida materializada o un material de referencia y los valores correspondientes a las establecidas por patrones estándar.
- **Instrumento:** Todo aparato utilizado para la realización de medición o estandarización, no considerado equipo, como pipetas, termómetros, etc.
- **Lote:** La cantidad definida de un producto con homogeneidad, pro-

ducido en un único proceso o serie de procesos.

- **Calificación:** Operaciones documentadas de acuerdo con un plan de pruebas predeterminados y criterios de aceptación definidos, las cuales garantizan que los proveedores de los insumos, equipos e instrumentos atiendan los requisitos especificados.
- **Trazabilidad:** La recuperación de un histórico por medio de registros, de un conjunto de procedimientos involucrados en determinado proceso, incluyendo los agentes ejecutores.
- **Registro:** Documento que presenta los resultados o la prueba de realización de una actividad.
- **Validación:** Evidencia documentada de que un procedimiento, proceso, sistema o método realmente conduce a los resultados esperados.

Referencias

1. Campos, Maria Manuel e Santos, Isabel Reis. Gestão do risco em medicina transfusional: modelos e ferramentas. Rev. Port. Sau. Pub. [online], 2010, vol. 28, n. 2, pp. 155-160. ISSN 0870-9025. Quality program implementation. Association Bulletin 97-4. Bethesda, MD: AABB, 1997.
2. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 6th ed, Council of Europe Publishing, 2000.
3. Harmening, Denise M. Técnicas modernas em Banco de Sangue e transfusão, 4ª ed, Editora Revinter, 2006.
4. Kalmin, N., Myers, L. K. Fisk, M. B. ISSO 9000 Model Ideally suited for quality management and quality assurance standards – guidelines for selection and use. Mild-

- waukee. WI: American Society For Quality Control, 1994.
5. Manual de Normas Técnicas, Administrativas y de Procedimientos para bancos de sangre. Resolución 901 de 1996. Ministerio de Salud; Colombia, 1996.
 6. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Portaria nº 1.353, de 13 de junho de 2011. Aprova o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 jun. 2011b. Disponível: <http://portal.anvisa.gov.br>
 7. Ministério da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº 57, de 16 de dezembro de 2010. Determina o Regulamento Sanitário para serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 dez. 2010c. Disponível: <http://portal.anvisa.gov.br>
 8. Organización Panamericana de la Salud. Estándares de Trabajo para Servicios de Sangre. 3 Ed., 2012.
 9. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. vol.24 no. 04 São José do Rio Preto Oct./Dec. 2002.
 10. Roback, John D., Grossman, Brenda J., Harris, Teresa and Hillyer, Christopher D. Technical Manual AABB. 17TH Edition, pp. 4-32; 967-974. ISBN 978-1-56395-315-6.
 11. Sibinga, S., Taswell, H. F., eds. Quality Assurance in Blood Banking and Its Clinical Impact, Martinus Nijhoff Publishers, 1984.
 12. Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 17th edition, American Association of Blood Banks, AABB, 2011.
 13. Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 28th edition, American Association of Blood Banks, AABB, 2012.

Inmunohematología básica y aplicada

Esta obra, escrita por un equipo de autores expertos y reconocidos, es la principal referencia en América Latina porque contiene lo que se necesita saber sobre la inmunohematología, en una forma unificada y consistente que no se encuentra en ningún otro texto.

Por su orientación científica, su directriz en los procesos de laboratorio y su aplicabilidad clínica, este libro proporciona una cobertura integral sobre la inmunohematología, acorde con la relevancia clínica de esta área crucial del cuidado del paciente.

GCIAMT

Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional



ISBN 978-958-46-4106-9



9 789584 641069