



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ENEP ZARAGOZA

10
29

**EFICIENCIA DE LA OPSONIZACION DE LOS
ANTICUERPOS ANTI - ERITROCITOS
DETECTADOS DURANTE LAS PRUEBAS
DE COMPATIBILIDAD PRE -
TRANSFUSIONAL**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARIA DE LOURDES CARCAMO MEJIA

México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

CAPITULO I. INTRODUCCION.....	1
Fundamentación de la elección del tema.....	3
Planteamiento del Problema.....	5
Objetivo.....	6
Hipotesis.....	7
CAPITULO II. ANTECEDENTES.....	8
La transfusión sanguínea.....	12
Uso de las transfusiones de glóbulos rojos.....	14
Hemorragia y Transfusión.....	13
Reacciones hemolíticas post-transfusionales.....	15
Pruebas de compatibilidad pre-transfusional y utilidad.....	19
Esquema de algunas reacciones realizadas en pruebas cruzadas como en este caso la técnica salina.....	21
Relacion entre las características inmunitarias de los anticuerpos y su efecto sobre los eritrocitos in "vivo".....	24
Pruebas de laboratorio útiles para aclarar la naturaleza de las reacciones por transfusión.....	25
CAPITULO III. GENERALIDADES.....	26
Multiplicidad de antígenos eritrocitarios en la sangre.....	26
Frecuencia encontrada de la capacidad inmunogenica de los antígenos eritrocitarios en orden decreciente en el Valle de México.....	28
Sistema Lewis.....	29
Sistema P.....	30
Los cinco fenotipos interrelacionados en el sistema P con sus correspondientes antígenos y anticuerpos.....	31

Sistema I.....	32
Sistema MNSs.....	33
Sistema Rh.....	34
Comparación de las nomenclaturas de race y Sanger y Wiener para el sistema Rh.....	36
Sistema Kidd, Kell, Duffy y Lutheran.....	37
Características principales de los sistemas de grupos sanguíneos Kidd, Kell, Duffy y Lutheran.....	38
Esquema de anticuerpos naturales, tanto de tipo regular como irregulares y anticuerpos inmunes.....	39
Sistema Fagocítico de células mononucleares.....	40
Metabolismo.....	42
Funciones.....	42
Inmunoglobulinas.....	43
Principales características de las inmunoglobulinas.....	45
inmunoglobulina IgG.....	46
Inmunoglobulina IgM.....	46
Inmunoglobulina IgA.....	46
Inmunoglobulina IgD.....	47
Inmunoglobulina IgE.....	47
Respuesta Inmune.....	48
respuesta inmuna primaria.....	49
respuesta inmune Secundaria.....	49
CAPITULO IV. MATERIAL Y METODOS	52
Determinación de fenotipos de los sistemas sanguíneos.....	45

A. Sistema Rh (C, \bar{c} , D, E, e).....	56
B. Le ^a , Le ^b , P, M, N.....	57
C. S, s, JK ^a , JK ^b , Fy ^a , Fy ^b , Di ^a , Lu ^a , K.....	58
Separación y preparación de monocitos.....	59
Viabilidad de Monocitos.....	64
Preparación de los complejos antígeno-anticuerpo para la formación de rosetas.....	66
Formación de rosetas.....	71
CAPITULO V. RESULTADOS.....	74
Discusion de resultados	79
CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....	85
CAPITULO VII. BIBLIOGRAFIA.....	86

CAPITULO I. INTRODUCCION.

La detección de anticuerpos anti - eritrocitos en las pruebas de compatibilidad pre - transfusional es siempre inquietante y motivo de selección rigurosa de la sangre para elegir la compatible. El descubrimiento de numerosos sistemas de grupos sanguíneos obliga a tomar alguna decisión respecto al criterio a seguir para la selección de sangre para transfusión (12).

En este trabajo se pretende encontrar alguna relación entre la capacidad opsonizante de los anticuerpos encontrados en transfusión sanguínea y la positividad encontrada en pruebas pre-transfusionales. Si hubiera una relación entre la capacidad opsonizante y el grado de hemólisis extravascular in vivo podríamos transfundir con poco riesgo eritrocitos incompatibles que si bien van a ser destruidos in vivo, cuando la capacidad opsonizante del anticuerpo fuera baja (formación de rosetas) quedaría un remanente de eritrocitos en el enfermo que le ayudarían en un momento crítico.

Cabe mencionar que la inducción de rosetas EA-monocitos en el Banco Central de Sangre del CMN se inició desde 1979 para tratar de establecer mejor la actividad in "vitro" de los anticuerpos detectados durante las pruebas de compatibilidad para la transfusión de eritrocitos, en un primer trabajo se hizo una estimación de la proporción porcentual de las rosetas formadas con anticuerpos detectados durante las pruebas de compatibilidad y las formadas por un anticuerpo anti - D de fabricación comercial.

En esta tesis el propósito fué continuar con el ensayo de esta técnica y mejorar su ejecución a fin de brindar una mejor información para hacer una estimación, la más aproximada, de la eficacia opsonizante de los anticuerpos o en otras palabras de la significación que tiene la prueba como índice de actividad hemolítica in "vivo"(12).

FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA.

Se ha observado durante muchos años que el resultado positivo en pruebas de compatibilidad pre - transfusionales han sembrado la duda acerca de la severidad de la hemólisis que pueda producirse en un paciente, es decir, en algunos casos los anticuerpos actúan a 37°C en el tubo, en otros lo hacen a 20 ó 4°C, particularmente estos últimos la mayoría de las veces no dan lugar a hemólisis, ésto ha motivado la conducta de que cuando se detectan anticuerpos fríos durante esta pruebas no se les dá importancia clínica y la sangre es transfundida con la seguridad de que no va a producirse hemólisis (1) .

Sin embargo, han sido reportados varios casos en los cuales los anticuerpos que actúan a 20 ó 4°C dan lugar a una hemólisis severa en el paciente. Generalmente los anticuerpos fríos han sido detectados contra los sistemas MN, P y Lewis, en cambio los anticuerpos que actúan a 37°C han sido detectados contra los sistemas Rh, Duffy, Kidd, Kell, etc., de modo que cuando se identifica alguna de estas especificidades en los anticuerpos, se deduce que son potencialmente hemolíticos.

En El Banco Central de Sangre del CMN se desarrollan técnicas de rosetas con monocitos que actúan contra el complejo formado por eritrocito - anticuerpo y cuya proporción de positividad varía según el tipo de anticuerpo que forma el complejo, siendo que ésta proporción se relaciona con la eficiencia de la opsonización, la cual

es atribuible a las inmunoglobulinas G_1 y G_3 que van a ser reconocidas por el macrófago y por lo tanto puede asumirse que van a ser fagocitadas (12, 13).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a los riesgos que representan las transfusiones sanguíneas, es necesario realizar la detección de anticuerpos anti - eritrocitos además de las pruebas de compatibilidad rutinarias, esto se manifiesta marcadamente en pacientes que han sido multitransfundidos, mujeres multíparas y pacientes que padezcan enfermedades de tipo inmunitario. En el Banco Central de Sangre del CMN se ha utilizado una técnica similar a la propuesta por Schanfield (13) y hasta el momento se han estudiado 41 muestras de sangre de pacientes con alo - anticuerpos anti - eritrocitos detectados durante las pruebas pre - transfusionales. Ahora bien se ha identificado un anticuerpo frío en dichas pruebas y existe la duda de que probablemente se trata de una Inmunoglobulina del tipo IgM, lo cual significaría que dudosamente puede llegar a producir hemólisis en el receptor en un momento dado, ésto puede considerarse sin importancia ya que es conocido que los anticuerpos de algunas especificidades como el P ó el anti - M no producen hemólisis de trascendencia clínica, sin embargo, existen algunos anticuerpos del sistema Rh como el anti - E que pueden dar lugar a una hemólisis severa.

Con las técnicas que se aplicaran durante el desarrollo de este trabajo se tratará de precisar "in vitro" la probable magnitud de la hemólisis que un anticuerpo específico puede causar con los eritrocitos sensibilizados con el anticuerpo específico y los monocitos (16), y evaluar la utilidad de la estimación de la eficiencia de los anticuerpos en opsonizar al eritrocito y poder deducir el grado de riesgo clínico de hemólisis pre - transfusional.

OBJETIVO

Caracterizar los diferentes anticuerpos detectados en pruebas de compatibilidad pre - transfusional, tanto los que actúan a 37°C, como los que actúan a 20°C ó 4°C, para hacer una estimación aproximada de la fagocitosis a que pueden dar lugar, (hemólisis extravascular), mediante rosetas EA - monocitos.

HIPOTESIS

El anticuerpo IgM, actúa mejor a 4°C, es generalmente aglutinante y puede fijar eficientemente el complemento, por lo tanto se cree que la fijación del complemento traerá como consecuencia la hemólisis de los eritrocitos.

CAPITULO II. ANTECEDENTES.

Las reacciones hemolíticas severas se han observado con anticuerpos anti - AB principalmente y eventualmente con anticuerpos de otras especificidades como Kidd, Duffy, Kell, Lewis, Diego, Lutheran, S, MN y P, estos anticuerpos han sido colocados por Mollison en un primer grupo (grupo I). La transfusión de glóbulos rojos que contiene alguno de estos antígenos pueden provocar una aloinmunización y por lo tanto la síntesis de anticuerpos específicos por el receptor, a estos anticuerpos se les denomina alo o iso-anticuerpos y al efectuar una segunda transfusión con la misma sangre pueden desarrollarse reacciones hemolíticas de pronóstico variable en el paciente (10).

Hay aloanticuerpos que han sido reportados como no clínicamente significativos (grupo II) y que están asociados con un acortamiento de la sobrevida de los eritrocitos tales como anti-Knops (Kn^a), York (YK^a), -Cost-Sterling (Cs^a), -Chido (Ch^a), -Rogers (Rg^a) y JMH. Otros anticuerpos se asocian ocasionalmente con una disminución de la sobrevida de los eritrocitos de significancia clínica, dentro de los cuales se encuentran; el anti-Cartwright (Yt^a) -Holley (HY^a), -Jacobs (Jr^a) y Sid (Sd^a), que pertenecen al grupo III. Aunque los eritrocitos sean serológicamente incompatibles en la prueba cruzada contra el suero conteniendo los anticuerpos de los grupos II y III, la mayoría de los pacientes con estos anticuerpos pueden ser transfundidos sin peligro con la prueba serológica incompatible y biológicamente " compatible " de los eritrocitos dado que la sobrevida no está acortada considerablemente (7, 13).

Se acepta que los anticuerpos anti - AB causan hemólisis por la activación del complemento por vía clásica, es decir, iniciada por la reacción antígeno-anticuerpo y la activación hasta C_9 .

También se sabe que los anticuerpos IgG_1 e IgG_3 son reconocidos por los receptores específicos para Fc de la membrana de los monocitos y que estos cuentan también con receptores para C_3b , C_4b y C_5a (3).

Los monocitos de sangre periférica son capaces de ingerir diversas clases de partículas; además se han intentado hacer investigaciones sobre los siguientes aspectos; 1) Interacción de monocitos con células rojas sensibilizadas con varios tipos de anticuerpos IgG; 2) Comparación de anticuerpos IgG contra IgM, 3) Fagocitosis de células rojas recubiertas de inmunoglobulinas no específicas y 4) El posible efecto de inhibición de la formación del complejo célula roja-anticuerpo-macrófago por la IgG o varias de sus fracciones adicionadas en el medio de incubación. Se encontró que las células rojas sensibilizadas con anticuerpos IgG pero no IgM son extensamente fagocitadas por estos monocitos en ausencia de la activación de los componentes del complemento; los experimentos con los fragmentos F(ab) de suero anti-Rh₀(D) indican que la fagocitosis solo depende de la fracción Fc y en cuanto a las diferentes subclases antigénicas de IgG se observó que difieren marcadamente en su capacidad inhibitoria. Específicamente se encontró que los anticuerpos IgG_1 e IgG_3 que se encuentran recubriendo eritrocitos son reconocidos por los monocitos a través de sitios receptores para Fc de las subclases IgG_1 e IgG_3 (8).

Cuando se detectan anticuerpos anti-eritrocitos fuera de la

especificidad ABO frecuentemente se plantea la duda de que teniendo características de IgM natural irregular activa solo a temperaturas abajo de 37°C (4°C ó 20°C) pudiera causar un grado de hemólisis en el paciente considerando los resultados de las pruebas de compatibilidad pre - transfusional (3, 5).

Se ha considerado a los monocitos sanguíneos como un monocito inmaduro del anteriormente llamado sistema retículo endotelial (SRE) y actualmente sistema fagocítico mononuclear.

Desde el punto de vista cuantitativo los monocitos se presentan en la circulación en cantidades que oscilan entre 3 y 7% del total de leucocitos, lo que constituye un número pequeño de células (17).

Las células mononucleares fagocíticas incluyendo los monocitos sanguíneos tienen diversas funciones en los procesos fisiológicos normales, tales como; 1) Funciones de defensa contra microorganismos 2) En los procesos de información antigénica, 3) Removiendo eritrocitos viejos y/o dañados, algunas de estas funciones requieren la ingestión de partículas como paso inicial (9, 20).

Se han descrito cinco ensayos cuantitativos provenientes de la función monocito-macrófago, estos ensayos comparan la actividad fagocítica del sistema monocito-macrófago y comprenden; 1) Quimiotaxis, 2) Opsonización, 3) Fagocitosis, 4) Inducción de la fagocitosis con estimuladores metabólicos y 5) Destrucción de material extraño.

La función monocito-macrófago se ha estudiado desde varios aspectos cada uno de los cuales puede cuantificarse, estas funciones son;

1) Movimiento de las células, 2) Adherencia de partículas a la superficie de estas células, 3) Estimulación del metabolismo intracelular, etc (17).

Por último se ha visto que la interacción in vitro entre los monocitos y los eritrocitos sensibilizados por anticuerpos IgG no fijadores de complemento se inhibe completamente al exponer previamente los monocitos a bajas concentraciones de IgG. Un dato controversial es el que la interacción entre los monocitos y los eritrocitos sensibilizados con IgG anti-A (ES-IgG anti-A) no se inhibe con IgG.

Existe un segundo factor que influye de manera importante en la inhibición por la IgG; el número de EA - IgG por monocito en el hombre.

Los fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos) son responsables de la destrucción in vivo de eritrocitos sensibilizados por alo ó autoanticuerpos IgG no fijadores de complemento (a esto se le llama hemólisis extravascular).(2).

LA TRANSFUSION SANGUINEA.

Landois, en 1875 notó que al mezclar los hematíes de un animal de una especie determinada con el suero de un individuo perteneciente a otra especie, con frecuencia ocurre aglutinación. Se aceptó que el fenómeno era semejante al que se observa cuando se mezclan bacterias con inmunosueros adecuados. Esta semejanza hizo pensar que la aglutinación de los eritrocitos se debía, como en el caso de las bacterias, a la unión de los antígenos presentes en su superficie, con los anticuerpos del suero. Sin embargo puede decirse que, de no existir ya un acervo importante de conocimientos sobre la inmunidad bacteriana, los principios fundamentales de la ciencia inmunológica podrían haberse sentado estudiando el comportamiento de los sistemas del suero y hematíes del hombre. Pero dado el adelanto de la inmunología bacteriana, estos conocimientos se pudieron aplicar directamente al conocimiento de la aglutinación de los glóbulos rojos.

La transfusión puede lograr ejemplos tangibles en un paciente anémico proporcionando eritrocitos, los cuales sobreviven temporalmente y funcionan en la circulación sanguínea del paciente aunque no sean propios. En teoría la transfusión de eritrocitos puede mejorar la anemia por dos mecanismos; primero, proporcionando eritrocitos viables y segundo suministrando factores hemopoyéticos de utilidad tardía, pero solo se emplea en el tratamiento de ésta, cuando no puede ser corregida por medio de la administración de hierro, extracto hepático u otros hematínicos.

Son seis los tipos principales de anemia que pueden necesitar de la transfusión sanguínea :

- 1 .- La anemia producida por hemorragia cuantiosa cuando es probable que esta se repita.
- 2 .- La anemia hemolítica.
- 3 .- La anemia aplástica (incluyendo además, la anemia refractaria y anemia de la leucemia).
- 4 .- Cualquier anemia severa presente en un enfermo que va a ser operado.

Transfundiendose principalmente paquete globular en las tres últimas y sólo en la primera sangre completa.

HEMORRAGIA Y TRANSFUSION.

Según la literatura, la primera transfusión a la que puede atribuirse resultados favorables para el enfermo fué realizada en un caso de hemorragia post - partum. Aún cuando la enferma recibió solamente ocho onzas de sangre en tres horas, sintió como si le hubieran infundido vida a su organismo (Blundell 1829). Actualmente todavía en los casos de hemorragia aguda es donde la transfusión produce sus efectos más dramáticos. El restablecimiento natural del volumen sanguíneo, después de la hemorragia aguda, es un proceso lento y rara vez es posible formarse una idea rápida y precisa sobre la cantidad de sangre que se ha perdido.

Durante los diez últimos años se han llevado a cabo varios estudios sobre el efecto de la pérdida brusca de sangre, producida por venopunción en voluntarios. Estos estudios proporcionan una información valiosísima sobre los efectos producidos en el hombre

por la simple hemorragia. Siempre que los glóbulos rojos sean compatibles persisten en el torrente circulatorio por un tiempo mayor que cualquiera otra de las sustancias transfundidas. Por ello es evidente que servirán para producir un aumento sostenido en el volúmen sanguíneo.

Desempeñaran además un papel importante si el volúmen eritrocítico del enfermo es muy bajo, ya que también aumentarán el poder de la sangre para acarrear oxígeno y aunque el volúmen sanguíneo puede ser restablecido rápidamente administrando sangre, suero, plasma o algún sustituto del plasma, la transfusión de eritrocitos es muy importante como transportador de oxígeno.

USO DE LAS TRANSFUSIONES DE GLOBULOS ROJOS.

Castellanos (1937) parece haber sido el primero en usar suspensiones concentradas de glóbulos rojos, en vez de la sangre total en la transfusión de enfermos con anemia. El empleo de tales suspensiones es lógico, ya que es importante introducir glóbulos rojos en la circulación de un enfermo con la menor modificación posible en el volúmen sanguíneo. Pero fueron otras las razones, sin embargo, las que determinaron el uso extenso de las suspensiones concentradas de glóbulos rojos. Durante la Segunda Guerra Mundial se necesitaban grandes cantidades de plasma, por lo que se tuvo la necesidad de separar este de los eritrocitos y salvar a estos para empleo posterior. Pero era grande el riesgo de contaminación de los glóbulos rojos al extraer el plasma por lo que se obligaba a usarlos dentro de las

primeras horas siguientes a su preparación. En la actualidad si la preparación se hace en sistema cerrado con bolsas de plástico el riesgo es casi inexistente, y además la extracción del plasma sobrenadante de una sangre previamente recogida en una solución de ácido-citrato-dextrosa, no afecta en forma adversa la preservación de los eritrocitos (Ross y otros 1947), en consecuencia, si se pueden eliminar riesgos de infección, los glóbulos rojos residuales pueden ser conservados por el mismo periodo de tiempo que la sangre total. En los hospitales actuales los paquetes eritrocitarios para transfusión sanguínea se emplean en un porcentaje muy alto (76%), ligeramente afectado por el tipo de hospital de que se trate, por ejemplo el Hospital de Traumatología utiliza los paquetes eritrocitarios en un porcentaje del 47%, y el Hospital de Oncología los utiliza en un 98%. Dado que la terapia transfusional es una terapia sustitutiva y lo que más se necesita en los pacientes es transporte de oxígeno, es fácil aceptar estas estadísticas con la ventaja de las razones de la Segunda Guerra Mundial el fraccionar la sangre, no solo beneficia al enfermo sino que los otros elementos sanguíneos como las plaquetas, leucocitos y plasma, pueden ser empleados para otros fines como la obtención (en caso del plasma) de albúmina humana y/o globulinas hiperinmunes.

REACCIONES HEMOLITICAS POST-TRANSFUSIONALES.

Dentro de las reacciones transfusionales se pueden anotar;alérgicas, febriles, y hemolíticas, las primeras se deben generalmente a la reacción antígeno-anticuerpo in vivo de anticuerpos contra globulinas,

principalmente la IgA, la segunda casi siempre por anticuerpos anti-leucocitos y/o plaquetas y la tercera como su nombre lo indica por anticuerpos anti-eritrocitos, por lo que la reacción hemolítica post-transfusional se puede definir como la situación resultante de una destrucción acelerada de los eritrocitos del donador o del receptor, consecutiva a la transfusión. La mayoría de las reacciones hemolíticas post-transfusionales se deben a incompatibilidad, pero la transfusión de sangre vieja conservada puede producir un cuadro similar. Más aún, el cuadro clínico de una reacción hemolítica puede presentarse después de la inyección de sangre ya hemolizada a consecuencia de, por ejemplo del calentamiento exagerado de la misma. Los signos físicos que pueden acompañar una transfusión incompatible severa pueden ser; sensación de hormigueo, el paciente tiritita, dolor de cabeza como si fuera a estallar, dolor constrictivo vascular, piel húmeda y fría, cianosis, pulso débil y lento e hipotensión. Puede aparecer ictericia, hematuria y finalmente oliguria o en los pacientes graves, anuria.

En forma alterna puede no haber síntomas físicos en el momento de la transfusión, esto constituye un grave peligro y en estas circunstancias puede transfundirse una cantidad considerable de sangre sin sospechar la incompatibilidad.

Ahora bien la concentración de anticuerpos, la clase de inmunoglobulinas, su capacidad para la fijación del complemento, la temperatura de la reacción y la concentración del antígeno (medida no solo por la concentración de eritrocitos inyectados, sino también

por el número de sitios antigénicos sobre la superficie celular), constituyen todos ellos, factores que tienen una influencia muy importante sobre la velocidad y el sitio de la destrucción de los eritrocitos incompatibles. Los anticuerpos que provocan hemólisis intravascular son principalmente IgM, estos anticuerpos activan el complemento. Los ejemplos más importantes de anticuerpos IgM e IgG que no activan al complemento son por ejemplo los del sistema Rh. Los eritrocitos no sensibilizados por los anticuerpos anti-Rh IgM son eliminados en forma predominante por el hígado, mientras que aquellos que fueron sensibilizados por los anticuerpos anti-Rh IgG son eliminados por el bazo.

Hay dos tipos de destrucción del eritrocito por anticuerpos específicos: Intravascular y Extravascular, por destrucción intravascular se entiende la ruptura de los eritrocitos en el torrente circulatorio con la consecuente liberación de hemoglobina en el plasma. En la destrucción extravascular, los glóbulos rojos desaparecen de la circulación al ser atrapados por el sistema fagocítico mononuclear y en este caso no hay liberación de hemoglobina en la sangre circulante. En la prueba cruzada de compatibilidad pre-transfusional se puede observar in "vitro" lo que ocurriría en la circulación del paciente cuando el suero del enfermo contiene el antígeno específico, estos se destruyen liberando hemoglobina. Sin embargo, a veces, se observa hemoglobinemia en sujetos cuyo suero ha mostrado ser incapaz in "vitro" de hemolizar los glóbulos rojos del donador. Aparentemente en esos casos, la hemoglobina,

derivada de los glóbulos rojos destruidos no puede ser convertida en bilirrubina con la misma rapidez con la que es liberada de los eritrocitos, por lo que si el ritmo de destrucción de los hematíes excede ciertos límites, se sobrepasa la capacidad normal del organismo para convertir la hemoglobina en bilirrubina y la hemoglobina pasa a la circulación general.

Para mantener un nivel elevado de seguridad en la transfusión tiene extraordinaria importancia; investigar la causa de toda reacción hemolítica post - transfusional. El hacerlo presenta dificultades de dos órdenes, en primer lugar hay gran número de reacciones post - transfusionales de naturaleza hemolítica que no se acompañan de signos clínicos obvios de destrucción sanguínea. En efecto, puede presentarse simplemente ligera fiebre y elevación de la hemoglobina mucho menor que la esperada; en consecuencia muchas de las reacciones hemolíticas pueden pasar inadvertidas debido a que las reacciones febriles ligeras se presentan con frecuencia después de transfusiones de sangre compatible ya que frecuentemente, es difícil la interpretación de los cambios pequeños en las concentraciones de hemoglobina en la sangre.

La segunda dificultad importante con que se tropieza al investigar las reacciones hemolíticas es la ausencia común de falta de fuentes importantes de información, sea por remoción o por ocultamiento.

El establecimiento del diagnóstico de una reacción hemolítica post - transfusional consta de dos partes:

- 1 .- La demostración de que existe destrucción sanguínea acelerada.
- 2 .- La demostración de la causa de esa destrucción sanguínea.

PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD PRE-TRANSFUSIONAL Y UTILIDAD.

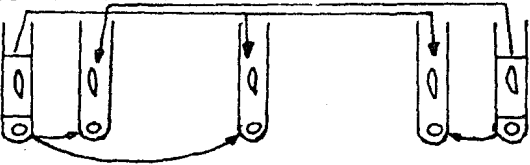
Las pruebas de compatibilidad pre-transfusional son aquellas que se efectúan en la sangre del receptor y del donador previas a la transfusión de sangre, estas son determinación de grupo sanguíneo del sistema ABO, grupos sanguíneos Rh_o(D), pruebas cruzadas de compatibilidad y en caso necesario investigación de anticuerpos irregulares fuera del sistema ABO.

La determinación de grupo sanguíneo ABO debe constar de la prueba directa en la que se investiga el antígeno (aglutinógeno) existente en los eritrocitos y la prueba inversa que define el anticuerpo natural regular y que es sumamente útil para comprobar el grupo sanguíneo.

La determinación de la presencia del antígeno Rh_o(D) debe constar de la prueba en sí y de un autocontrol de la sangre del enfermo para evitar confusiones de autoaglutinación. La prueba cruzada de compatibilidad es aquella que nos permite determinar la ausencia ó presencia en la circulación del paciente o del donador de un anticuerpo ó anticuerpos específicos contra los eritrocitos del paciente y/o del donador, esto se consigue mezclando a temperatura y medios adecuados el suero del paciente con los eritrocitos del donador (prueba mayor) y viceversa (prueba menor). Aquella prueba que no presente ni aglutinación ni hemólisis a 37°C de los eritrocitos, se dice que es compatible. Lo más importante es asegurarse de que el suero del receptor no contiene isoanticuerpos capaces de reaccionar con los hematíes a transfundir, lo cual se hace en la prueba cruzada mayor. En segundo lugar, pero a veces de

gran importancia, comprobar mediante las pruebas cruzadas menores, la ausencia en el plasma transfundido de isoaglutininas capaces de reaccionar con los hematíes del receptor. Es esencial que las pruebas tengan capacidad para detectar los anticuerpos IgM e IgG (cuadro 1).

CUADRO 1 . ESQUEMA DE ALGUNAS REACCIONES REALIZADAS EN PRUEBAS CRUZADAS COMO EN ESTE CASO LA TECNICA SALINA.

RECEPTOR	AUTOCONTROL	DONADOR	REACCION	TEMPERATURA	Ig	ANTICUERPO	SISTEMA
			SALINA RAPIDA	22°C	IgM	ANTI - A y/o B	A B O
			S A L I N A	37°C	IgM	ANTI - S	MNSs
PRUEBA		PRUEBA	SALINA	37°C	IgG	ANTI - D	Rh - Hr
CRUZADA		CRUZADA	SEGUIDA DE	37°C	IgG	ANTI - c	Rh - Hr
MENOR		MAYOR	C O O M B S	37°C	IgG	ANTI - Fy ^a	D U F F Y

Después de 15 años de que Landsteiner descubrió el sistema ABO de la sangre en 1901, se aceptó en forma general que la tipificación de sangre y la prueba cruzada de compatibilidad constituyen requisitos previos esenciales para la transfusión sanguínea. La prueba cruzada es indispensable para ratificar los grupos sanguíneos del sistema ABO, ésta simple prueba ha salvado a cientos de personas previamente incorrectamente tipificadas para este sistema, esta prueba para estos fines, no debiera ser soslayada en la inmensa mayoría de las transfusiones. Pero a pesar de que estas pruebas previenen las reacciones transfusionales más serias como las del sistema anteriormente mencionado, tratándose de otros sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios la aparente compatibilidad serológica entre el donador y la sangre del receptor in "vitro" algunas veces no es garantía de la supervivencia normal de los eritrocitos transfundidos en la circulación del receptor. La prueba cruzada generalmente solo detecta la reacción antígeno-anticuerpo entre los eritrocitos del donador y anticuerpos presentes en el receptor, ellas no previenen que una transfusión de eritrocitos estimule al receptor sensibilizandolo y causando subsecuente producción de anticuerpos, ni predice reacciones post-transfusionales en las que la transfusión estimula la reaparición de anticuerpos en respuesta a una estimulación anteriormente no detectada. Con el descubrimiento de numerosos sistemas de grupos sanguíneos y la posibilidad de cientos de combinaciones, debe tomarse una decisión respecto a que sistema será tomado en consideración para la selección

de sangre para transfundir. La experiencia ha demostrado que es esencial tipificar a los donadores y receptores para los sistemas ABO y Rh₀(D), dado que en el primer sistema se encuentran anticuerpos naturales regulares y del segundo se sabe que es el antígeno (después del A, B) con mayor capacidad antigénica que los otros antígenos eritrocitarios.

Al escoger para transfundir la sangre, debe tomarse en cuenta tres importantes posibilidades:

- 1 .- La posible sensibilización por un antígeno presente en la sangre del donador, pero que falta en el paciente.
- 2 .- La probable incompatibilidad debida a la presencia de un anticuerpo ya formado en el plasma del receptor.
- 3 .- La destrucción de los eritrocitos del propio receptor por algún anticuerpo incompatible presente en el donador.

Estos puntos deben ser considerados además de las pruebas fundamentales (cuadro 3).

A continuación se ilustra en el cuadro 2 la relación entre las características serológicas de los anticuerpos y su efecto sobre los eritrocitos incompatibles in vivo.

CUADRO 2. RELACION ENTRE LAS CARACTERISTICAS SEROLOGICAS DE LOS ANTICUERPOS Y SU EFECTO SOBRE
LOS ERITROCITOS INCOMPATIBLES "IN VIVO". (15).

CARACTERISTICAS SEROLOGICAS	E J E M P L O S	CLASE DE Ig	DESTRUCCION IN VIVO	EJEMPLOS DE VEL. DE DESTRUCCION IN VIVO
HEMOLITICOS RAPIDOS	ANTI - A ANTI - B	IgM ^e IgG	PRIMORDIALMENTE IN- TRAVASCULAR	RAPIDA, P.EJEMPLO EL 90% EN 2 MIN, DE PEQUEÑOS VOLUMENES DE GR. EL 50% EN 2 MIN DE VOLUMENES GRANDES.
HEMOLITICOS LENTOS	ANTI - Le ^a ANTI - Le ^b	IgM	EXTRAVASCULAR (AL- GUNOS INTRAVASCULAR)	LENTA, P.EJEMPLO EL 60% EN 4 MIN, DE -- PEQUEÑOS VOLUMENES DE GR.
AGLUTINANTES FIJADORES DE COMPLEMENTO	ANTI - P ₁ (SI SON ¹ POTENTES)	IgM	EXTRAVASCULAR (PRE DOMINIO EN HIGADO)	EL 25 % EN 2 MIN. (1 ML DE ERITROCI- TOS).
AGLUTINANTES NO FIJADORES COMPLEMENTO	ANTI - Rh (D,E, etc..)	IgM	EXTRAVASCULAR (PRE DOMINIO EN HIGADO)	ANTI - E, 50% DE 1 ML DE ERITROCITOS EN 2 - 3 MIN.
INCOMPLETOS FIJADORES DE COMPLEMENTO	ANTI - JK ^a (ALGUNOS ANTI-Fy ^a y ANTI - K)		INTRAVASCULAR	ANTI-Fy ^a , FIJADORES DE COMPLEMENTO, EL 50 % EN 4 - 6 MIN.
INCOMPLETOS NO FIJADORES DE COMPLEMENTO	ANTI - Rh (D, etc..)	IgG	EXTRAVASCULAR (PRE DOMINIO EN BAZO)	ANTI-D NO FIJADORES DE COMPLEMENTO, VOL UMENES PEQUEÑOS: 50 % EN UNA HORA, VOLU MENES GRANDES EN 14 HORAS.

CUADRO 3. PRUEBAS DE LABORATORIO UTILES PARA ACLARAR LA NATURALEZA DE LAS REACCIONES POR TRANSFUSION.

ELEMENTO NECESARIO		TIEMPO OPTIMO PARA ANALISIS DESPUES DE LA REACCION			
RECEPTOR	DONADOR	P R U E B A	DESDE	HASTA	UTIL PARA DETERMINAR
PRUEBAS FUNDAMENTALES					
MUESTRA DE SANGRE ANTERIOR A LA TRANSFUSION	TUBO PILOTO (RESTOS DE SANGRE EN EL PACIENTE)	TIPIFICACION DE ABO Y Rh.	INMEDIATAMENTE		ERRORES TECNICOS O BUÑOS CRATICOS.
MUESTRA ANTERIOR A LA TRANSFUSION	TUBO PILOTO	CRUZADA	"		ERRORES DE INCOMPATIBILIDAD.
	RESTOS DE SANGRE EN EL RECIPIENTE.	ESTUDIO BACTERIOLOGICO (CULTIVOS)	"	\	CONTAMINACION BACTERIANA
MUESTRA POSTERIOR A LA TRANSFUSION					
A) CITRATADA U OXALATADA		EXAMEN MICROSCOPICO.	"	6-12 h.	PRESENCIA DE GRUMOS.
B) SUSPENSION DE HEMATIES		DIRECTA DE ANTIGLOBULINA	"	12-48h.	GR. CUBIERTOS DE AC.
C) PLASMA O SUERO		HEMOGLOBINA	"	48 h.	HEMOGLOBINEMIA (HEMOLISIS INTRAVASCULAR).
D) S U E R O		BILIRRUBINA INDIRECTA	24 hrs.	72 h.	HIPERBILIRRUBINEMIA POR HEMOLISIS.
E) SUERO Y ORINA		UREA O NPN A) Hb B) VOLUMEN	36 hrs. INMEDIATAMENTE "	48 h.	AZOEMIA HEMOGLOBINURIA. OLIGURIA.

CAPITULO III. GENERALIDADES.

MULTIPLICIDAD DE ANTIGENOS ERITROCITARIOS EN LA SANGRE.

Las sangres se dividen en diversos grupos y tipos eritrocitarios según los antígenos existentes en las células, sangres de los grupos A, B, O, AB, etc.

Una persona no forma anticuerpos inmunes contra los antígenos de sus propias células, pero si se inyectan células de una persona a otra, factiblemente se desarrollaran anticuerpos contra los antígenos de los que carezca el receptor. Las sangres se agrupan y clasifican fundandose en los tipos principales de antígenos de los eritrocitos, por fortuna muchos antígenos son comunes a muchas personas (ver cuadro 7).

En la membrana de los glóbulos rojos humanos, se han descubierto cuando menos 30 antígenos frecuentes, cada uno de los cuales puede causar ó aloinmunización ó reacciones de tipo antígeno-anticuerpo. Además de éstos, se han descrito antígenos menos frecuentes, observados en familias más bien que en grupos amplios de personas. Entre los 30 antígenos más frecuentes, algunos son fuertemente antigénicos y causan inevitablemente inmunización ó reacciones transfusionales si no se toman las precauciones adecuadas, otros tienen importancia sobre todo para estudios de herencia de genes, y por lo tanto, para establecer paternidad, raza, etc. Estos antígenos normalmente no causan graves problemas.

Son sobre todo dos grupos de antígenos los que mayor tendencia tienden a causarlos, uno es el denominado sistema ABO y el otro el

sistema Rh - Mr.

Existen otros antígenos eritrocitarios que raramente causan problemas transfusionales y por lo tanto, solo tienen importancia teórica y médico legal. Algunos de tales factores sanguíneos son por ejemplo MN, P, Lewis, etc., en contraste los antígenos Kell, Duffy, Diego y Lutheran, en ocasiones, pueden dar lugar a la formación de anticuerpos específicos en el receptor y al efectuar una segunda transfusión con la misma sangre pueden desarrollarse reacciones hemolíticas. Sin embargo, estos antígenos no presentan la misma capacidad antigénica que los A, B, Rh₀(D), \bar{c} , E, etc., por lo que la frecuencia de anticuerpos formada contra ellos es menor que la formada con los antígenos anteriormente mencionados.

La capacidad inmunogénica de los antígenos eritrocitarios en orden decreciente se describe en el cuadro 4.

CUADRO 4 . FRECUENCIA ENCONTRADA DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA DE
 LOS ANTIGENOS ERITROCITARIOS EN ORDEN DECRECIENTE EN
 EL VALLE DE MEXICO.

=====		
ESPECIFICIDAD	F R E C U E N C I A	%
A N T I	PACIENTES	DONADORES

D	1.5144	0.3788
E	1.9291	0.0022
c	1.7362	0.0136
C	0.3569	0.0410
M	0.1543	0.0159
N	0.1253	0.0068
S	0.3858	0.0114
P	1.4083	0.0844
Kell	0.4437	0.0091
Le ^a	1.9195	0.3377
Le ^{a+b+}	1.2925	0.1848
Di ^a	0.2315	0.0068
=====		

SISTEMA LEWIS.

Estos antígenos se encuentran principalmente en forma soluble en los fluidos orgánicos y se adhieren a los eritrocitos dotándolos de los antígenos Le^a y Le^b , dos determinantes antigénicos bien definidos. Los anticuerpos de producción natural irregular bastante comunes contra estos antígenos son el anti- Le^a y el anti- Le^b , producidos principalmente por sujetos del fenotipo $A_1 Le (a^- b^-)$. Casi todos los ejemplos de estos anticuerpos son de la clase IgM por lo cual no cruzan la placenta durante el embarazo. Si lo hicieran, la destrucción de los eritrocitos del producto sería muy poco probable ya que los glucoesfingolípidos de la sustancia Lewis están muy mal desarrollados durante la vida fetal.

Algunos anticuerpos de Lewis (particularmente el anti- Le^a) a veces fija complemento, y por lo tanto el anti- Le^a en ocasiones es la causa de una reacción transfusional hemolítica intravascular. Sin embargo, el plasma de los donadores $Le (a+)$ por lo general contiene suficiente antígeno Le^a soluble para neutralizar el anti- Le^a del paciente antes de que pueda atacar los eritrocitos vulnerables. Sin embargo, los pacientes cuyo plasma contiene anti- Le^a que hemoliza fuertemente los eritrocitos $Le (a+)$ o los aglutina a temperaturas superiores a $30^{\circ}C$, deberán recibir preferentemente sangre de donadores $Le (a^- b^-)$. El anti- Le^b generalmente no constituye un riesgo para la transfusión.

SISTEMA P.

Los productos del gen son glucosiltransferasas, que fijan D-galactosa-N-acetil-D-galactosamina ó N-acetil-D-glucosamina a glucoesfingolípidos sobre la membrana de los eritrocitos.

P_1 y P, los principales determinantes antigénicos, fueron anteriormente mencionados considerados como la expresión de dos genes alelicos en el mismo locus, en el cuadro 5 se describe la frecuencia de fenotipos P en la población.

P_1 es el fenotipo más común en la mayoría de las poblaciones, mientras que los individuos P_1 negativo casi siempre tienen el tipo $P_2 \cdot P_1^k$, P_2^k y son fenotipos sumamente raros, pero son clínicamente importantes, estando asociados con la presencia de un caso natural de anticuerpos con fuerte actividad hemolítica. Por otra parte el anti- P_1 que con frecuencia ocurre en personas de tipo P_2 , virtualmente nunca es capaz de causar destrucción de eritrocitos, las excepciones son aquellos raros ejemplos que reaccionan intensamente con eritrocitos P_1 in vitro a 30°C ó más.

CUADRO 5. SE MUESTRAN LOS CINCO FENOTIPOS INTERRELACIONADOS EN ESTE SISTEMA CON SUS CORRESPONDIENTES ANTIGENOS Y ANTICUERPOS.

FENOTIPO	FRECUENCIA APROXIMADA	ANTIGENOS SOBRE LOS ERITROCITOS	ANTICUERPOS EN EL PLASMA
P_1	más de 80%	P_1, P	*****
P_2	*****	P	anti-P (con frecuencia natural irregular)
P_1^k	muy raro	$P_1, *P^k$	anti-P
P_2^k	"	$*P^k$	anti-P
P	"	*****	anti- $P_1 p p^k$

* p^k . También está presente en estos eritrocitos pero no es descubierto ordinariamente por los métodos serológicos de rutina.

SISTEMA I.

Los determinantes antigénicos I e i son bastante heterogéneos, su herencia no esta bien definida, pero se sabe que están bioquímicamente relacionados con los antígenos H, A, B, Le y P. La mayoría de las personas heredan un gen asociado con la producción de antígeno I, pero los eritrocitos de los recién nacidos reaccionan muy débilmente con anti-I y fuertemente con anti-i. Se produce una inversión gradual del primer año al segundo, de modo que en los niños de mayor edad y adultos, la actividad I de los eritrocitos excede mucho a la actividad i, más del 99% de los individuos adultos poseen el antígeno I en sus eritrocitos.

Con respecto a los anticuerpos producidos en este sistema el anti-I es un anticuerpo común, encontrado con frecuencia como una débil aglutinina en frío sin interés clínico. En pacientes con anemia hemolítica autoinmunitaria del tipo frío, los anticuerpos casi siempre tienen especificidad anti-I ó anti-i y la mayoría de ellos pertenecen a la clase IgM. La producción de anti- i se asocia principalmente con enfermedades de las células linfoides en especial, mononucleosis infecciosa y linfosarcoma. Cuando se requieren transfusiones no hay problema para encontrar sangre serológicamente compatible ya que los eritrocitos de la mayoría de los adultos son esencialmente i negativo. Incluso en los pacientes con fuertes anticuerpos anti - I de reacción en frío no fijadores de complemento no es difícil hacer una transfusión sin riesgo, si se les mantiene calientes durante el paso de la sangre. Sin embargo hay anticuerpos

anti- I que frecuentemente fijan complemento, en estos casos el enfermo debe ser transfundido con sangre I negativo (1 en 50,000 Mollison).

SISTEMA MNS.

Los principales antígenos se heredan dando cuatro diferentes fenotipos, M, N, S y s, se heredan como si fueran el resultado de cuatro distintos genes alélicos que determinan cuatro pares de antígenos: MS, Ms, NS y Ns. Los residuos de ácido sialico en la glucoproteína de los eritrocitos están al parecer relacionados con la especificidad M y N ; S y s no están definidos bioquímicamente. Los anticuerpos anti-M y anti - N son por lo general aglutininas IgM de presentación natural irregular con escasa capacidad para destruir eritrocitos, los pacientes en diálisis renal a largo plazo tienden a formar anti - N ya sea como auto ó aloanticuerpo. En pacientes de los tipos N ó MN, los autoanticuerpos N específicos no son hemolíticos pero se dice que causan rechazo de los riñones transplantados cuando estos se mantienen en refrigeración antes del trasplante.

La formación de anti- S ó anti - s requieren por lo general el estímulo de la transfusión o el embarazo y debido a ello estos anticuerpos pertenecen con frecuencia a la clase IgG. Un tercer anticuerpo, anti - U, se comporta serológicamente como anti - S más anti - s, siendo formado por sujetos de raza negra sensibilizados, cuyos eritrocitos tienen un raro fenotipo que carece de antígenos

S y s. Esos tres anticuerpos pueden hemolizar in "vivo" eritrocitos incompatibles, pero son fácilmente identificables mediante pruebas de compatibilidad.

SISTEMA Rh

Hay alguna evidencia bioquímica de que los determinantes antigénicos Rh dependen de la interacción entre las proteínas de la membrana eritrocítica y moléculas de fosfolípidos. Serológicamente se han descrito 100 fenotipos Rh, pero se desconoce la genética bioquímica subyacente. Resulta conveniente considerar a un grupo de nucleótidos en un locus que se sabe se encuentran en el cromosoma número uno como el que dicta la estructura de un juego de tres determinantes alélicos: C ó \bar{C} , E ó e y D ó d (este último no tiene un anticuerpo correspondiente, y es por lo tanto simplemente la ausencia de D). Estos conjuntos son entonces heredados de cada progenitor como una unidad, tal como CDe, cde, cDE, etc. Esta nomenclatura, usada por Race y Sanger, es comparada con la nomenclatura alterna de Wiener, como se ilustra en el cuadro 6.

El antígeno D (Rh_0) es el más inmunógeno de éste o cualquier otro sistema de grupos sanguíneos (excepto aquellos sistemas previamente descritos en los cuales la formación de anticuerpos no depende de la exposición a eritrocitos que contienen antígenos que no se poseen, si no aparentemente al contacto con productos naturales que comparten antígenos humanos).

Los antígenos Rh, C, \bar{c} , E y e son considerados menos inmunógenos que D,

y resulta difícil tratar de identificar en las prácticas rutinarias estos antígenos en donador y receptor. Una proporción de pacientes con anemia hemolítica adquirida de tipo caliente tienen anticuerpos IgG que reaccionan con uno ó más antígenos asociados al Rh. En algunos casos la especificidad es clara (por ejemplo anti - e), pero con mayor frecuencia los anticuerpos reaccionan con todos los eritrocitos y menos con aquellos del raro tipo conocido como Rh nulo. Estos glóbulos rojos carecen de antígenos Rh conocidos y la membrana eritrocítica es defectuosa, reforzando el concepto de que en los eritrocitos normales, las moléculas que llevan los determinantes Rh son parte de la estructura protéica de la membrana.

CUADRO 6. COMPARACION DE LAS NOMENCLATURAS DE RACE Y SANGER Y WIENER PARA EL SISTEMA Rh.

A L E L O	RACE Y SANGER	W I E N E R
R ¹	D, C, e	Rho, Rh', hr''
r	\bar{c} , e	hr', hr''
R ²	D, \bar{c} , e	Rho, hr', rh''
R ⁰	D, \bar{c} , e	Rho, hr', hr''
r''	\bar{c} , E	hr', rh''
r'	C, e	rh', hr''
R ^z	D, C, E	Rho, rh', rh''
R ^y	C, E	rh', rh''

SISTEMA KIDD, KELL, DUFFY Y LUTHERAN

De estos factores sanguíneos el Kell es el más antigénico y el de menor antigenicidad es el Kidd, el factor Duffy (Fy^a) es solo debilmente antigénico y por tanto es poco frecuente encontrar los anticuerpos correspondientes, sobre todo en lo que concierne al alelo Fy^b . Se ha establecido que hay considerables variaciones raciales respecto a los factores Kell, Duffy y Kidd, se han hecho estudios familiares en los cuales se ha demostrado que dichos factores se heredan según la genética mendeliana y que son independientes de los demás sistemas de grupos sanguíneos (ver cuadro 7).

El anti - Kell y anti - Fy^a son anticuerpos aloinmunes frecuentemente capaces de destrucción importante de eritrocitos que contienen el antígeno específico. Son aún más peligrosos los anticuerpos del sistema Kidd, tanto anti - Jk^a como anti - Jk^b , ya que son notoriamente difíciles de descubrir. Siempre que un paciente tiene una reacción hemolítica después de la transfusión de sangre aparentemente compatible para las habituales pruebas de laboratorio, es factible que la causa sea la presencia del anti - Jk^a .

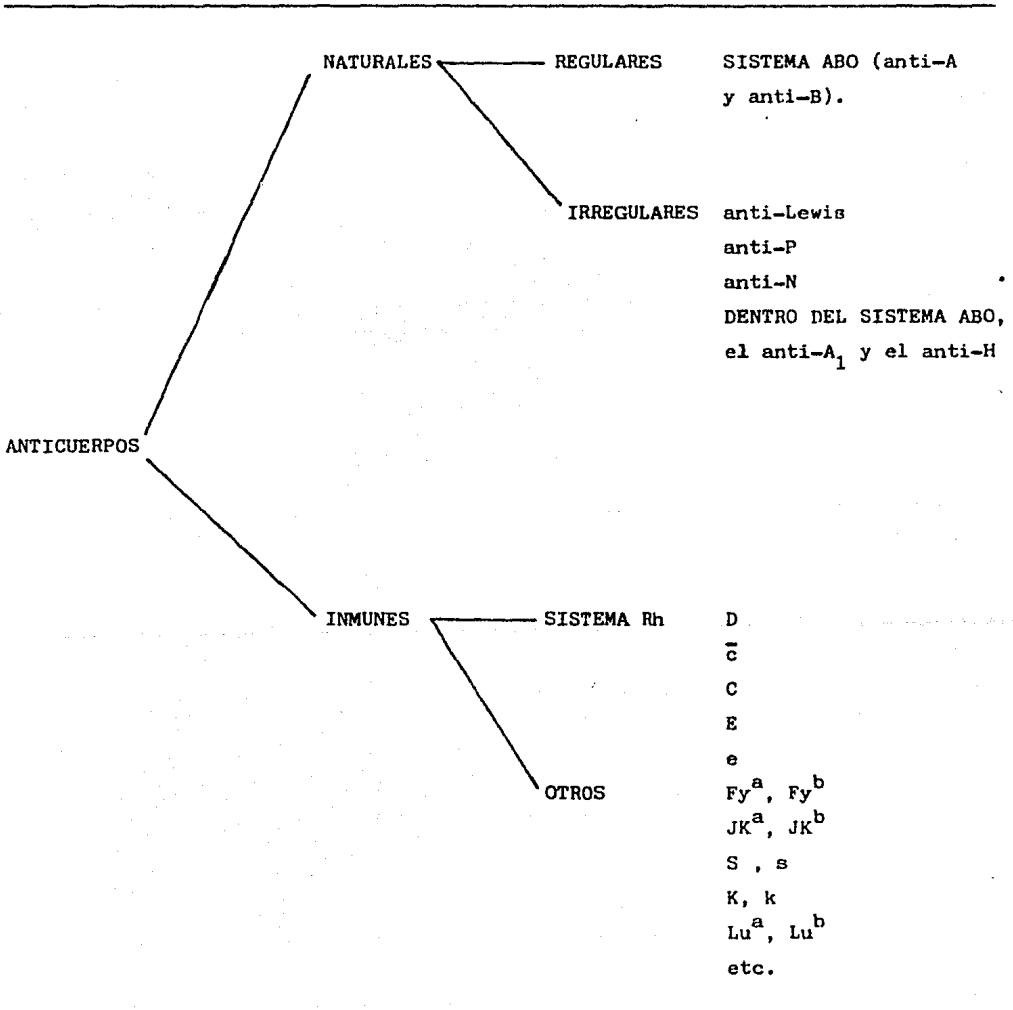
En el sistema Lutheran, los anticuerpos rara vez son la causa de destrucción de eritrocitos, pero si un paciente tiene anticuerpos anti - Lu^b que reaccionen fuertemente mediante la técnica indirecta de antiglobulina, la transfusión con sangre Lu^b positiva es muy rara, tales pacientes son un problema para transfundirse.

CUADRO 7. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LOS SISTEMAS DE GRUPOS SANGUINEOS

KIDD, KELL, DUFFY, LUTHERAN, MNS.

SISTEMA	ANTIGENOS PRINCIPALES	FENOTIPOS
Kidd	JK^a, JK^b	$JK (a^+ b^-)$ $JK (a^- b^+)$ $JK (a^+ b^+)$
Kell	K, k, J_s	$K^- k^+ J_s (a^-)$ $K^- k^+ J_s (a^+)$ $K^+ k^- J_s (a^-)$ $K^+ k^+ J_s (a^+)$
Duffy	Fy^a, Fy^b	$Fy (a^+ b^-)$ $Fy (a^- b^+)$ $Fy (a^+ b^+)$ $Fy (a^- b^-)$
Lutheran	Lu^a, Lu^b	$Lu (a^+ b^-)$ $Lu (a^+ b^+)$ $Lu (a^- b^-)$
MNSs	S, s	$S^- s^+$ $S^+ s^-$ $S^- s^-$ $S^+ s^+$

CUADRO 8. ESQUEMA DE ANTICUERPOS NATURALES, TANTO DE TIPO REGULAR COMO IRREGULARES Y ANTICUERPOS INMUNES.



SISTEMA FAGOCITICO DE CELULAS MONONUCLEARES.

El sistema fagocítico de mononucleares está formado por una línea de células que tienen su origen en la médula ósea; la célula de este grupo identificable morfológicamente es el promonocito que se observa en escaso número en los frotis de médula ósea. En contraste con lo que sucede con los granulocitos, no existe en la médula ósea una reserva apreciable de monocitos. El monocito se encuentra en sangre periférica y al pasar a los tejidos, donde transcurre la mayor parte de su vida, se transforma en macrófago. Existen una serie de estímulos que incluyen endotoxinas, que inducen al monocito a transformarse en macrófago. En sangre periférica el monocito puede fagocitar bacterias y otras partículas, pero con menos eficiencia que los polimorfonucleares, los cuales son fagocitos más activos, pero de vida muy corta. Cuando en los tejidos el monocito se transforma en macrófago, aumenta su tamaño y hay un evidente incremento en el número de lisosomas y mitocondrias y adquiere así las características de los macrófagos tisulares. Los términos macrófago e histiocito, son sinónimos. La serie de células histiocitarias comprenden desde los precursores en la médula ósea, monoblastos y promonocitos, hasta el macrófago maduro tisular. Los macrófagos tisulares pueden diferenciarse en inmaduros que conservan capacidad de multiplicación y los macrófagos maduros que son células terminales que ya no se dividen. Ambas formas pueden adoptar varios tipos morfológicos, incluyendo las de macrófago peritoneal, macrófago alveolar, las células gigantes de los granulomas

y probablemente, células de Kupffer del hígado.

Coincidentemente con la maduración, las células mononucleares fagocíticas desarrollan características específicas que incluyen capacidad fagocítica, adhesividad a superficies cargadas, receptores para Fc de inmunoglobulinas G (IgG₁, IgG₃) y complemento (C₃b, C₄b, C₅a) y para complejos inmunes en la superficie de la membrana. Forman rosetas con eritrocitos recubiertos de anticuerpos IgG y son capaces de sintetizar componentes del complemento, transferrina, interferón, pirógeno endógeno y factor estimulante de las colonias, así como también la capacidad para interactuar con los linfocitos en el proceso de síntesis de anticuerpos, ya que son las células encargadas de procesar inicialmente el antígeno.

Los monocitos y los granulocitos tienen un precursor común. No se conoce la relación entre las células de la serie monocito-macrófago y las células reticulares que también forman parte del sistema reticuloendotelial (SRE); sin embargo, el macrófago y las células reticulares se asemejan en su contenido de esterasa y fosfatasa ácida.

En respuesta a la pinocitosis de las proteínas del suero ó a la ingestión de material extraño, los monocitos crecen y sintetizan cantidades cada vez mayores de enzimas lisosómicas y se transforman así en fagocitos más activos llamados macrófagos. En todas sus localizaciones tisulares los macrófagos mantienen su capacidad para dividirse.

METABOLISMO.

La energía necesaria para la actividad fagocítica de los monocitos del mamífero proviene de la glucólisis y lo mismo ocurre en el macrófago tisular. Los macrófagos son efectivos fagocitos aún en condiciones anaerobias con excepción del macrófago alveolar; este último depende de una presión parcial de oxígeno mayor de 25mmHg para la fagocitosis y la producción de energía.

FUNCIONES.

La línea de células mononucleares fagocíticas tienen tres funciones bien definidas: Intervenir en las reacciones de defensa contra microorganismos; remoción de células lesionadas o de desechos celulares y finalmente interacción con células linfoides en las fases iniciales de las reacciones inmunológicas.

Los fagocitos mononucleares constituyen el principal sistema celular de defensa contra bacterias y hongos intracelulares. Por ejemplo, tiene acción bactericida ó limitan el crecimiento de bacterias y parásitos como: Salmonella, Listeria, Cryptococcus, Toxoplasma y Plasmodium y probablemente Brucella.

La capacidad fagocítica de los monocitos humanos es menor que la de los neutrófilos, excepto cuando las partículas son grandes en relación con el tamaño de las células ó cuando el número de partículas es grande, en estas circunstancias, los macrófagos son fagocitos más efectivos. Se ha observado que algunas partículas como los eritrocitos dañados o sensibilizados con IgG y/o

complemento son fagocitados más efectivamente cuando los monocitos están adheridos a una superficie, aún cuando también son capaces de fagocitar cuando están en suspensión pero es probable que la mayor actividad ocurra en relación con una superficie fija.

También se ha visto que los monocitos tienen una función muy importante en la producción de los antígenos esenciales tanto para la inmunidad celular como para la humoral. Responden a los factores quimiotáctico e inmovilizante (Factor inhibidor de la migración FIM), derivados de los linfocitos.

INMUNOGLOBULINAS

Todas las inmunoglobulinas tienen patrones estructurales similares, pero gran diversidad de propiedades antigénicas y de secuencias de aminoácidos. Las moléculas de inmunoglobulina están formadas por cadenas polipeptídicas ligeras (pequeñas) y pesadas (grandes). Cada cadena de inmunoglobulina consta de una porción amino variable, cada una de las cuales a su vez, está genéticamente determinada cuando menos por un gen. Así, cada cadena de inmunoglobulina está cifrada cuando menos por dos genes; uno para la región constante y el otro para la región variable. Las cadenas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro.

Cadenas ligeras (L); estas siempre son de dos tipos, Kappa (K) y lambda (λ) con pesos moleculares de 25,000. Ambos tipos ocurren en todas las clases de inmunoglobulina, pero cualquier molécula contiene solo un tipo de cadena L.

Cadenas pesadas (H); cada una de las cinco clases de inmunoglobulina tiene un conjunto antigénico de cadenas H (isotipos) con pesos moleculares de 50,000 a 70,000. Los cinco tipos de cadenas pesadas se denominan γ en IgG, μ en IgM, α en IgA, δ en IgD y ϵ en IgE. La proporción de cadenas H que no está involucrada en el sitio de combinación del anticuerpo (fragmento Fc) forma los sitios de los marcadores genéticos humanos Gm sobre las IgG, ver cuadro 9.

CUADRO 9. PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS.

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
PESO MOLECULAR	145,000	160,000	900,000	160,000	200,000
COEFICIENTE DE SEDIMENTACION	75	7(9,11,13 15)	19	7	8
CADENA H	γ	α	μ	δ	ε
CADENA L	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ
CONC.PROMEDIO EN SUERO mg/100ml	1000-1500	100-400	60-180	3-5	0.003
VIDA MEDIA EN EL SUERO (DIAS)	23	6	5	3	2.5
% CARBOHIDRATOS	2.5	10	10	10	10
CRUZA PLACENTA	+	-	-	-	-
FIJA COMPLEMENTO	+	-	+	-	-
SUBCLASES	4	2	2	1	1
FIJACION A CELULAS	PMN MØ	-	-	-	CELULAS CEBADAS EN TEJIDO BASOFILOS EN SANGRE.
VALENCIAS	2 D1	TERA	DECA	POSIBLE MENTE 2	2
ESTRUCTURA	MONOMERICA	DIMERICA	PENTAMERICA	MONOMERICA	MONOMERICA

INMUNOGLOBULINA IgG.

Comprende aproximadamente 75% de las inmunoglobulinas en los sueros humanos normales, hay cuatro subclases de IgG, basadas en las diferencias antigénicas en las cadenas H. Los glucósidos son menos abundantes en las IgG que en otras clases de inmunoglobulina. El carbohidrato (localizado en la Fc y ocasionalmente también en los segmentos Fab), pueden proporcionar sitios de enlace para los receptores y pueden desempeñar algún papel en la secreción de inmunoglobulina por las células plasmáticas.

Los anticuerpos IgG pueden fijarse probablemente a diversos tejidos mediante el segmento Fc y participar en reacciones anafilácticas.

INMUNOGLOBULINA IgM

Comprende alrededor de 10% de inmunoglobulina en el suero humano. Las IgM habitualmente pueden distinguirse de las IgG y de otras clases de IgG debido a que el tratamiento con mercaptoetanol produce una pérdida de la actividad aglutinante. Las moléculas IgM son los anticuerpos que se sintetizan primero como respuesta al estímulo antigénico. Fijan bien el complemento en presencia de antígeno. La velocidad de síntesis de IgM es alrededor de 8 mg/Kg/dís. El feto sintetiza IgM dentro del útero.

INMUNOGLOBULINA IgA.

Abarca el 5% de inmunoglobulina en el suero humano. La velocidad de síntesis de IgA en el suero es de alrededor 35 mg/Kg/día y es

catabolizada rápidamente. Es la principal inmunoglobulina en las secreciones externas (ejemplo; moco de los sistemas respiratorios, digestivo, urinario y genital, lagrimas, leche, saliva). La producción de IgA secretoria es estimulada más efectivamente por infección local más que por las infecciones generales o por la administración de antígenos. IgA (secretoria ó serica) no fija el complemento en presencia de antígeno, pero puede neutralizar virus y también inhibir la fijación de bacterias a células epiteliales.

INMUNOGLOBULINA IgD.

Fué hallada por primera vez como proteína de mieloma y luego se encontró en concentraciones de 3 - 5 mg/100 ml en los sueros normales. No se ha demostrado que la IgD tenga actividad de anticuerpo, aunque algunos autoanticuerpos antinucleares, han sido incluidos entre IgD. Se ha demostrado su presencia sobre la superficie de los linfocitos B, en la sangre del cordón umbilical y su concentración aumenta en el embarazo, cuando éste llega al término.

INMUNOGLOBULINA IgE.

Es identificada en el suero en concentraciones mínimas (0.03 mg/100ml) media reacciones alérgicas cutáneas y en otros tejidos y con el fragmento Fc se fija a las células cebadas y a los basófilos. Los últimos se degranulan al ser expuestos al antígeno específico con la liberación de mediadores, la IgE pierde la capacidad de

sensibilizar la piel después que es calentada durante 4 hrs a 56°C.

RESPUESTA INMUNE.

La respuesta inmunológica no solo constituye el medio principal de defensa del hombre contra microorganismos patógenos, sino que puede producir reacciones clínicas adversas, los componentes del sistema inmunológico se pueden estudiar según el orden en que contribuyen a la respuesta inmunológica. Los datos principales incluyen inmunógenos capaces de iniciar la respuesta inmunológica, el proceso celular del material inmunogénico los productos de la respuesta y las consecuencias, tanto beneficiosas como perjudiciales de la respuesta.

Una sustancia debe reconocerse como extraña para producir una respuesta inmunológica. La facilidad para evocar tal respuesta de una sustancia se llama inmunogenicidad; la capacidad de reaccionar de manera específica con los anticuerpos inducidos se conoce como antigenicidad.

Para iniciar una respuesta inmunológica se requiere de la inyección del inmunógeno. Los macrófagos disponen del inmunógeno en forma inespecífica y no determinan la especificidad de la respuesta inmune. La especificidad de esta respuesta depende de la interacción del inmunógeno con linfocitos que de acuerdo con teorías selectivas, están predeterminados en forma genética para interactuar con un antígeno en particular.

RESPUESTA INMUNE PRIMARIA.

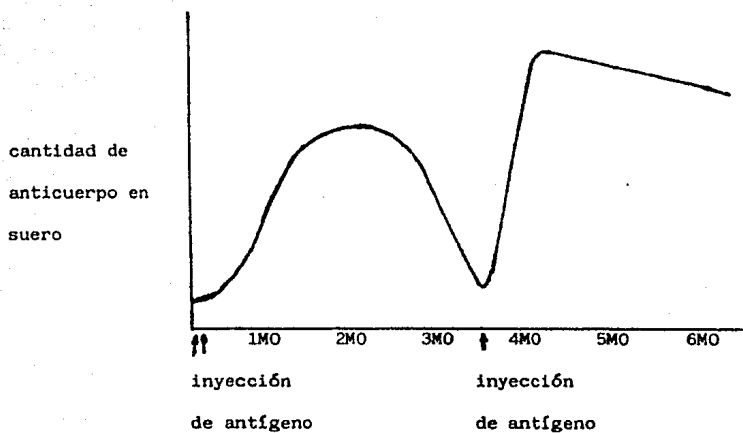
La respuesta inmune a la primera introducción de un inmunógeno es llamada primaria. En esta los anticuerpos IgM se reconocen un poco más temprano que los de la clase IgG. Los anticuerpos IgM se observan en la primera semana de inmunización y declinan después conforme aumenta el título de anticuerpos IgG. Este comportamiento y el hallazgo de la formación de anticuerpos IgG inhibe la síntesis de anticuerpos de la clase IgM. El criterio de que los anticuerpos IgM representan un producto primitivo de la respuesta inmune, tiene como base el predominio de la síntesis de este anticuerpo en el recién nacido y observaciones filogénicas. Además de los cambios secuenciales en la clase inmunoglobulina, la heterogenicidad de la respuesta primaria ocurre con la clase IgG, expresada como un aumento de la afinidad por el antígeno. Esto es explicable según la formación continua de nuevos anticuerpos capaces de interactuar con números crecientes de diversas determinantes antigénicas sobre el inmunógeno macromolecular (ver cuadro 10).

RESPUESTA INMUNE SECUNDARIA.

Cuando la concentración de anticuerpos ha disminuído después de la exposición inicial inmunógena, un encuentro subsecuente evocará una respuesta mayor, llamada secundaria o anamnésica. La respuesta anamnésica requiere un umbral bajo de inmunógeno para producirse y se caracteriza por una fase tardía acortada para la aparición de un producto descubrible, y una respuesta más alta y más persistente

de anticuerpo. Aunque la cantidad de anticuerpo producida por unidad de tiempo es mucho mayor en la respuesta secundaria, el tiempo de duplicación parece ser más ó menos el mismo que en la primaria, lo que indica que la participación de más células, más bien que un aumento en la velocidad de síntesis por célula. Los anticuerpos formados después del estímulo secundario tienen mucha mayor afinidad por el correspondiente determinante antigénico que los que aparecen después de un tiempo comparable durante la respuesta primaria. Los anticuerpos de gran afinidad característicos de la respuesta secundaria son clase IgG (ver cuadro 10).

CUADRO 10. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA RESPUESTA INMUNE PRIMARIA Y SECUNDARIA.



CAPITULO IV. MATERIAL Y METODOS.

Para la inducción de rosetas EA-monocitos se empleó la técnica de acuerdo a Van der Meulen que consiste en que los monocitos son células fagocitarias que tienen sitios receptores para IgG y complemento, por lo tanto están involucrados en la captación de los complejos antígeno - anticuerpo formados por eritrocitos sensibilizados con anticuerpos IgG a través de la fracción Fc del anticuerpo, limitando así circunferencialmente a los monocitos y formando rosetas.

Del trabajo cotidiano en el laboratorio del Banco Central de Sangre del CMN, se seleccionaron 40 muestras de sueros de pacientes que fueran referidos por dificultad en las pruebas de compatibilidad. Se consideró a los anticuerpos anti - D, anti-JK^a, anti-JK^b, anti-Fy^a, anti-E, anti-K, anti-Di^b, anti-C, anti-S y anti-e como IgG y a los anticuerpos anti-P, anti-Le^a, anti-H y anti-I como IgM para éste estudio.

Cada suero anti, se probó simultaneamente con un testigo positivo y uno negativo. El testigo positivo consistió en glóbulos rojos R₁R₂ sensibilizados con suero anti-D comercial diluido 1:32, cuya actividad es como mínimo de 40" de avidéz y 1:16 de título contra glóbulos rojos R₁R₂ según control rutinario del Banco central de Sangre. Se comprobó la sensibilización con la técnica de la antiglobulina humana empleando un suero comercial controlado en el laboratorio del Banco Central de Sangre por su actividad de 40" y

1:16 de título. Para estimar la eficiencia de la opsonización de los anticuerpos, se integró una cifra, producto de la reactividad observada en la comprobación de la sensibilización de los eritrocitos con el anticuerpo problema y el número de rosetas formadas por el mismo anticuerpo contra los eritrocitos representativos del antígeno específico empleados para la formación de rosetas con anticuerpos IgG fueron siempre homocigotas al antígeno, salvo las representativas del antígeno kell. Para los anticuerpos IgM se contó con células P positivo de reactividad clara, en tanto no se hace la distinción de variantes del complejo antigénico P, los antígenos empleados para los Le^a fueron homocigotos; de grupo O para el anticuerpo H y para el anticuerpo I. Una cifra calculada en la misma forma se obtuvo para el suero testigo. Finalmente se consideró como índice de actividad opsonizante el resultante de comprobar la cifra observada con el suero problema y con el suero testigo conocido para cada prueba.

De acuerdo con Schanfield en la casuística estudiada por él, pudo definir que en los casos en que el índice de opsonización estaba por arriba de 0.5 (índice obtenido de la comparación de rosetas problema con rosetas testigo), los anticuerpos resultaban con actividad hemolítica, ya que tuvo la evidencia clínica en varios de ellos, por lo tanto el índice anteriormente mencionado se consideró en este estudio como indicador de la actividad hemolítica potencial de los anticuerpos aquí estudiados. A continuación se describen los fundamentos, material, métodos y desarrollo de cada una de las técnicas utilizadas.

I. DETERMINACION DE FENOTIPOS DE LOS SISTEMAS SANGUINEOS.

FUNDAMENTO:

En la membrana de los glóbulos rojos humanos existen varias decenas de sustancias pertenecientes a sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios (antígenos), son generalmente fáciles de tipificar por medio de la reacción antígeno - anticuerpo in vitro.

Los sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios que se tipifican frecuentemente en un Banco de sangre que están ligados a transfusión sanguínea son: Sistema ABO, sistema Rh-Hr, sistema MNSs, sistema P; sistema Lutheran (Lu), Lewis (Le), Kell (K), Duffy (Fy), Kidd (Jk); Diego (Di) y el antígeno XGA.

MATERIAL.

- Centrífuga de mesa
- Gradilla
- Pipetas Pasteur
- Tubos de ensaye de 12 x 75 mm
- Baño María a 22°C
- Termómetro

REACTIVOS.

- | | |
|----------------------------------|----------------------|
| -Antisueros anti-Di ^a | anti-Fy ^a |
| anti-Di ^b | anti-Fy ^b |
| anti-Le ^a | anti-S |
| anti-Le ^b | anti-s |
| anti-JK ^a | anti-C |
| anti-JK ^b | anti-c̄ |

antisueros	anti- D	anti-M
	anti-P	anti-N
	anti-E	anti-e
	anti-K	anti-Lu ^a

-Suero control del Rh-Hr

-Medio albúmina (albúmina bovina al 22.5%)

-Suero de Coombs

-Solución salina estéril al 0.85%

A. METODO PARA LA TIPIFICACION DEL SISTEMA Rh

C \bar{c} D E e

Resuspender dos gotas de eritrocitos del donador en su propio suero ó en un medio albuminoso; en un tubo de ensaye de 12 x 75 mm, al 2%

- Colocar en una gradilla seis tubos de ensaye rotulados previamente con la sigla del fenotipo a determinar, el sexto tubo como autotestigo que contiene una gota del reactivo control Rh-Hr y una gota de eritrocitos del problema al 2%.

-Agregar una gota de antisuero a los tubos según corresponda con el fenotipo, por ejemplo un tubo rotulado con la sigla C se agrega una gota de antisuero C.

- Adicionar una gota de los eritrocitos ya preparados al 2% con una pipeta pasteur a cada uno de los tubos.

- Centrifugar los tubos 1½ minutos a 3400 rpm en una centrifuga de mesa.

- Sacar los tubos con cuidado, se agitan suavemente y se observan, si no hay aglutinación se continúa con lo siguiente.

- Incubar todos los tubos durante 30-60min a 37°C.

- Pasado este tiempo centrifugar los tubos durante 30 seg. a 3400 rpm en una centrifuga de mesa.

- Sacar cuidadosamente los tubos de la centrifuga, agitar suavemente y observar uno a uno los tubos y se anota si hay ó no aglutinación por ejemplo:

C	\bar{c}	D	E	e	autotestigo	CCDee
2+	-	4+	-	2+	-	

B. METODO PARA LA TIPIFICACION DE LOS SISTEMAS

Le^a Le^b P M N

- Lavar 3 gotas de eritrocitos del donador en un tubo de ensaye de 12 x 75mm con solución salina estéril al 0.85%, en cada lavado se agrega la solución hasta el borde del tubo, se mezcla y se centrifuga 2 minutos a 3400rpm en una centrifuga de mesa, después sacar el tubo y desechar el sobrenadante decantando, quedando los eritrocitos adheridos en el fondo del tubo, ésto se realiza en cada lavado, finalmente resuspender los eritrocitos al 2% en solución salina fisiológica al 0.85%.
- Colocar en una gradilla 5 tubos de ensaye rotulados previamente con las siglas del fenotipo a determinar.
- Agregar a cada tubo rotulado una gota de los antisueros, según corresponda al fenotipo a determinar, por ejemplo un tubo rotulado con Le^a, se le agrega una gota de antisuero Le^a.
- Agregar a cada uno de los tubos, una gota de eritrocitos al 2% con una pipeta Pasteur.
- Incubar el tubo rotulado como Le^a durante 1 hr a 22°C.
- Incubar el tubo rotulado como Le^b durante 30' a 37°C.
- Incubar el tubo rotulado como P durante 1 hr a 4°C.
- Dejar el tubo rotulado como M y el rotulado como N a temperatura ambiente durante 15 min.
- Centrifugar a 3400rpm durante 30 seg los tubos rotulados como Le^a y Le^b, los tubos restantes no se centrifugan.
- Sacar los tubos cuidadosamente, agitar suavemente uno a uno y observar si hay ó no aglutinación.

C. METODO PARA LA TIPIFICACION DE LOS SISTEMAS

S s JK^a JK^b Fy^a Fy^b Di^a Lu^a K

- Lavar 3 gotas de eritrocitos del donador en un tubo de ensaye de 12 x 75mm con solución salina fisiológica al 0.85% de la misma manera como se hizo en el lavado de los eritrocitos para la técnica anterior y resuspender en solución salina fisiológica al 2%.
- Colocar en una gradilla 10 tubos de ensaye de 12 x 75mm, rotulados previamente con la sigla del fenotipo a determinar.
- Agregar a cada uno de los tubos una gota de los antisueros según corresponda el fenotipo a determinar, por ejemplo el tubo marcado con JK^a se adiciona una gota de antisuero JK^a.
- Agregar a cada tubo una gota de eritrocitos al 2% con una pipeta Pasteur.
- Incubar todos los tubos una hora a 37°C.
- Sacar los tubos, lavar 3 veces los eritrocitos con solución salina fisiológica al 0.85% (de la misma manera como se lavan los eritrocitos del donador), solo que en el último lavado secar perfectamente los eritrocitos, colocando una gasa en la boca del tubo.
- Agregar 1 ó 2 gotas de suero de Coombs a cada uno de los tubos (suero antiglobulina humana).
- Centrifugar los tubos a 3400rpm durante 30 seg en una centrífuga de mesa.
- Sacar cuidadosamente los tubos, agitar suavemente uno a uno los tubos y observar si hay ó no aglutinación.

II. SEPARACION Y PREPARACION DE MONOCITOS.

FUNDAMENTO:

La obtención de los monocitos se basa primeramente en la separación de células mononucleares a través de la formación de un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque y posteriormente aprovechando las características de los monocitos de adherencia a materiales plásticos.

MATERIAL.

- 9 Matraces erlen-meyer de 25 ml
- 1 matraz erlen-meyer de 125ml
- cajas de petri de plástico
- cámara humeda
- cámara de Newbawer
- pipetas Pasteur
- pipetas de 5ml, 10ml, 2ml
- pipeta de blancos
- pipeta de rojos
- perlas de vidrio
- microscópio
- tubos de ensaye de 13 x 100mm
- tubos de ensaye de 12 x 75mm
- tubos de ensaye de 10 x 75mm
- gradilla
- Sangre de donadores varones tipo O Rh⁺.

REACTIVOS.

- Ficoll-Hypaque.

Ficoll 1.92 g

24 ml de agua libre de hierro, dejar disolver solo.

Hypaque 6.56 ml de Hypaque al 50%

3.44 ml de agua libre de hierro

Mezclar el ficoll y el Hypaque, obteniendo así, un volumen de 34 ml.

- Solución balanceada de Hank's.

sol.A NaCl 160g

KCl 8g

Mg.SO₄.7H₂O 4g

H₂O dest. 800ml

sol.B. CaCl₂ 2.8g

H₂O dest. 100ml

sol C. Mezclar sol A y sol B y llevar a 1 litro con agua destilada, adicionar 2 ml de cloroformo como preservativo. Almacenar en refrigeración de 3-10°C.

solD. Na₂HPO₄.12 H₂O 3.04g

KH₂PO₄ anhidro 1g

glucosa (6 dextrosa) 20g

H₂O dest. 800ml

Disolver y adicionar 100ml de solución acuosa de rojo de fenol al 0.2% y aforar a 1 litro con agua destilada.

Adicionar 2 ml de cloroformo como conservador.

Soluciones de trabajo; la solución salina balanceada de Hank's se prepara mezclando 1 parte de solución C y 1 parte de solución D con 18 partes de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 115°C ó llevar a cabo una filtración estéril y refrigerar.

Adicionar 2.5 ml de solución de bicarbonato de sodio al 1.4% inmediatamente antes de usar, ajustar el pH 7.2-7.3.

METODO.

- Colocar 5 ml de sangre tipo O Rh⁺ de donadores varones sanos en cada uno de los 9 matraces erlenmeyer conteniendo 6 perlas de vidrio.
- Desfibrinar la sangre, agitando cada matraz a 50rpm durante 10min aproximadamente sobre una superficie plana.
- Hacer una suspensión 1/1½ con solución salina cada una de las muestras de sangre desfibrinada, en tubos de 13 x 100mm, por ejemplo 2 ml de solución salina con 3ml de sangre desfibrinada.
- Colocar en 9 tubos de 13 x100mm 2 ml de ficoll-Hypaque y estratificar lentamente con una pipeta Pasteur cada una de las suspensiones realizadas en el paso anterior.
- Centrifugar todos los tubos 40 min a 1350rpm a temperatura ambiente en una centrifuga de pie (temperatura entre 20-22°C).
- Al cabo de este tiempo pasar los tubos cuidadosamente a una gradilla y extraer de la interfase la capa de células mononucleares. (aparece como una capa blanca) con ayuda de una pipeta Pasteur.
- Mezclar las 9 capas obtenidas en un tubo y repartirlas en 4 tubos

de 13 x 100mm, agregar a cada tubo 4 ml de medio 199 (ó Hank's) y mezclar cuidadosamente el contenido.

- Centrifugar 10 min a 1350rpm a temperatura entre 20-22°C en una centrífuga de pie.

- Sacar los tubos de la centrífuga, desechar el sobrenadante decantando y resuspender el boton formado con 2 ó 3 gotas de medio 199 (ó Hank's).

- con una pipeta pasteur previamente humedecida de Hank's colocar la suspensión de células mononucleares en la parte media de una caja de petri de plástico.

- En una caja de plástico colocar 2 gasas húmedas en el fondo y meter la caja de petri de plástico, cerrar e incubar 1.5 hrs a 37°C.

- Sacar la caja de petri de la cámara húmeda, desechar el sobrenadante y los monocitos que quedan pegados en la caja, lavarlos 3 veces con medio 199 ó Hank's, agregando cada vez 1 ml del medio a la caja de petri, realizar unos movimientos circulatorios sobre una superficie plana y desechar el sobrenadante para eliminar así la capa de linfocitos.

- Despegar la capa de monocitos que se encuentra adherida a la pared de la caja de petri con un papel parafilm y ponerlos en un tubo de ensaye de 12 x 75mm y agregar aproximadamente 0.5ml de medio 199 ó Hank's.

- Contar en una cámara de newbawer, la cantidad de monocitos obtenidos con la ayuda de una pipeta de blancos.

- Tomar hasta 0.5 de monocitos y diluir hasta 1.1 con medio 199 ó Hank's, leer con el objetivo seco fuerte (40 X), los cuatro cuadros de los extremos de la cámara de newbawer (cada uno de ellos consta de 16 cuadros) y ajustar a 4000 monocitos/mm³ con medio 199 ó Hank's, por ejemplo en un volumen de 0.8 ml de suspensión de monocitos, se encontraron 10,000 monocitos/mm³, agregar al 0.8 ml, 1.2 ml de Hank's para obtener un total de 4000 monocitos /mm³.

III. VIABILIDAD DE MONOCITOS.

FUNDAMENTO.

Las células vivas no permiten el paso de colorantes ácidos como la eosina ó nigrosina a través de su membrana, pero cuando la célula muere el colorante puede penetrar fácilmente a la célula, alterando su imagen al microscópio ya que pasa de una célula refringente (célula viva) a una célula opaca coloreada (célula muerta).

MATERIAL

- Cámara de newbawer
- gradilla
- microscópio
- pipetas pasteur
- tubos de ensaye de 10 x 75 mm
- Monocitos sanguíneos.

REACTIVOS.

- Eosina acuosa
- Formol pH= 9.0

METODO.

- Colocar en un tubo de ensaye de 10 x 75 mm 7 lambdas de monocitos sanguíneos, más tres lambdas de eosina acuosa al 5%.
- Dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 min.
- Posteriormente agregar 2 lambdas de formol pH = 9.0

- Observar al microscópio con el objetivo seco fuerte (40 x), con ayuda de una cámara de newbawer.
- Contar el número de monocitos muertos en toda la cámara de newbawer (la parte cuadrículada), observandose los monocitos muertos opacos y los monocitos vivos se ven refringentes.

IV. PREPARACION DE LOS COMPLEJOS ANTIGENO-ANTICUERPO PARA LA FORMACION DE ROSETAS

FUNDAMENTO.

Las moléculas de anticuerpo IgG poseen como todos los anticuerpos sitios de unión que son específicos para las características estructurales del antígeno que lo indujo a su formación, haciendo posible la formación de un complejo antígeno-anticuerpo cuando se encuentran en un medio adecuado.

MATERIAL.

- Cámara de newbawer
- gradilla
- microscópio
- tubos de ensaye de 12 x 75mm
- pipetas Pasteur
- pipetas de 2ml, 5ml
- pipeta para cuenta de glóbulos rojos
- Eritrocitos de donador R_1R_2 (fenotipo C, \bar{c} , E, e)
- Eritrocitos de donador con fenotipo correspondiente al que presenta el paciente en su suero.
- ± Suero de pacientes con anticuerpos irregulares..

REACTIVOS.

- Solución balanceada de Hank's (ó medio 199)
- Suero antiglobulina humana (suero de coombs)
- ± Suero anti - D
- Solución salina fisiológica al 0.85%

METODO.

PREPARACION DE LOS ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON SUERO ANTI-D

A. Preparación del anticuerpo.

- Realizar diluciones del suero anti-D, rotulando 5 tubos de ensaye de la siguiente manera; 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32.
- Agregar a cada uno de los tubos 1 ml de solución salina fisiológica.
- Agregar al tubo rotulado como 1/2, 1ml de suero anti-D y mezclar cuidadosamente el contenido.
- A partir de esta dilución (1/2) tomar 1 ml (de la mezcla solución salina-anti-D) y pasar al siguiente tubo rotulado como 1/4, mezclar el contenido cuidadosamente y continuar este método hasta llegar al tubo rotulado como 1/32, de éste último se toma 1 ml y se desecha, quedando así el mismo volúmen en todos los tubos (1 ml).

B. Preparación de los eritrocitos (Antígeno).

- Lavar 5 gotas de eritrocitos de fenotipo $R_1 R_2$ (C, \bar{c} , E, e) con solución salina fisiológica de la siguiente manera:
- En un tubo de ensaye de 12 x 75mm se vierten 5 gotas de eritrocitos antes mencionados, agregar solución salina fisiológica hasta el borde del tubo y mezclar.
- centrifugar el tubo durante $1\frac{1}{2}$ min a 3400 rpm en una centrífuga de mesa.
- Sacar el tubo cuidadosamente y desechar el sobrenadante decantando, de manera que los eritrocitos al final quedarán en el fondo del tubo, este método repetirlo con cada lavado.
- Al realizar el tercer lavado y decantar el sobrenadante, en el

- A partir del tubo 1/2, hasta 1/64 agregar una gota de solución salina fisiológica, posteriormente agregar una gota de suero del paciente a los tubos rotulados como puro y 1/2, del tubo 1/2 tomar una gota y pasar al tubo 1/4, y así sucesivamente hasta llegar al tubo 1/64, en cada uno de ellos debe quedar el mismo volumen, posteriormente agregar a cada tubo una gota de eritrocitos al 2% (dichos eritrocitos deben presentar el fenotipo correspondiente al anticuerpo del suero), incubar una hora, ya sea a 37°C ó a 22°C, dependiendo del anticuerpo que presente el suero.

- Sacar, lavar tres veces y agregar una gota de suero de coombs a cada tubo, centrifugar 1min a 3400rpm y observar si hay ó no aglutinación.

- En un tubo rotulado con el nombre del paciente agregar 2 gotas de eritrocitos al 10%, más tres gotas de suero problema.

- Incubar una hora a 37°C

- Sacar, lavar tres veces los eritrocitos con solución salina, como se menciona anteriormente.

- Diluir los eritrocitos con solución balanceada de Hank's ó medio 199 (agregar 5 gotas).

- Ajustar los eritrocitos con una pipeta para cuenta de rojos hasta obtener 100,000 por mm^3 , leer en una cámara de newbawer solamente los cuadros de los extremos y el central correspondientes a la lectura de rojos (que se encuentra en la parte central de la cámara) y cada cuadro mide 0.02 mm^3 , en el objetivo seco fuerte del microscópio (40X).

- Agregar una gota de suero antiglobulina humana (suero de coombs) a cada uno de los tubos, agitar suavemente.
- Centrifugar los tubos 1min a 3400rpm en una centrífuga de mesa.
- Sacar cuidadosamente de la centrífuga y agitar suavemente y observar si hay ó no aglutinación.
- Una vez hecho lo anterior ajustar los eritrocitos con ayuda de una pipeta para cuenta de rojos haciendo una dilución 1/200 y leer en una cámara de newbawer en el objetivo seco fuerte (40X) del microscópio, leer los cuadros de los extremos y el central correspondientes a la lectura de rojos (se encuentran en la parte central de la cámara de newbawer y cada cuadro mide 0.02mm^3) el ajuste que se hace debe ser de $100,000$ eritrocitos/ mm^3 .

PREPARACION DE LOS ERITROCITOS CON SUERO PROBLEMA.

D. Preparación de los eritrocitos del donador.

- Lavar 3 gotas de eritrocitos de un donador en un tubo de ensaye de 12 x 75mm (de la misma forma que la técnica anterior), de fenotipo específico al anticuerpo que presenta el suero del paciente, (realizar 3 lavados), por ejemplo el suero del paciente presenta un anticuerpo anti-Fy^a, la sangre del donador debe tener el fenotipo Fy^a positivo.
- Una vez hechos los lavados se transfiere a otro tubo una gota de eritrocitos, diluir con 9 gotas de solución salina fisiológica al 0.85% para obtener finalmente una concentración del 10%.
- Realizar un título del anticuerpo de la siguiente manera:
- Rotular 7 tubos de ensaye como sigue puro, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64.

momento en que se vierte la última gota de este, colocar una gasa en la boca del tubo para eliminar absolutamente toda la solución, quedando en el fondo los eritrocitos.

- Realizar una suspensión de estos eritrocitos al 50% con solución salina fisiológica, por ejemplo 0.5ml de eritrocitos más 0.5ml de solución salina.

C. Sensibilización de los eritrocitos.

- Colocar en un tubo de 12 x 75mm 2 volúmenes de eritrocitos al 50% más tres volúmenes de suero anti-D en dilución 1/32, por ejemplo 2 gotas de eritrocitos al 50% más tres gotas de suero anti-D dilución 1/32.

- Incubar 1 hr a 37°C.

- Transcurrido este tiempo, sacar, lavar los eritrocitos con solución salina fisiológica como se describe anteriormente.

- Una vez hecho ésto realizar una prueba de coombs para corroborar si los eritrocitos están bien sensibilizados haciendo diluciones como sigue, esto también nos va a servir para conocer el título de aglutinación.

- Rotular 4 tubos de ensayo de 12 x 75mm como sigue; puro, 1/2, 1/4, 1/8.

- Agregar del tubo 1/2 hasta 1/8, una gota de solución salina y posteriormente agregar una gota de eritrocitos a los tubos rotulados como puro y 1/2 y mezclar.

- A partir del tubo 1/2 tomar una gota de eritrocitos diluidos con una pipeta Pasteur y pasarlos al siguiente tubo (1/4) y se procede de esta manera hasta llegar al último tubo (1/8), a este último también se le quita una gota y se desecha para que en todos los tubos quede el mismo volúmen.

V. FORMACION DE ROSETAS.

FUNDAMENTO:

Los monocitos son células fagocitarias que tienen sitios receptores para IgG y complemento, por lo tanto están involucrados en la captación de los complejos antígeno-anticuerpo formados por eritrocitos sensibilizados con anticuerpos IgG a través de la fracción Fc del anticuerpo, limitando así circunferencialmente a los monocitos y formando rosetas.

MATERIAL.

- Cámara de newbawer
- centrífuga de pie
- gradilla
- microscópio
- pipetas pasteur
- tubos de ensaye de 10 x 75mm
- Eritrocitos R_1R_2 sensibilizados con suero anti-D al 1%.
- Eritrocitos R_1R_2 sin sensibilizar, al 1%.
- Eritrocitos snesibilizados con el suero del paciente, por ejemplo el paciente presenta un anticuerpo anti-Fy^a los eritrocitos que se usan para sensibilizar deben tener el fenotipo Fy^a (al 1%).
- Monocitos sanguíneos ajustados a 4000/mm³.

REACTIVOS.

- Solución balanceada de hank's 6 medio 199.

METODO.

A. Testigo positivo.

- Colocar en un tubo de ensaye de 10 x 75mm, 2 gotas de eritrocitos sensibilizados con suero anti-D (R_1R_2) y resuspender al 1%, (100,000 eritrocitos/mm³ en medio de hank's), más tres gotas de monocitos (ajustados previamente a 4000/mm³ en Hank's) más tres gotas de medio de Hank's .

B. Testigo negativo.

- Colocar en un tubo de ensaye de 10 x 75mm, 2 gotas de eritrocitos R_1R_2 sin sensibilizar, resuspendidos al 1% en hank's (100,000 eritrocitos/mm³ en hank's), más 2 gotas de monocitos (ajustados a 4000/mm³), más tres gotas de medio Hank's.

C. Problema.

Colocar en un tubo de ensaye de 10 x 75mm, 2 gotas de eritrocitos sensibilizados con el suero del paciente y resuspender al 1% (100,000 eritrocitos/mm³ en Hank8s), más 2 gotas de 4 monocitos (4000/mm³), más tres gotas de medio de Hank's.

- centrifugar cada uno de los tubos 8 min en una temperatura entre 20-22°C a 1200rpm en una cnetrifuga de pie.

- Sacar los tubos cuidadosamente de la centrifuga y dejarlos reposar durante 15 min a temperatura ambiente.

- Agitar suavemente hasta desacer el botón que se formó.
- Contar el número de rosetas formadas en toda la parte cuadrículada de la cámara de newbawer.

CAPITULO V. RESULTADOS.

En los cuadros V.I. al V.V. se encuentran los resultados de la proporción de rosetas EA-monocitos formados por los anticuerpos considerados como IgG. De los cuadros V.VI. al V.VIII. se encuentran los resultados de la proporción de rosetas EA-monocitos formados por anticuerpos IgM, además de los datos de la estimación cuantitativa de la actividad del anticuerpo tanto con el suero problema como con el suero control y finalmente el índice de actividad opsonizante, resultante de la comparación de las cifras producto de los conteos mencionados según se describió anteriormente.

PACIENTE	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	PROBLEMA ROSETAS %	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	CONTROL POSITIVO ROSETAS %	INDICE DE ACTIVIDAD OPSONIZANTE
OLAM**(anti-Jk ^a)	36	100 32	36	80 30	1.25
SAA "	16	22 11	15	22 11	1.06
GRML "	25	57 28.5	15	22 11	4.3
ZGI "	25	20 13.4	30	44 23.4	0.37
MFG "	32	14 5.2	36	80 30	0.15
CVS (anti-Jk ^b)	7	6 5.7	20	30 25	0.07
CAC "	2	6 3.6	32	65 28.3	0.005

CUADRO I. ROSETAS EA-MONOCITOS FORMADAS POR ANTICUERPOS ANTI-JK^a. COMO SE PUEDE OBSERVAR SOLAMENTE SE VEN 3 CASOS DE ANTICUERPOS CON INDICE DE ACTIVIDAD OPSONIZANTE MAYOR DE 0.5 TODOS DE ESPECIFICIDAD ANTI-JK^a.

PACIENTE	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	PROBLEMA ROSETAS %	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	CONTROL POSITIVO ROSETAS %	INDICE DE ACTIVIDAD OPSONIZANTE
SAA (anti-Fy ^a)	7	15 8.5	36	74 28.5	0.03
YTM "	17	22 11	15	22 11	1.13
SUG "	36	81 22.7	36	81 22.1	1.0
BGJ "	13	77 19.5	32	65 26.5	0.48

CUADRO II. ROSETAS EA-MONOCITOS FORMADAS POR ANTICUERPOS ANTI-Fy^a. EN ESTE CASO SOLO SE OBSERVARON DOS PACIENTES CON ACTIVIDAD OPSONIZANTE SUPERIOR A 0.5.

PACIENTE	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	PROBLEMA ROSETAS %	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	CONTROL POSITIVO ROSETAS %	INDICE DE ACTIVIDAD OPSONIZANTE
CVS (anti-D)	22	25 12.5	10	10	9.5 5.5
LMAR "	48	59 23.6	36	74	28.5 1.06
LBG "	15	11 4.5	30	58	16.5 0.09
SAA (anti-E)	16	22 10.5	36	74	28.5 0.13
ERJ "	7	10 6.4	30	44	23.4 0.05
MFG "	11	22 25.8	18	25	29 0.53
VMMC (anti-e)	14	9 3.3	30	58	16.5 0.07
VRI (anti-C)	27	24 10.1	32	63	22.1 0.32

CUADRO III. ROSETAS EA-MONOCITOS FORMADAS POR ANTICUERPOS ANTI-D, ANTI-E, ANTI-e, ANTI-C. ES NOTABLE QUE DE 3 ANTICUERPOS ANTI-D UNO DE ELLOS RESULTO CON UNA BAJA ACTIVIDAD Y DE UN ANTI-E DE 3 MOSTRO UN INDICE SUPERIOR A 0.5.

PACIENTE	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	PROBLEMA ROSETAS %	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	CONTROL POSITIVO ROSETAS %	INDICE DE ACTIVIDAD OPSONIZANTE
BS (anti-K)	6	18 9.18	30	65	26.5 0.05
SUG "	7	13 7.4	30	65	26.5 0.04
MFG "	11	15 6.4	36	76	26.7 0.06
VPM (anti-S)	11	20 21.9	18	25	29 0.48

CUADRO IV. ROSETAS EA-MONOCITOS FORMADAS POR ANTICUERPOS ANTI-K Y ANTI-S. DE ACUERDO CON ESTOS DATOS LOS 3 ANTICUERPOS ANTI-K SON DE POCA ACTIVIDAD.

PACIENTE	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	PROBLEMA		ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	CONTROL POSITIVO		INDICE DE ACTIVIDAD OPSONIZACION
		ROSETAS	%		ROSETAS	%	
AFR (anti-Di ^a)	23	82	21.9	36	76	26.7	0.68
OLAM (anti-Di ^b)	47	25	25	25	25	12.5	4.7

CUADRO V. ROSETAS EA-MONOCITOS FORMADAS POR ANTICUERPOS ANTI-Di^a y ANTI-Di^b. LOS DOS ANTICUERPOS ANTI-DIEGO MUESTRAN UNA ACTIVIDAD SUPERIOR A 0.5 Y ES NOTABLE LA ALTA ACTIVIDAD DEL ANTI-Di^b.

PACIENTE	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	PROBLEMA		ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	CONTROL POSITIVO		INDICE DE ACTIVIDAD OPSONIZACION
		ROSETAS	%		ROSETAS	%	
OLAM (anti-H)	51	23	16.6	30	46	27	0.85
ARMC "	7	16	6.5	30	63	22.1	0.05
EGMJ "	7	14	6.25	32	63	22.1	0.04
BAR "	8	35	10.8	30	58	16.5	0.16
OLAM (anti-I)	43	17	11.1	30	63	22.1	0.38
TRJ "	7	18	10.2	32	63	22.1	0.06
PVM "	11	00	00	32	63	22.1	0.00

CUADRO VI. ROSETAS EA-MONOCITOS FORMADAS POR ANTICUERPOS ANTI-H Y ANTI-I. DE ACUERDO CON ESTOS RESULTADOS, QUE SON LOS PRIMEROS OBSERVADOS EN EL LABORATORIO DEL BCS DEL CMN; UNO DE 4 ANTICUERPOS ANTI-H MOSTRO UNA ACTIVIDAD SUPERIOR A 0.5

PACIENTE	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	PROBLEMA ROSETAS %	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	CONTROL POSITIVO ROSETAS %	INDICE DE ACTIVIDAD OPSONIZANTE
ZCME (anti-Le ^a)	17	17 8.5	15	20 10	0.96*
SCML "	47	37 19.6	36	73 29.9	0.66
BGM "	6	18 10.1	36	78 29.9	0.03
MGME "	11	38 16.4	36	73 29.9	0.15
SCM "	18	51 16.5	36	76 26.7	0.33

CUADRO VII. ROSETAS EA-MONOCITOS FORMADAS POR ANTICUERPOS ANTI-Le^a. PARA LA SENSIBILIZACION DE LOS ERITROCITOS ESPECIFICOS Le^a, SE INCUBO LA MEZCLA EAc a 22°C SALVO LA MUESTRA MARCADA (*).

PACIENTE	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	PROBLEMA ROSETAS %	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	CONTROL POSITIVO ROSETAS %	INDICE DE ACTIVIDAD OPSONIZANTE
MRA (anti-P)	58	60 18.7	36	81 22.1	1.19
VRI "	40	12 5.2	32	63 22.1	0.23
MLA "	2	10 2.9	32	65 26.5	0.009

CUADRO VIII. ROSETAS EA-MONOCITOS FORMADAS POR ANTICUERPOS ANTI-P. ES IMPORTANTE DESTACAR EL CASO DE MRA QUE PRESENTA UNA ACTIVIDAD DE 1.19.

DISCUSION DE RESULTADOS.

Para analizar los resultados observados en este trabajo debemos considerar los datos clínicos correspondientes, es decir, tratar de correlacionar el índice de actividad opsonizante con dichos datos.

En el caso de los anticuerpos anti-JK^a, la paciente OLAM tuvo evidencia previa de reacción antígeno-anticuerpo, en tanto una de las razones por lo cual nos fué referido, fué por la presencia de reacción antiglobulina humana positiva, es decir, podemos considerar que la proporción de rosetas formadas en relación con el testigo es un índice de actividad fagocitaria importante, cabe mencionar también que esta paciente sea hiperreactora que teniendo una colecistitis y antecedentes transfusionales, formó cuatro anticuerpos, tres de gran actividad (JK^a de 1.25, el anti-Di^b de 4.7 y el anti-H de 0.85), otros dos pacientes SAA y GRML tuvieron índices mayor de 1.0, ésto es una evidencia de la actividad opsonizante importante y por lo tanto de gran riesgo de hemólisis extravascular, en los casos de ZGI y MFG los índices están por abajo de 0.5, uno de ellos corresponde a una paciente con cardiopatía reumática inactiva y el otro a una anemia refractaria, ambos padecimientos conocidos por que se asocian con alteraciones inmunológicas.

En los dos casos con anti-JK^b (CVS, CAC) los índices de formación de rosetas son por abajo de 0.5, uno de ellos tiene diagnóstico de cancer vesical y el otro de cardiopatía reumática inactiva con disfunción de prótesis cardiaca; Branch (1983) reportó que de los anticuerpos anti-JK, los JK^b muestran una actividad opsonizante mínima como en nuestros casos, con monocitos homólogos, ambos corresponden a enfermos con una condición inmunológica probablemente alterada, abatida (21), lo que consecuentemente evitaría que la reacción in "vivo" diera una hemólisis severa como en el caso de Branch.

Por el contrario en los pacientes con anti-Fy^a (YTM, SUG) con índice de 1.0 ó superior, se encuentran antecedentes transfusionales, uno de ellos con diagnóstico de enfermedad de Osler y el otro con diagnóstico de pancreatitis, es decir, en ambos hay un daño tisular importante, lo que llevaría a una alteración de su sistema mononuclear fagocítico y a una probable severa hemólisis en caso de transfusión incompatible.

De los anticuerpos anti-E solo uno tuvo un índice mayor de 0.5 (0.53) que corresponde a la paciente MFG, este anticuerpo está asociado con anti-JK^a con un índice de 0.15 y un anti-Kell con 0.06. Destaca un caso más en el que este anticuerpo se asoció a otros como en el caso de SAA con anti-JK^a y anti-Fy^a, siendo el de mayor actividad el anti-JK^a con 1.06, el de menor el anti-Fy^a con 0.06 y el anti-E con 0.13. En un trabajo anterior (12) de siete anticuerpos anti-E estudiados seis no tuvieron evidencia opsonizante alguna, uno lo tuvo de 1.9, pero estaba asociado a un anticuerpo anti- \bar{C} ; aunque en este estudio son solo tres casos de anticuerpos anti-E, llama la atención que se actividad opsonizante sea también relativamente baja como en el trabajo anterior.

Respecto a los anticuerpos anti-D destaca el caso de CVS que corresponde a una paciente que tiene antecedentes transfusionales importantes y que simultáneamente formó dos anticuerpos, el anti-D con actividad de 5.5 y un anti-JK^b con actividad de 0.07, esta diferencia notable implica que la hemólisis sería causada solo por el anti-D.

Los anticuerpos anti-Kell son poco comunes en nuestra población, aparentemente con bajo poder inmunogénico (20), los tres casos aquí estudiados resultaron con un índice bajo; como en el caso de MFG donde en la mezcla de anticuerpos producida por esta paciente el anti-Kell tuvo un índice de 0.06.

Los anticuerpos anti-Diego son conocidos por su baja agresividad en tanto producen poca destrucción celular post-transfusional. Sin embargo en un trabajo anterior (12) de tres anticuerpos Di^a dos tuvieron índices de 1.0 y uno apenas tuvo 0.03. En un caso de anticuerpo anti-Di^b el índice fué de 1.8, el aquí estudiado lo tuvo de 4.7, en una paciente OLAM en la que se reportó hemólisis severa por transfusión incompatible.

De los restantes anti-C, anti-S y anti-e, uno de ellos, el anti-S que se encontró como anticuerpo natural irregular tuvo un índice de actividad opsonizante muy bajo lo que se explica por la naturaleza del anticuerpo y que se sabe que desde el punto de vista transfusional son inocuos. El anticuerpo anti-C también conocido comunmente como anticuerpo natural irregular y a pesar de estar presente en una paciente politransfundida y multipara tuvo un índice de actividad opsonizante de 0.32, por el contrario el anti-e reportado en un paciente con cardiopatía reumática inactiva como causante de reacción hemolítica severa tuvo un índice de actividad opsonizante tan bajo como de 0.07.

De los anticuerpos considerados como IgM, incluimos los de especificidad anti-Le^a, anti-H, anti-I y anti-P, relacionados en su mayoría con pacientes con cardiopatías reumáticas inactivas, solo un anti-H coincidió con una paciente OLAM seguramente hiperreactora, el cual tuvo un índice de 0.85 y el anti-I de 0.38.

Tomando en cuenta el poder opsonizante de los anticuerpos aquí estudiados es notable que la mayoría muestran un índice relativamente bajo, ésto particularmente con los anticuerpos considerados como IgM de los cuales solo encontramos cuatro (26.6%) con índice superior a 0.5 como el anti-H de OLAM, dos anti-Le^a de ACMA y de SCML y un anti-P de MRA; esto puede considerarse como congruente con lo observado en la clínica transfusional, es decir, se han reportado casos de

anti-Le y de anti-P hemolíticos (10); no así el anti-H y sin embargo éste tuvo un índice de actividad opsonizante mayor de 0.5.

Como IgG se encuentran 10 casos con actividad opsonizante superior a 0.5 (40%), tres anti-JK^a de OLAM, SAA, y GRML, dos anti-Fy^a de YTM, y de SUG, un anti-E de MFG, dos anti-D de CVS y de LMAR, un anti-Di^b de OLAM y un anti-Di^a de AFR. Llama la atención que de los tres anticuerpos anti-D, uno de ellos tenga un índice bajo (0.09), como nosotros esperaríamos mediante esta prueba que los anticuerpos anti-D fueran todos con índice superior a 0.5, probablemente lo que ocurre es que el paciente tuvo en el momento del estudio un anticuerpo de baja actividad y por ende con poca posibilidad de producir hemólisis, lo cual es factible, aunque es bien conocido que si estos pacientes son sometidos a estímulos sucesivos el título del anticuerpo aumenta y factiblemente otros factores atribuibles al paciente favorezcan la hemólisis; esto puede ser avalado por la diferencia clara de la actividad del anticuerpo en este paciente estimada semicuantitativamente (en puntos).

En cuanto a la técnica empleada para sensibilizar los eritrocitos testigo (R₁R₂) se emplea en una proporción (eritrocitos- suero) de 1:6 en cambio la de los sueros problema es de 1:30. Desde hace algún tiempo en el Banco central de Sangre se emplea la técnica de rosetas en el trabajo rutinario y se han encontrado los resultados que se denotan en el cuadro siguiente.

ERITROCITOS	ANTI-D	ESTIMACION SEMICUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DEL Ac. (EN PUNTOS)	Nº DE ROSETAS	% DE ROSETAS	INDICE DE ACTIVIDAD OPSONIZANTE
10%	1/32	12	80	22.5	1.1
50%	1/32	12	84	20.38	1.2

Se observa en el cuadro anterior la diferencia de computo, el % de rosetas y el índice de actividad opsonizante (el cual se realizó con los datos de una paciente), entre los eritrocitos al 50% y al 10% de sensibilización son sensiblemente iguales. Por lo tanto los resultados observados con 12 anticuerpos (2 JK^b, 1 Fy^a, 1 E, 2 Kell, 4 H, 1 Le^a, 1 P), pueden considerarse como de índice opsonizante bajo, que probablemente no van a provocar hemólisis trascendente ó que van a ser inocuos. Por lo menos el anti-P el anti-Le y los anti-H han sido ya considerados como anticuerpos de importancia clínica mínima. Probablemente aquellos anticuerpos que dan un índice menor de 0.5 tengan un poder opsonizante de significancia clínica nula; pero aquellos de mayor índice y que no dan evidencia in vitro de hemólisis durante las pruebas de compatibilidad obligan a la selección rigurosa de sangre compatible para evitar hemólisis severa extravascular. En otras palabras los anticuerpos IgG con índice opsonizante mayor de 0.5 probablemente den lugar a hemólisis extravascular severa; esta hipótesis requiere de confirmación posterior mediante estudios de sobrevivencia de glóbulos rojos. Es probable que en circunstancias clínicas apremiantes, enfermos que requieren transfusión y que tengan anticuerpos con índice opsonizante inferior a 0.5 sean transfundibles cuando no se encuentra sangre compatible por ser de fenotipo poco común.

En este trabajo se confirmó lo que ha sido reportado por Branch (1983) esto es que las células homocigotas reaccionan mejor que las heterocigotas dando lugar a un mayor número de rosetas, esto se pudo observar con los anticuerpos anti-Jk^a y anti-Di^b.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES.

- La actividad opsonizante alta, mayor de 0.5, de tres anticuerpos anti-JK^a (IgG) estudiados guardan estrecha relación con lo ya reportado para estos anticuerpos, considerados como de destrucción extravascular.
- Los anticuerpos IgG considerados como peligrosos en transfusión sanguínea, como son anti-E, anti-JK^a, anti-Kell se encontraron con bajo índice opsonizante confirmandose los resultados con un primer trabajo en el BCS.
- De los anticuerpos IgM se encontraron cuatro con índices opsonizantes altos y que por lo tanto pueden dar lugar a una reacción hemolítica severa, de estos, dos de ellos se han reportado como peligrosos.
- La actividad opsonizante de anticuerpos como el anti-JK^b, anti-e, anti-C, considerados como muy rara vez peligrosos tuvieron bajos índices de actividad opsonizante.
- El 73.4% de los anticuerpos IgM tienen título bajo y actividad opsonizante baja, así como el 60% de los anticuerpos IgG.
- Las mezclas de anticuerpos deben ser probados cada uno de ellos por separado.
- El índice de opsonización es mayor con células homocigotas que con las heterocigotas.
- La técnica requiere de algunas modificaciones que le pueden dar mayor congruencia con la realidad clínica.
- Los resultados de este estudio como el de otros trabajos ameritan una comprobación biológica, para así obtener datos más confiables.

CAPITULO VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Alex C. Sonnerwith, Ph, D, Leonard Jarret, M. D. "Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis ". Edit: The C.V. Mosby Company, Edic: Eight, 1980 pp 2003
2. Fieer A.F, Van der Meulen. Els Linthout, A.E.G.Kr.Van Dcm Borne and C.P. Engliet. "Destruction of IgG-Sensitized Erythrocytes by Human Blood Monocytes" Modulation of Inhibition By IgG", Brith. J of Haematol 39, 425,1978
3. Dodd B.E, Lincoln P.J. "Inmunología de los grupos sanguíneos" Edit: El manual moderno S.A. México 1976, pp 113-143.
4. Brodersen M.P. y Burus C.P. "The Separation of HUMAN Monocytes from Blood Including Biochemical Observations". Proc. Soc. Exp. Biol. Med: 144, 941-44,1973.
5. Fudenbergh. H. Caldwell J.L. Stites D.P. Wells J. "Inmunología Clínica " Edit: El Manual Moderno. Edic: 3^a, México 1982.
6. Robert G.H. Jane C.B."Blood Bank Polices and procedures" Edit: Medical Examination publishing Company Inc. USA 1976, pp53-63, 117-19.
7. George W.T. Raymond D.A, Eugene B, Kurt J, Robert G."Medicina Interna" Edit: La Prensa Médica Mexicana, Edic: 5 Tomo II, México 1979.
8. Huber H and Fudenberg H.H. "Receptor Sites of human Monocytes for IgG". Int Arch. Allergy. 34,18-31,1968
9. Martin J. Cline and Robert I. Lerrer. "phagocytes by human monocytes " Blood 32, 423-35,1968 September.

10. Mollison P.L. "Blood Transfusion In Clinical medicine" Edit: Blackwell Scientific Publications, edic, 8^a.
11. Race R.R, y Ruth S. "Los grupos Sanguíneos Humanos" Edit: La Prensa Médica Mexicana, edic: 2^a, México 1975
12. Rodriguez M.H, Quintanar R.E, Mendoza P.G, "Evaluación in vitro de la eficiencia opsonizante de los alo-anticuerpos anti-eritrocitos detectados en pacientes que van a ser transfundidos". XXIII Jornada Anual, Agrupación Mexicana para el estudio de la hematología.A.C. 25-30 Octubre 1982, 35-45. Sede hospital ISEMYN Toluca, México.
13. Schanfield M.S, Stevens J.D. y Bauman D. "The detection of Clinically Significant Erythrocyte Alloantibodies using a Human Mononuclear Phagocyte Assay". Transfusion, 21, 571-76, 1981.
14. Smijewski Fletcher "Immunohematology" Edit: Appleton century Crofts. Edic:2^a 1972.
15. Sanford T. "Diagnóstico Clínico por el Laboratorio" Edit: Salvat S.A. Edic: 6 Barcelona España 1978.
16. van der meulen F.W. y Cols. "The Role of Adherence to Human Mononuclear Phagocytes in The destruction of red cells Sensitized With Non-Complemento Binding IgG Antibodies". Brith.J. Haematol, 38, 54, 1978.
17. William E. bennett and Zanvil A. "The Isolation and Selected Properties of Blood Monocytes". The journal of Experimental Medicine. 123, 145-67, 1965
18. William L.Weston, Roberta D. Dustin and Steven K. Hecht. "quantitative Assay of Human Monocyte-Macrophage Function". Journal of Immunological Methods. 8, 213,-22, 1875.

19. Abel B. "Hematología Básica" Ediciones mexicanas del Hospital Infancia de México. Edic: 1^a, 1983, 124-26.
20. Burrows L. and Tartter J. "Blood Transfusions and Colorectal Cancer: Recurrence a Possible Relationship" Abstracts 36TH. Annual Meeting y new York, New York, 350, 1983.
21. Donald R. Branch, Michael T.G, Angeles P.M, Anita S, and Lawrence D.P. "In vitro Determination of red cell Alloantibody Significance using an Assay of Monocyte-Macrophage Interaction With Sensitized Erythrocytes". British J. of Haematology, 56, 19-29, 1984.
22. Rodriguez M.H, Quintanar R.E, y Cois. "La patología Transfusional Experimental en México . II. Alteraciones Inmunohematológicas". Gas. Med. México 1971, 101-663.