



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA  
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA UNAM

OPTIMIZACION DEL RENDIMIENTO DEL  
PANEL DE CELULAS DE FENOTIPO CONO-  
CIDO PARA FINES DE LABORATORIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

*María de la Consolación Elizondo Aladro*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

# I N D I C E

CAPITULO I. INTRODUCCION .....	1
1.1) HIPOTESIS .....	6
CAPITULO II. INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA	
2.1) Generalidades del panel .....	7
2.2) Generalidades del eritrocito .....	11
2.3) Antígenos eritrocitarios .....	11
2.4) Anticuerpos .....	12
2.5) Clasificación de los anticuerpos según el punto de - vista inmunohematológico .....	15
2.6) Reacción antígeno/anticuerpo .....	16
CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1) Diseño del experimento .....	25
3.2) Material .....	25
3.3) Métodos .....	27
3.4) Resultados .....	30
CAPITULO IV. DISCUSION .....	41
CAPITULO V. RESUMEN .....	42
CAPITULO VI. CONCLUSIONES. ....	43
BIBLIOGRAFIA .....	44
APENDICE .....	46
8.1) Preparación de la solución acuosa de glutaraldehído al 2.5 % .....	46

8.2) Preparación del amortiguador de fosfatos salinos a pH de 7.2 .....	46
8.3) Elaboración de la solución de Citrato para la solución de glicerina .....	47
8.4) Medio de conservación de Citrato, Fosfatos, Dextrosa, Adenina-I (CPDA-I) .....	47
8.5) Preparación del reactivo de sucrosa fosfatos para la fijación del complemento .....	48
8.6) Glutaraldehización de los eritrocitos .....	49
8.7) Congelación de eritrocitos con glicerina y descongelación para su glutaraldehización .....	49
8.8) Opsonización de los eritrocitos positivos y negativos, con anti-D (Rho) .....	50
8.9) Opsonización de los eritrocitos positivos y negativos, con complemento .....	50

## C A P I T U L O   I

### I N T R O D U C C I O N

El servicio denominado "Banco de Sangre", ya no debe concebirse solamente como un "establecimiento en el que se obtiene, conserva y suministra sangre humana". Actualmente, este servicio es complejo y está ligado a una serie de actividades imprescindibles para su funcionamiento: actividades de orden social, económico y científico-técnico. Estas últimas involucran la labor del laboratorio, el cual, frecuentemente afronta serios problemas, uno de ellos, sin duda el más serio, es el de no poder proporcionar sangre en el momento oportuno, ni en la cantidad adecuada, a pacientes con problemas de tipo inmunohematológico. Problemas, que por otro lado son poco tratados en la literatura nacional, pero vividos regularmente en un centro de concentración como el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social (BCS del CMN del IMSS) [12].

En la actualidad, las técnicas quirúrgicas para la terapéutica de algunas enfermedades han avanzado tanto, que rara vez el cirujano emplea la transfusión de sangre, y si lo hace, emplea sólo una bolsa de 600 ml., como ocurre por ejemplo, en cirugía de colecistectomía. Esto, y la escasa observación de reacciones graves durante la transfusión, suscita la duda de la utilidad de las pruebas pretransfusionales de compatibilidad, que se realizan en el laboratorio de un Banco de Sangre, por lo que es indispensable recordar que: "aún se informan dos reacciones hemolíticas por cada --

diez mil transfusiones", y que el porcentaje de error en la clasificación de los grupos sanguíneos, ha sido muy alto (hasta 18 % en algunos laboratorios) [12].

Por otro lado, en el servicio del BCS del CHN, IMSS se ha encontrado un grupo de pacientes que tienen hasta doce veces más anticuerpos circulantes contra eritrocitos, que los individuos de una población testigo. Pacientes que sufren de cirrosis, lupus eritematoso, otros padecimientos autoinmunes y mujeres multíparas, son otros tantos grupos donde el hallazgo de anticuerpos irregulares es alto; obviamente, la omisión de las pruebas en todos estos casos, producirán accidentes hemolíticos de consecuencias variables para la vida del paciente. [12]

Las pruebas de compatibilidad se originaron, cuando Landsteiner descubrió en 1900, los grupos sanguíneos ABO al encontrar que el suero contenía anticuerpos antitéticos a los antígenos eritrocitarios. [14]

En las subsiguientes décadas, se hicieron importantes descubrimientos, como el factor Rho (1940); la técnica de antiglobulina humana o suero de Coombs (con lo que se demostró que, los eritrocitos estaban forrados con anticuerpos "incompletos" anti-Rho, en los casos de eritroblastosis fetal), [12]; así como se le dió un mayor impulso a los estudios serológicos postransfusionales, durante y después de la Segunda Guerra Mundial.

En México, hospitales como el de Enfermedades de la Nutrición, Car

diología e Infantil de México, emplearon en esa época (1949), para las pruebas de compatibilidad pretransfusionales, medios salinos y eventualmente enzimáticos (tripsina y papaína); en 1956, en el Hospital de Enfermedades de la Nutrición ya se intentaban las pruebas de compatibilidad con varias técnicas simultáneamente, en busca de sangre compatible para enfermos con antecedentes de reacciones postransfusionales. En esta misma época, el Dr. Gastón Novelo, jefe del Banco de Sangre del Centro Médico La Raza, hacía la identificación de los antígenos del sistema Rh-Hr y trabajaba en la búsqueda de anticuerpos específicos contra este sistema. En 1962, en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional, se inició la integración de la metodología para el estudio de la sangre de los donadores y la selección de un grupo de sangre de estructura fenotípica eritrocitaria conocida (panel), para fines de control de calidad de los sueros hemoclasificadores y de la identificación de la especificidad de los anticuerpos contra eritrocitos en los sueros de pacientes politransfundidos, o con antecedentes de reacciones postransfusionales atribuidos a anticuerpos. En el Banco Central de Sangre, se definió también a nivel de laboratorios de hospitales, el empleo simultáneo de tres técnicas para las pruebas cruzadas de compatibilidad: el medio salino, con enzimas (bromelina) y de Coombs- (antiglobulina humana). (12)

En la actualidad, la cantidad de reactivos necesarios en los laboratorios de los Bancos de Sangre y Servicios de Transfusiones, para el estudio de donadores y pacientes, se ha incrementado enormemente.

Además de los reactivos indispensables, como sueros hemoclasificadores (anti-A y/o -B, anti-D (Rho)), se requiere de células de fenotipo co-

nocido (panel), para el estudio de anticuerpos irregulares fuera del sistema ABO (S. ABO). Estas células son conocidas en base a su composición antigénica, para los principales sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios, tales como: sistema ABO, Rh-Hr, MNS, P, Kell-Cellano, Duffy, Kidd, - Diego, etc., también se utilizan para el control de calidad de los sueros hemoclasificadores, y el control de la antiglobulina humana (suero de ---- Coombs), por lo que se han vuelto herramientas muy útiles en los Bancos de Sangre y Servicios de Transfusiones. [11, 12]

El panel de células de fenotipo conocido, es utilizado en la investigación rutinaria de anticuerpos irregulares anti-eritrocitarios (activos a 37°C) fuera del S. ABO, en los casos de donadores mujeres multíparas, -- y/o politransfundidos que recibieron sangre; dado que el constante estímulo en los pacientes con elementos sanguíneos (leucocitos, plaquetas, eritrocitos, plasma), pueden desencadenar la respuesta inmune con la aparición de anticuerpos contra ellos. Se emplean también para el estudio de la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN) por aloinmunización materno-fetal, y para el estudio de las Anemias Hemolíticas auto y aloinmunes. [9, 11] (Cuadro No. 1)

Estas células se pueden adquirir en el comercio, sin embargo, por ser de importación proceden de individuos de raza blanca, cuya fórmula fenotípica difiere de la presentada por los mestizos mexicanos. Por otro lado, presentan otros inconvenientes, tales como, su vigencia (entre 30 a 35 días) y su alto costo.



En el BCS del CMN, IMSS se han empleado en los últimos años, paneles de células a una concentración del 50%, lo que implica que el tiempo de preparación (lavado y resuspensión de células al 5 %) sea prolongado con pérdida de material biológico, aunque el costo sea bajo. Actualmente, el BCS del CMN, IMSS envía a 79 laboratorios y Bancos de Sangre de este Instituto, este tipo de paneles, lo que totaliza 1534 frascos cada 45 días. Solamente, en el BCS del CMN, IMSS se realizan con estas células, el grupo inverso de 5 000 grupos ABO y más de 60 controles de calidad de los reactivos empleados; y alrededor de 2500 estudios inmunohematológicos mensualmente.

Por todo esto, y debido a que la células del panel han sido cada vez más difíciles de conseguir (por la escasez de donadores), se requiere que la estructuración del panel con células de diferentes fenotipos, sea más duradera. Además, el empleo que de estos paneles se ha ido extendiendo a todo el sector salud, por lo que se requiere de una mayor producción. Si se considera que la donación de sangre para estos paneles es muy espaciada (1 ó 2 veces al año por donador), se requiere su tratamiento para lograr una mayor duración .

Uno de dichos tratamientos es, tratar a las células con ácido tánico o glutaraldehído, para endurecer la membrana del eritrocito (8), mediante puentes covalentes pero que no alteran su antigenicidad, ni la unión del anticuerpo específico, (2); con lo cual se aumenta la sobrevivencia de los paneles.

El objetivo de este trabajo, es tratar de prolongar la duración de los eritrocitos de panel, mediante el empleo de glutaraldehído.

### 1.1) H I P O T E S I S

El comportamiento de las células, a concentración menor de 50%, -- tratadas con glutaraldehído, es igual o mejor que el de las células del panel que se prepara actualmente a una concentración del 50%.

#### C U A D R O # 1

##### UTILIDAD DE ERITROCITOS DE FENOTIPO CONOCIDO EN UN BANCO DE SANGRE

CELULAS	NECESIDAD
1) A1, A2, B, O	Comprobación de la reactividad y <u>especificidad</u> de los sueros hemoclasificadores anti-A y/o B (prueba inversa).
2) Rho (R1r o R2r)	Actividad y reactividad del suero anti-D.
Hr (rr)	Validación de resultados de tipificación con anti-D.
3) Otros fenotipos: C, c̄, E, ē, M, N, S, s, P, Le, Fy, Jk, etc.	Búsqueda e identificación de anticuerpos irregulares.
4) Eritrocitos AGH (Coombs), positivos y negativos.	Comprobación de actividad del suero AGH. Validación de resultados de la <u>reacción</u> de Coombs.

## C A P I T U L O     I I

### INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

#### 2.1) GENERALIDADES DEL PANEL

Hervy y col. (1977), mencionaron que de 213 unidades de sangre que se cruzaron para 97 pacientes de cirugía electiva, sólo 5 de ellas se emplearon. Si se hubiera investigado la presencia de anticuerpos en los sueros de los pacientes, con un panel de células, y estas hubieran sido negativas, hubiera sido posible en caso de necesidad, evitar ese número de --- pruebas "cruzadas" y la distracción inútil de la sangre "en reserva". [14]

Debido a esto, una de las aplicaciones importantes del panel es la investigación de anticuerpos irregulares, realizando la prueba cruzada en fase salina rápida y comprobando compatibilidad con el S. ABO como única prueba pretransfusional en caso de anticuerpos irregulares negativos. [13]

Este tipo de criterio, esta basado en que no todas las pruebas cruzadas son capaces de detectar anticuerpos, ya sea porque el suero no tiene los anticuerpos o que los antígenos eritrocitarios, tengan fenómeno de dosis, por lo que es conveniente estudiar el suero del paciente con el panel. Muy pocos de estos anticuerpos son detectados en pruebas "cruzadas", que no han sido detectados antes con el panel de células.

La selección de la sangre para este panel se hace en base a la es

pecificidad de los anticuerpos regulares esperados del sistema ABO, y de los anticuerpos irregulares inesperados (fuera de este sistema) más comunes en la población a lo inmunizada y según su frecuencia (Ver tabla #2) en nuestro país. Así, se escogen donadores de eritrocitos A1, A2, B y O (para la investigación del grupo inverso S. ABO), y otros donadores grupo O los cuales contengan antígenos del sistema Rh-Hr, MNS, P, Lewis, Lutheran, Kell-Cellano, Duffy, Kidd, Diego, etc, heterocigotos y homocigotos, (en una o dos dosis), y otro grupo que no los contengan. (Ver tabla #1). Estos paneles constan de 10 células, escogidas según se mencionó anteriormente y agrupados de tal manera que dé una probabilidad alta ( $p \geq 1/45$ ) y la certeza de la especificidad del anticuerpo detectado. (Ver tabla #3)

T A B L A # 1

Ejemplo de la composición de un panel: Panel No. 03500

1) CCDee	MMPSS	Le(a+b-)	kk	Fy(a-b+)	JK(a+b-)	Di(a-b+)
2) CCDee	MNpSS	Le(a-b+)	kk	Fy(a+b+)	JK(a-b+)	Di(a+b-)
3) ccDEE	NNPss	Le(a-b-)	kk	Fy(a+b-)	JK(a+b+)	Di(a-b+)
4) ccDEE	MNPSs	Le(a-b+)	kk	Fy(a+b+)	JK(a+b-)	Di(a-b+)
5) ccdee	Mmpss	Le(a-b+)	kk	Fy(a-b+)	JK(a-b+)	Di(a+b+)
6) Ccdee	NMPSs	Le(a+b-)	kk	Fy(a+b-)	JK(a+b-)	Di(a-b+)
7) ccDee	MMPS	Le(a-b+)	kk	Fy(a+b+)	JK(a+b+)	Di(a-b+)
8) ccDEe	MNpSs	Le(a-b+)	kk	Fy(a-b+)	JK(a+b+)	Di(a-b+)
9) ccDEe	MMPSS	Le(a-b+)	kk	Fy(a+b+)	JK(a+b+)	Di(a-b+)
10) CcDEe	MNPSs	Le(a-b-)	kk	Fy(a+b+)	JK(a+b+)	Di(a-b+)

T A B L A # 2

FRECUENCIA DE ANTICUERPOS ANTIERITROCITARIOS MAS COMUNES EN 10 367  
PACIENTES DEL BCS, CMN DEL IMSS.

ESPECIFICIDAD	FRECUENCIA
D	1.5144
E	1.9291
c	1.7392
K	0.4437
Fy <sup>a</sup>	0.5157
Jk <sup>b</sup>	0.5971
D1 <sup>a</sup>	0.2315
D1 <sup>b</sup>	0.0542

T A B L A # 3

CALCULO DE LA PROBABILIDAD DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO EN  
CONTRADO CON EL PANEL No. 03500 DE FENOTIPOS CONOCIDOS.

No. de células	TECNICAS EMPLEADAS			
	S/r	S/37	S/C	Bromelina
1	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg
3	neg	neg	3 +	4 +
4	neg	neg	3 +	4 +
5	neg	neg	3 +	4 +

(continuación de la tabla #3)

No. de células	TECNICAS EMPLEADAS			
	S/r	S/37	S/C	Bromelina
6	neg	neg	+	3+
7	neg	neg	+	3+
8	neg	neg	3+	4+
9	neg	neg	+	3+
10	neg	neg	+	3+

La tabla anterior muestra, que es un probable anti-E

Resultados	células	células		
	pos	neg		
	c	c		
positivos	8(a)	0(b)		8(A)
negativos	0(c)	2(d)		2(B)
	8(D)	2(C)		10(T)

$$\begin{array}{l}
 \frac{A! B! C! D!}{T!} \quad X \quad \frac{1}{a! b! c! d!} \\
 \frac{8! 2! 2! 8!}{10!} \quad X \quad \frac{1}{8! 0! 0! 2!} \\
 \frac{2}{(10) (9)} = \frac{2}{90} = \frac{1}{45}
 \end{array}$$

$$P = 1/45$$

## 2.2) GENERALIDADES DEL ERITROCITO

El eritrocito humano maduro es una célula anucleada con forma de disco bicóncavo, su diámetro es de 6 a 9  $\mu\text{m}$  y con un espesor de 1  $\mu\text{m}$  en el centro y 2 a 2.5  $\mu\text{m}$  en la periferia. Su membrana tiene unos 6 nm. de espesor: esta formada por 49% de proteínas, 44% de lípidos y 7% de glúcidos. [6] En esta membrana existen dos tipos de proteínas: extrínsecas e intrínsecas.

Las proteínas intrínsecas, forman parte de la estructura de la membrana, y están en contacto con el citoesqueleto. [4, 6, 7] Muchas de estas proteínas integrales son glucoproteínas, por ejemplo la banda 3, una proteína integral, contiene entre un 5 y 8% de parte glúcida. Los antígenos de grupos sanguíneos se encuentran situados en varias de estas estructuras. [6,7,10] (Ver Figura #1. MEMBRANA DEL ERITROCITO)

## 2.3) ANTIGENOS ERITROCITARIOS

Estructuralmente un antígeno contiene grupos químicos ordenados tridimensionalmente, conocidos como determinantes antigénicos o epitopes (pueden existir varios de ellos en cada antígeno).

Los antígenos de los grupos sanguíneos eritrocitarios son configuraciones inmuoquímicas presentes en la membrana de los glóbulos rojos, pudiendo ser glucolípidos, proteínas y glucoproteínas. La composición química

ca y ubicación de algunos antígenos de grupos sanguíneos se muestran en la siguiente tabla, [9]:

Glucolípidos (oligosacáridos + lípido)	ABH P Le <sup>a</sup> , Le <sup>b</sup>	Membrana del eritrocito Plasma
Proteína (polipéptido + lípido)	Rh	Membrana del eritrocito
Glucoproteína (polipéptido + oligosacárido)	ABH Le <sup>a</sup> , Le <sup>b</sup> M, N	Secreciones. Moco. Membrana del eritrocito

- Los antígenos ABH están determinados por los azúcares terminales, los cuales están ligados a las 4 últimas clases de estructura en la superficie de la célula roja: banda 3. [11]
- Los antígenos Rh (D), son proteínas; la actividad serológica de estos en los eritrocitos, depende de la presencia de un fosfolípido, la diferencia del Rh y LW, es una proteína glucosídica. [11]
- Los antígenos Kell, son portados por una glucoproteína glucosídica. [11]
- Los Wright<sup>a</sup> están en la sialoglicoforina y al igual que Rh, dependen de la asociación de un fosfolípido para su expresión. [11]
- Los MNSs, están en las glicoforinas A y B, la especificidad parece ser determinada por secuencias de aminoácidos. [11]

#### 2.4) ANTICUERPOS

Las células inmunológicamente competentes reconocen a los epitopes



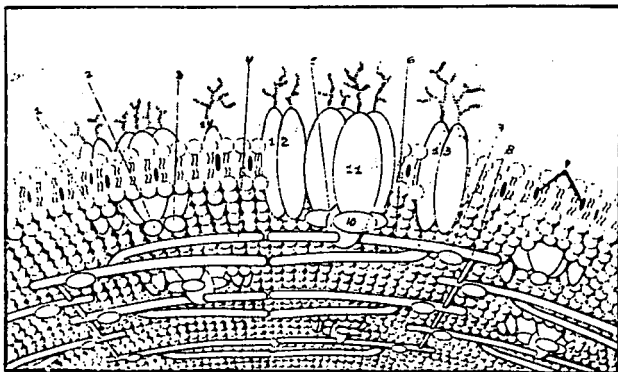
como extraños, produciendo anticuerpos contra estos. Los anticuerpos -  
tienen la característica de reaccionar específicamente con el antígeno -  
que causó su producción. [13]

Los anticuerpos inmunes o aloanticuerpos (irregulares o inesperados), son producidos en este caso, contra antígenos de la misma especie, -  
como los antígenos eritrocitarios, por ejemplo, en multíparas y/o poli--  
transfundidos. Los anticuerpos son proteínas (globulinas), que se ---  
producen en el sistema inmunológico como respuesta a un estímulo. [9, -  
11, 13]

La respuesta primaria, produce principalmente inmunoglobulinas -  
de la clase IgM, como respuesta normal, en cambio, los antígenos proteí-  
nicos producirán inmunoglobulinas de clase IgG primordialmente. [9, 11]

A los anticuerpos anti-A y anti-B, se les conoce como naturales -  
(heteroanticuerpos) regulares o esperados, porque se ha visto que estos  
anticuerpos se desarrollan, probablemente como resultado de la exposición  
ambiental a los antígenos estrechamente relacionados con la estructura -  
química de los grupos sanguíneos (ejemplo: bacterias, polen, etc). [11,  
14]

FIGURA # 1. MEMBRANA DEL ERITROCITO



- |                         |                    |
|-------------------------|--------------------|
| 1.- Fosfolípidos        | 8.- Actina         |
| 2.- Hemoglobina         | 9.- Colesterol     |
| 3.- GPDA banda 6        | 10.- Banda 4.2     |
| 4.- $\alpha$ espectrina | 11.- Banda 3       |
| 5.- Anquirina           | 12.- Glicoforina A |
| 6.- $\beta$ espectrina  | 13.- Glicoforina B |
| 7.- Banda 4.1           | 14.- Glicoforina C |

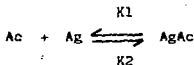
2.5) CLASIFICACION DE LOS ANTICUERPOS SEGUN EL PUNTO DE VISTA INMUNOHEMATOLOGICO.

		SISTEMA	ANTICUERPOS	INMUNOGLOBULINAS	REACCION Ag/Ac IN VITRO	CONSECUENCIAS IN VIVO	
A H T I C U E R P O S	REGULARES o ESPERADOS	ABO	ANTI-A y/o -B	IgM IgG IgA	0 <sup>d</sup> C - 37°C 0°C - 37°C salina enzima Coombs	generalmente Hemólisis (H) Intravascular	
			IRREGULARS.	NATURALES	ABO Lewis P M N etc	anti-A anti-I anti- $C_e^a$ anti-P anti-M anti-N	IgM
	Rh-Hr	anti-D, - $\bar{E}$ , -E, anti-C, -E			IgG IgG, IgM	37°C medio hiper- protéico enzimas Coombs	Hemólisis extravascular (HEV)
LIGUNES	Kell Kidd Duffy	anti-K, -R anti-Jk <sup>a</sup> , -Jk <sup>b</sup> anti-Fy <sup>a</sup> , -Fy <sup>b</sup>	IgG IgG, IgM IgG		HEV e intravas- cular		

Ag= antígeno  
Ac= anticuerpo

## 2.6) REACCION ANTIGENO/ANTICUERPO

La presencia de anticuerpos antieritrocitarios ya sean esperados -- (ejemplo: anti-A y/o -B) o inesperados (ejemplo: anti-D (Rho)) se detectan por la interacción entre el antígeno (Ag) en la membrana del eritrocito y - el correspondiente anticuerpo (Ac). Esta interacción normalmente se detecta por la aglutinación específica y/o hemólisis de las células. Estos - dos elementos (Ag y Ac), no se unen covalentemente, sino que debido a la naturaleza complementaria de sus estructuras, permite que el determinante antigénico se acerque suficientemente al sitio de unión del anticuerpo y puedan unirse por uniones intermoleculares, relativamente débiles como: - puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, etc. La fuerza de esa - unión entre el Ag y el Ac, se mide por el cambio de energía libre. Los -- experimentos con anticuerpos IgG anti-D,  $\bar{C}$ ,  $\bar{e}$ , E y anti-K indican que la fuerza de unión entre estos anticuerpos y sus antígenos es cerca de 1/10 de la que se esperaría con uniones covalentes. La reacción Ag/Ac es re-versible de acuerdo con la ley de acción de masas. La reacción entre el - antígeno y el anticuerpo se puede escribir:



donde:

K1 y K2 = constante de asociación y disociación

De acuerdo a la ley de acción de masas en el equilibrio se tiene:

$$\frac{(\text{AgAc})}{(\text{Ag}) \times (\text{Ac})} = \frac{\text{K1}}{\text{K2}} = \text{K}$$

se nota que, entre más grande sea la constante de equilibrio, mayor será la cantidad de anticuerpo combinado con el antígeno. Se sabe que, la constante de equilibrio de un anticuerpo, es la "media de ajuste" del anticuerpo al antígeno correspondiente y del tipo de unión entre estos: las uniones hidrofílicas, dan una mayor afinidad que los puentes de hidrógeno. Cuando la constante de equilibrio es alta, la unión entre el antígeno y el anticuerpo, será más difícil de romper. [9, 11]

La constante de equilibrio se verá afectada por el pH, la fuerza iónica y la temperatura, los cuales deben ser cuidados para que la reacción antígeno-anticuerpo específica se efectúe adecuadamente. Los factores que influyen en la aglutinación de los eritrocitos por sus anticuerpos específicos, es la fuerza de repulsión entre los eritrocitos o el potencial Zeta; este potencial sólo permite el acercamiento entre ellos a 8 nm. y 18 nm. entre la membrana celular, por lo que, moléculas tan grandes como los anticuerpos IgM (30 nm) pueden aglutinarlos fácilmente, mientras que la IgG (12 nm entre sus sitios de unión), no puede normalmente hacerlo y sólo se une a su Ag. específico, por lo que, se necesitan mecanismos potenciadores para que la aglutinación ocurra y pueda observarse; además de lo anterior, la aglutinación de los eritrocitos también se incrementa con la centrifugación. [9, 11]

Los medios empleados para efectuar la reacción antígeno-(células del panel)-anticuerpo (suero del paciente o donador), en este trabajo son: el medio salino y la centrifugación inmediata (s/r), que identifica a los anticuerpos de clase IgM principalmente, del sistema ABO: salina a 22 °C

por 60' (S22) con la que se puede demostrar la aglutinación con anticuerpos IgM, ejemplo, anti-Lewis, -P, etc; el medio enzimático (bromelina Br), con la que se demuestran anticuerpos IgG del sistema Rh-Hr, -Kidd, etc; - la reacción de la Antiglobulina Humana o suero de Coombs (AGH), con la -- que se pueden demostrar la mayoría de los anticuerpos IgG contra los antf genos de los grupos sanguíneos eritrocitarios. [9, 11]

#### UTILIDAD DEL PANEL EN LA INVESTIGACION DE ANTICUERPOS.

El constante estímulo en los pacientes con elementos sanguíneos - (leucocitos, plaquetas, eritrocitos, plasma) provoca la respuesta inmune y la aparición de anticuerpos contra ellos. Eso puede suceder en pacientes politransfundidos y/o múltiparas. El estudio de estos pacientes desde el punto de vista inmunohematológico, referente a anticuerpos contra - eritrocitos, requiere de un panel de glóbulos rojos para establecer la -- presencia de anticuerpos irregulares en el suero del paciente, su especificidad y su fuerza aglutinante. [11] Uno de los casos en que se utiliza este panel es por ejemplo, el de la Aloimmunización materno-fetal.

#### Ejemplo de un caso típico:

Se trata de un paciente adulto, de sexo femenino, de 32 años de - edad, con antecedentes de 3 gestaciones y 3 partos, con diagnóstico de -- aloimmunización materno-fetal y producto icterico grave, no se encontró - en el laboratorio de su hospital sangre compatible, ni para ella, ni para la exsanguíneo transfusión del recién nacido.

**Resultados:**

Grupo sanguíneo materno = O, Rho (D) negativo

Grupo sanguíneo de recién nacido = O, Rho (D) positivo

Coombs directo en los eritrocitos del niño = positivo 1:128

(puntaje 58)

INVESTIGACION DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO CON TECNICAS SALINA RÁPIDA Y SALINA COOMBS, EN EL SUERO MATERNO Y EN LOS ERITROCITOS DEL RECIÉN NACIDO.

Células conocidas del fenotipo	Ac's del suero materno			Ac's eluidos de los eritro- citos del recién nacido	
	S/r	S/37	S/C	S/r	S/C
O, Rho pos. P pos	1+	-	2+	-	2+
O, Rho pos. P neg	-	-	2+	-	2+
O, Rho neg. P pos	1+	-	-	-	-
O, Rho neg. P neg	-	-	-	-	-

S/r = prueba salina rápida

S/37 = prueba salina incubada a 37°C, durante 60 min.

S/C = prueba de Coombs o de la Antiglobulina Humana.

Ac's = anticuerpos

**Conclusiones:**

En el suero de la madre se demostraron con el panel de células, - dos anticuerpos: uno salino frío de especificidad anti-P, de clase IgM. El segundo anticuerpo, se demostró con la prueba de AGH, la especificidad es anti-D de clase IgG.

En el caso que se ilustra, se observa que en el suero de la madre hay dos anticuerpos, uno que pasa placenta (anti-D, Rho, de clase IgG), y el otro de especificidad anti-P de clase IgM, que no pasa placenta; éste está impidiendo artificialmente, la compatibilidad de la sangre que necesita el producto para ser exsanguinado al interferirle en la prueba cruzada con el suero materno. El anticuerpo anti-P es un anticuerpo frío, no tiene trascendencia clínica, el que la tiene es el anti-D, por lo que hubiera bastado estudiar el problema oportunamente con un panel de células y cualquier sangre O, Rho negativo cruzada hasta Coombs hubiera sido la correcta para la madre y para la exsanguíneo transfusión del niño.

Caso clínico II:

La destrucción incrementada de los eritrocitos puede llevar a la Anemia Hemolítica. Las causas de este fenómeno son múltiples, entre ellas la inmunológica o sea, aquella destrucción mediada por anticuerpos, como por ejemplo la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN), y la Anemia Hemolítica Auto e Iso inmune (AHA e AHI). [9, 11, 14]

La EHRN es debida a la destrucción de los eritrocitos del niño por un anticuerpo específico (IgG) producido en la madre y transferido por vía transplacentaria al bebé. [9, 11, 14]

En nuestro medio el número de recién nacidos con Enfermedad Hemolítica, en los que la madre no esta presente para ser estudiada, es común, por lo que, el estudio para la posible exsanguíneo transfusión del bebé en caso de necesitarla, se debe llevar a cabo en la sangre de éste.



La prueba empleada para estudiar la EHRN por aloanticuerpos maternos, es la de la antiglobulina directa o prueba de Coombs directa, aunque la positividad de esta prueba, "no establece algunas veces, el diagnóstico de la Enfermedad Hemolítica".(10)

La EHRN por aloanticuerpos, no sólo es debida por anticuerpos del sistema ABO, por anti-D (Rho), si no que, se ha establecido sin duda alguna que, virtualmente, cada uno de los anticuerpos de clase IgG que puede producir la madre, teniendo el niño el antígeno específico, puede causar dicha hemólisis (11, 14) por ejemplo, anti-C, anti-E, anti-K, anti-Fy, etc. La prueba de Coombs directa indica que el anticuerpo está en la superficie del eritrocito, pero de ninguna manera esta permite saber su especificidad, de aquí que la separación, elusión o despegado, del anticuerpo del eritrocito y su estudio con el panel de células conocidas, nos dará en la gran mayoría de los casos la certeza de la especificidad. (11)

#### Caso clínico típico.-

Paciente masculino, de 14 horas de nacido, con posible EHRN, grupo O, Rho (D) positivo, Coombs directo: positivo 1:64 (puntaje 60), hemoglobina: 10 gr/dl, bilirrubina indirecta: 25 mg/dl.

Grupo materno: O, Rho (D) positivo.

Exsanguinado el día anterior, con sangre O, Rho (D) negativo, se incrementó la bilirrubina indirecta de 18 a 25 mg/dl, después de la exsanguíneo transfusión.

INVESTIGACION DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO DESPEGADO DE LOS  
ERITROCITOS DEL RECIEN NACIDO CON UN SEMIPANEL.

fenotipo del semipanel en este caso sólo el sistema Rh-Hr	técnicas empleadas	
	S/R	S/C
1) CCDee	neg	neg
2) ccDEE	pos	pos
3) cdeee (*)	pos	pos
4) CcDee	pos	pos

(\*) La primera exsanguíneo transfusión se hizo con sangre de este fenotipo.

Conclusiones:

La especificidad del anticuerpo despegado fué anti-E. El niño no debió exsanguinarse con sangre Rho (D) negativo (\*) porque esta contiene antígeno E (cde/cde). Se exsanguinó posteriormente con la sangre de fenotipo igual que la sangre No 1 (CCDee), que no contiene el antígeno E. La recuperación del recién nacido fué satisfactoria.

Caso clínico III.-

En la Anemia Hemolítica Autoinmune (AHAI), el autoreconocimiento de lo propio esta alterado, por lo que, el individuo fabrica anticuerpos contra sus propios antígenos. Estos anticuerpos, en este caso particular, pueden dirigirse prácticamente contra todos los antígenos eritrocitarios, ejemplo, el sistema ABO, el sistema Rh-Hr, el sistema Ii, el sistema MNSsP etc. El conocimiento de la especificidad de estos anticuerpos, así como,-

la clase de inmunoglobulina a la que pertenecen, ayuda al diagnóstico y - tratamiento de esta entidad, por lo que dentro de los exámenes de labora- torio que se tienen previstos para su estudio, se encuentran la especifi- cidad del anticuerpo, investigada a través de un panel de células [11].

Caso clínico típico.-

Paciente de sexo femenino, de 38 años de edad, con diagnóstico -- clínico de Anemia Hemolítica Adquirida por alfa metil dopa. Hemoglobina : 11.0 mg/dl, Hematocrito: 33%, Concentración media de hemoglobina: 33.

Resultados:

Grupo sanguíneo: 0, Rho (D) positivo. Coombs directo: positivo -- 1:64 (puntaje 42 ); clase de anticuerpo pegado al eritrocito IgG, IgM con fracción C3 del sistema de Complemento.

ESTUDIO DEL ANTICUERPO DESPEGADO DE LOS ERITROCITOS DEL PACIENTE

fenotipo de la células del panel en este caso sistema RH-Hr e I	técnicas empleadas		
	Resultados		
	s/r	s/37	s/c
1) CCDee I	4+	(+)	(+)
2) ccDEE I	4+	+	+
3) ccdee I	4+	+	3+
4) CcDee I	4+	+	2+
5) CcDEe I	4+	+	2+
6) CCDEE I	4+	+	neg
7) CcDEe i	neg	neg	2+

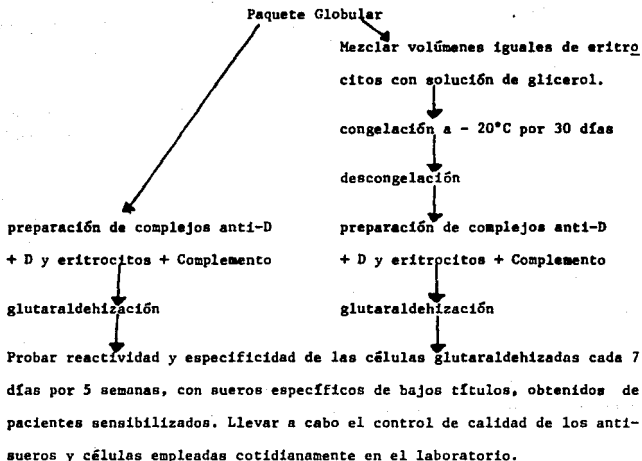
**Conclusiones:**

Se encontró una mezcla de anticuerpos, uno de especificidad anti-I, que fija complemento y un anti- $\bar{c}_e$  del sistema Rh-Hr, el caso se rotuló como Anemia Hemolítica "Autoinmune" probablemente por medicamentos.

# C A P I T U L O   I I I .

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1) D I S E Ñ O   D E L   E X P E R I M E N T O .



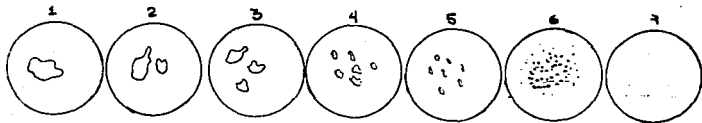
### 3.2) M A T E R I A L

Se emplearon 5 paneles, cada uno con 13 muestras de diferentes donadores A1, A2, B y O; semipanel, que consta de los 5 primeros fenotipos - del panel; células sensibilizadas con complemento y células no sensibiliza

das; células sensibilizadas con anti-D (Rho) y células no sensibilizadas. - De todas estas células se tomaron dos muestras; una se glutaraldehizó inmediatamente después de obtenida, a estas se les denominó como células frescas o F, y la otra muestra se congeló con glicerina durante 30 días, a estas se les denominó como células congeladas o C. Después de este período se trataron igual que las células F.

Cada grupo de células, se probaron cada 7 días durante 5 semanas, con anticuerpos específicos, investigando su aglutinabilidad con los antisueros sin diluir y posteriormente, con diluciones de estos, estimando el grado de aglutinabilidad en cruces y mediante cómputo de la puntuación, -- (ver figura #2)

FIGURA # 2. GRADACION DE AGLUTINACIONES.



- 1.- 4 cruces equivale a 12 puntos
- 2.- 3 cruces equivale a 10 puntos
- 3.- 2 cruces equivale a 8 puntos
- 4.- 1 cruz equivale a 5 puntos
- 5.- (+) cruz equivale a 3 puntos
- 6.- graniento (g) equivale a 1 punto
- 7.- negativo

### 3.3) M E T O D O

#### Preparación de eritrocitos recién obtenidos o F.

- Obtener el paquete globular de sangre total en ACD.
- Lavar tres veces el paquete globular con solución salina fisiológica al-0.9% (SSF).
- Tomar los eritrocitos lavados y agregar la solución de glutaraldehído.
- Dejar reposar a temperatura ambiente 1 hora.
- Lavar los eritrocitos glutaraldehizados 3 veces con buffer de fosfatos - salinos.
- Resuspender en medio de conservación CPDA-I.
- Almacenar a 4°C.

#### Preparación de células sensibilizadas con anti-D (Rho).

- Tomar dos muestras de eritrocitos de diferentes fenotipos (R1r y rr ).
- Lavar ambas muestras con SSF.
- Añadir a las dos muestras, una dilución de 1:32 del suero anti-D (Rho).
- Incubar a 37°C las dos muestras durante 30 min.
- Glutaraldehizar ambas alícuotas.

#### Preparación de los eritrocitos sensibilizados con complemento (C).

- Tomar dos muestras de eritrocitos lavados.
- En una añadir suero fresco sin descomplementar (control positivo).
- En la otra añadir suero descomplementado previamente a 56°C (control negativo).
- Dejar incubar ambas a temperatura ambiente durante 30 min.
- Glutaraldehizar.

Preparación de los eritrocitos congelados y descongelados.

- Tomar los eritrocitos lavados y añadir la solución de glicerina al 20%
- Mezclar suavemente.
- Añadir la solución de glicerina al 60%
- Mezclar suavemente
- Congelar rápidamente en hielo seco y acetona (-70°C)
- Almacenar durante 30 días a -20°C
- Después de este tiempo, descongelar los eritrocitos lentamente (temperatura ambiente).
- Lavar una vez con solución de glicerina al 16%
- Lavar una vez con solución de glicerina al 8%
- Lavar una vez con solución de glicerina al 4%
- Lavar una vez con solución de glicerina al 2%
- Lavar tres veces con SSF al 0.9%
- Glutaraldehizar

Comprobación de la reactividad y especificidad de las células glutaraldehidizadas.

La comprobación de la reactividad y especificidad de las células, glutaraldehidizadas, se llevó a cabo en diferentes medios de reacción como son: salinos, enzimáticos, proteínicos y la reacción de Coombs o de la antiglobulina humana. Los medios enzimáticos utilizados fueron: ficina y bromelina. El medio proteico utilizado fue: albúmina.

Las temperaturas utilizadas fueron: temperatura ambiente (Ta) y 37°C (37). Para mayor facilidad de identificar los tubos cuando se usa



albúmina marcar como; A/Ta y A/37, cuando es ficina y bromelina marcar -- como F/Ta, F/37 y B/Ta, B/37 respectivamente, y los tubos de Coombs se -- marcan como S/C.

Un ejemplo de la utilidad de éstos medios, se muestra en los cuadros siguientes:

células	Técnicas usadas				
	S/r	S/37	S/C	A/Ta	A/37
R/r	neg	neg	4+	+	3+
rr	neg	neg	neg	neg	neg

COMPROBACION DE LAS CELULAS DUFFY (Fy) Y KELL (K).

células	Técnicas usadas					
	F/r	F/37	F/C	B/r	B/37	B/C
Fy <sup>a</sup>	neg	neg	4+	neg	neg	4+
Fy <sup>b</sup>	neg	neg	4+	neg	g	4+
K	neg	neg	3+	neg	neg	4+

Reacción de salina rápida (S/r):

- Agregar dos gotas de antisuero a una gota de eritrocitos panel, al 2.5%
- Centrifugar 30 seg a 3400 rpm y leer en cruces y cómputo.

Reacción salina 37°C (S/37):

- Incubar a 37°C por 30 min; centrifugar y leer.

- 30 -

Reacción de salina Coombs (S/C):

- Lavar los eritrocitos 3 veces con SSF y agregar 1 gota de suero de Coombs
- Centrifugar y leer.

Reacción de albúmina rápida (A/r):

- Agregar dos gotas de albúmina a 1 gota de eritrocitos diluidos a 2.5%, -- más dos gotas del suero problema.
- Centrifugar 90 seg a 3400 rpm y leer.

Reacción de albúmina 37°C (A/37):

- Incubar a 37°C, los tubos con albúmina rápida, 20 min.
- Centrifugar y leer.

Reacción de Bromelina o Ficina rápida (BoF/r):

- Agregar dos gotas de la suspensión de eritrocitos al 2.5%.
- Centrifugar 30 seg a 3400 rpm y leer.

Reacción de Bromelina o Ficina a 37°C (BoF/37):

- Incubar a 37°C por 15 min los tubos con Bromelina o Ficina.
- Centrifugar 30 seg a 3400 rpm y leer.

#### 3.4) R E S U L T A D O S.

En los cuadros número 1 al 4, se muestran resultados de la reactividad de los eritrocitos A1, A2, B y O, glutaraldehizados y conservados a 4°C. durante 35 días.

En el cuadro número 1 se anota la reactividad contra el suero sin diluir; en los siguientes se hacen las diluciones para comprobar la reactividad de las células contra sueros anti-A, anti-B y anti-AB. Se comprueba la conservación adecuada de la reactividad de los antígenos ABO. (Ver cuadros #1, #2, #3 y #4).

La reactividad de los antígenos D,  $\bar{c}$ ,  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ ,  $Jk^b$  y K se conserva casi uniforme durante el lapso de 35 días conservados a 4°C y contra los mismos sueros específicos probados sin diluir, (Ver cuadro #5) y en diluciones. (Ver cuadro #6).

La investigación de la presencia de anticuerpos en el sobrenadante del complejo anti-D + glóbulo rojo D fué negativa, durante el lapso de 35 días (Ver cuadro #7).

La reactividad de los complejos glóbulo rojo D + anti-D y de glóbulos rojos con C3 (fracción 3 del complemento), contra el suero de Coombs correspondiente, se conserva durante los 35 días en el primer caso; en cambio, en el segundo se pierde el C3 alrededor del 14 día de almacenamiento a 4°C. ( Ver cuadros #8 y #9).

En el cuadro #10, se presentan resultados del control de calidad de los sueros hemoclasificadores y del suero antiglobulina humana empleados en el trabajo cotidiano.

Las células glutaraldehidizadas, se emplearon en el trabajo cotidiano.

no durante más de 35 días, dando resultados similares durante todo este --- tiempo (Ver cuadro #10). Cuando se realizó este trabajo no se continuó más de 35 días por falta de material biológico; pero después otras personas del BCS del CMN, IMSS siguieron este estudio y se comprobó que duran mas de 35 días.

Resultados sensiblemente iguales se obtuvieron con células congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 días, descongeladas después de este tiempo y glutaraldehyzadas.

C U A D R O # 1

REACTIVIDAD DE LAS CELULAS GLUTARALDEHIZADAS CONSERVADAS A 4°C HASTA POR 35 DIAS CONTRA SUEROS ESPECIFICOS.

suero anti	vs antígeno	reactividad contra células conservadas.					
		d í a s					
		0	7	14	21	28	35
A	A1	4+	4+	4+	4+	4+	4+
A	A2	3+	3+	3+	3+	3+	3+
O	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg
B	B	4+	4+	4+	4+	4+	4+
O	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg
AB	A1	4+	4+	4+	4+	4+	4+
AB	A2	3+	3+	3+	3+	3+	4+
AB	B	4+	4+	4+	4+	4+	4+
O	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg

## C U A D R O # 2

REACTIVIDAD DE LAS CELULAS A1 Y A2 GLUTARALDEHIZADAS CONSERVADAS POR 35 DIAS, PROBADAS CON SUEROS ANTI-A EN DILUCIONES.

DIA	Ag	D I L U C I O N E S							cómputo en pun- taje.
		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
R*	A1	4+	4+	3+	2+	2+	+	g	60
	A2	2+	3+	2+	+	neg	neg	neg	54
	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
7	A1	4+	3+	2+	2+	2+	(+)	neg	55
	A2	3+	2+	2+	+	neg	neg	neg	31
	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
14	A1	4+	3+	3+	2+	2+	+	+	58
	A2	3+	2+	(+)	g	neg	neg	neg	22
	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
21	A1	4+	4+	3+	2+	2+	(+)	neg	53
	A2	3+	2+	2+	(+)	neg	neg	neg	29
	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
28	A1	4+	3+	3+	2+	+	(+)	neg	51
	A2	3+	3+	2+	+	g	neg	neg	34
	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
35	A1	4+	3+	2+	2+	+	(+)	g	47
	A2	3+	2+	(+)	g	neg	neg	neg	22
	0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--

Ag= antígeno

R\*= células recién obtenidas

g= graniento

## C U A D R O # 3.

REACTIVIDAD DE LAS CELULAS B GLUTARALDEHIZADAS, CONSERVADAS POR 35 DIAS,  
PROBADAS CON SUEROS ANTI-B EN DILUCIONES.

DIA	Ag	D I L U C I O N E S							cómputo en puntaje.
		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
R*	B	4+	3+	2+	2+	+	g	neg	42
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
7	B	4+	3+	3+	2+	2+	+	neg	51
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
14	B	4+	2+	2+	2+	+	(+)	neg	44
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
21	B	4+	3+	2+	2+	(+)	g	neg	46
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
28	B	4+	3+	3+	2+	+	neg	neg	45
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
35	B	4+	4+	2+	2+	+	(+)	neg	48
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--

Ag= antígeno

R\*= células recién obtenidas

g= graniento

REACTIVIDAD DE LAS CELULAS A1, A2 Y B GLUTARALDEHIZADAS, CONSERVADAS POR 35 DIAS, PROBADAS CON SUEROS ANTI-B EN DILUCIONES.

DIA	Ag	D I L U C I O N E S								cómputo en punteaje.
		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	
R*	A1	4+	4+	4+	3+	2+	2+	+	g	68
	A2	3+	2+	2+	+	+	neg	neg	neg	36
	B	4+	4+	3+	2+	+	+	neg	neg	50
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
7	A1	4+	3+	3+	2+	2+	2+	+	+	67
	A2	3+	2+	2+	+	+	g	neg	neg	37
	B	4+	3+	3+	2+	+	(+)	neg	neg	48
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
14	A1	4+	4+	4+	3+	2+	2+	+	+	71
	A2	3+	2+	2+	+	+	neg	neg	neg	36
	B	4+	3+	3+	2+	+	(+)	neg	neg	48
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
21	A1	4+	3+	4+	3+	2+	2+	+	+	70
	A2	3+	3+	2+	2+	+	neg	neg	neg	41
	B	4+	3+	2+	2+	+	(+)	neg	neg	46
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
28	A1	4+	4+	3+	3+	2+	2+	+	(+)	64
	A2	3+	2+	2+	+	+	neg	neg	neg	36
	B	4+	3+	2+	2+	+	(+)	neg	neg	46
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--
35	A1	4+	3+	3+	2+	2+	2+	+	+	66
	A2	3+	3+	2+	+	+	g	neg	neg	39
	B	4+	3+	2+	2+	+	(+)	neg	neg	46
	O	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	--

Ag= antígeno

R\*= células recién obtenidas

g= graniento



## CUADRO # 5

REACTIVIDAD DE LAS CELULAS GLUTARALDEHIZADAS, CONSERVADAS -  
 POR 35 DIAS 4°C, CONTRA SUEROS ESPECIFICOS.

sueros anti	vs antígeno	reactividad contra células con-					
		servadas por 35 días.					
		d í a s					
		0	7	14	21	28	35
D	D	4+	4+	4+	4+	4+	4+
c	c	4+	4+	4+	4+	4+	4+
Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>a</sup>	4+	4+	4+	4+	4+	4+
Fy <sup>b</sup>	Fy <sup>b</sup>	4+	4+	4+	4+	4+	4+
Jk <sup>b</sup>	Jk <sup>b</sup>	3+	3+	3+	3+	3+	3+
K	K	4+	4+	4+	4+	4+	4+

## CUADRO # 6

COMPUTO DE LA REACTIVIDAD DE LAS CELULAS GLUTARALDEHIZADAS -  
 CONSERVADAS HASTA 35 DIAS, CONTRA SUEROS ESPECIFICOS CONOCIDOS

dfa	D	c	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>b</sup>	K
1	70	46	38	26	31	43
7	68	43	40	26	30	43
14	71	40	37	24	29	40
21	69	44	35	23	29	39
28	68	46	39	25	27	40
35	68	44	35	23	30	40

C U A D R O # 7

INVESTIGACION DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPO ANTI-D, DESPEGADO DEL COMPLEJO GLOBULO ROJO + ANTI-D

D I A S	1	7	14	21	28	35
	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

C U A D R O # 8

REACTIVIDAD DE LAS CELULAS DEL PANEL GLUTARALDEHIZADAS SENSIBILIZADAS CON ANTI-D Rho (IgG) Y CON C. CONTRA LOS SUEROS ANTIGLOBULINA HUMANA ANTI-IgG + C3 Y SOLO ANTI-C3.

suero anti vs antígeno		reactividad contra complejos conservados por 35 días					
		1	7	14	21	28	35
IgG + C3	GR + anti-D	4+	4+	4+	4+	4+	4+
C3	GR + C3d	4+	4+	4+	4+	4+	4+

GR = Glóbulos rojos

C = Complemento.

C U A D R O # 9

COMPUTO DE LA REACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS GLOBULO ROJO D + ANTI-D Y GLOBULO ROJO + C

dia	GRD + anti-D	GR + C3
R*	-	-
7	28	18
14	22	5
21	32	6
28	31	neg
35	33	neg

R\* = Células recién obtenidas

GRD = Glóbulos rojos D

GR = Glóbulos rojos

C = Complemento

C U A D R O # 10

RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DE LOS SUEROS HEMOCLASIFICADORES ANTI-A Y/O -B, ANTI-D (RhO) Y SUERO ANTI GLOBULINA HUMANA, EMPLEADOS EN EL TRABAJO COTIDIANO.

No de lote	fecha de caducidad	suero anti	vs células de fenotipo conocido			
			A1	A2	B	O
398-0	VI-1990	anti-A	3-4+	2-3+	neg	neg
512	X-1990	anti-AB	4+	3+	3+	neg
34C1	III-1989	anti-B	neg	neg	3-4+	neg

No de lote	fecha de caducidad	suero anti	células R1r	células rr
37CDB	V-1990	anti-D (RhU)	2-3+	neg
		sol. control	neg	neg

No de lote	fecha de caducidad	suero de Coombs	células Coombs positivo							
			1/1	1/2	1/4	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
843A	I-1990	( A G H )	3+	2+	+	(+)	R	neg	neg	neg
			células Coombs negativo							
consumo de Coombs			1+	2+	+	(+)	R	R	neg	neg

AGH= anti globulina humana

## C A P I T U L O I V

### D I S C U S I O N

Se ha reportado que el tratamiento de las células con glutaraldehído produce enlaces covalentes de los grupos amino protéico, sin alterar los antígenos de la membrana de la célula, ni la propiedad de fijar los anticuerpos. (1)

En este trabajo se aplicó esto para mejorar la estabilidad de los eritrocitos, comprobándose que los antígenos ABO, y otros de la membrana eritrocitaria (D,  $\bar{c}$ ,  $Fy^a$ ,  $Jk^b$ , K), se conservan adecuadamente un mínimo de días, tiempo que duró este estudio.

Por otra parte se encontró que los complejos glóbulo rojo D + anti-D permanecieron estables por lo menos 35 días, mientras que el complejo -- glóbulo rojo + C3 sólo durante 14 días. En este caso no solamente se estabilizan lo sitios antigénicos de la membrana, sino que los complejos Antígeno/Anticuerpo IgG se mantienen estables en este lapso, a diferencia de los conservados en CPDA-I sin endurecimiento de la membrana.

## C A P I T U L O        V

### R E S U M E N

En el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional, del Instituto Mexicano del Seguro Social, se ha preparado hasta la fecha, un panel que está a una concentración de eritrocitos muy alta (50%). Dicho panel requiere para su uso, un tiempo de preparación muy prolongado, perdiéndose parte del material biológico. Después de cierto tiempo de preparado hay desprendimiento de anticuerpos de los complejos IgG y C3.

Por lo cual, en el presente trabajo, las células de fenotipo conocido, frescas, congeladas durante 30 días y descongeladas se glutaraldehicizaron "endureciendo" su membrana sin alterar su antigenicidad [1], y la unión de los anticuerpos específicos. Una parte de ellas, R1r, se sensibilizaron con anti-D (Rho) y otra parte con la fracción C3 del complemento. Se resuspendieron a una concentración más baja (10%), de la que actualmente se usa.

De esta forma se logró eliminar el tiempo prolongado de preparación antes de su uso; y se preservó el material biológico. También se probó que, los anticuerpos IgG no se despegaban evitándose lavados extras, de esta forma se eliminan falsos negativos de la reacción de Coombs.

## C A P I T U L O      V I

### C O N C L U S I O N E S

- El tratamiento de los eritrocitos con glutaraldehído favoreció el endurecimiento de la membrana y la estabilización de los antígenos, lo que permite el empleo de las células de fenotipo conocido por más de 35 días a concentraciones más bajas que las actualmente empleadas y prelavadas.

- Los antígenos A, B, D,  $\bar{C}$ , Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>b</sup> y K conservan su reactividad casi inalterada por el mismo lapso de tiempo.

- Simultáneamente se encontró que los complejos antígeno/anticuerpo glóbulos rojos R1r + anti-D se mantienen estables por más de 35 días.

- Los complejos con C3 se mantienen solamente 14 días.

- Las células congeladas, descongeladas y glutaraldehizadas, muestran patrón de comportamiento similar al de las células anteriormente mencionadas: lo que permite mayor flexibilidad en el empleo de estas células.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Aurameas, S. COUPLING OF ENZYMES TO PROTEINS WITH GLUTARALDEHIDE. ---  
Immunochemistry. 6, 43-52; 1969.
- 2) Ballas S.K. SPECTRIN AUTOANTIBODIES IN NORMAL SERUM AND IN POLYCLONAL BLOOD GROUPING. British Journal of Haematology. 71, 137; 1989.
- 3) Byrd, Leavell Dr, Oscar Thorup Jr. Dr. HEMATOLOGIA CLINICA. 4a. ed. Editorial Interamericana. México, 1986.
- 4) Carl Cohen. THE MOLECULAR ORGANIZATION OF RED CELL MEMBRANE SKELETON. --  
Sem. Hematol. Vol. 22(3); p. 11, 1983.
- 5) Dunfor and Bowley. TECHNIQUES AND BLOOD GROUPING. 2a. ed.; Vol. II; -  
p. 287, 1967.
- 6) Herrera Emilio. BIOQUIMICA. Editorial Interamericana. Pag.1108; México, 1986.
- 7) Hilleman R.C., C.A. Frinch. EL ERITROCITO. Editorial El Manual Moderno - S.A. de C.V. México, 1986.
- 8) Holtman E; A.B. Novkoff. ESTRUCTURA Y DINAMINA CELULAR. Editorial Interamericana. México, 1987.
- 9) Linares Jesús. INMUNHEMATOLOGIA Y TRANSFUSION. 1a. ed. Caracas, Venezuela, 1986.
- 10) Mollison P.L.; Engelfriet C.P. BLOOD TRANSFUSION IN CLINICAL MEDICINE.- Editorial Blacvel Scientific Publication. Oxford, London 1969.
- 11) Mollison P.L.; Engelfriet C.P. BLOOD TRANSFUSION IN CLINICAL MEDICINE.- Editorial Blacvel Scientific Publication. 8a. ed. Oxford, London, 1987.
- 12) Quintanar Elisa y cols. ANUARIO DE ACTUALIZACION EN MEDICINA HEMATOLOGICA. Vol. IX. México, 1977.



- 13) Rojas William. INMUNOLOGIA. Fondo Educativo Interamericano. 6a. ed. México, 1985.
- 14) Sanger and Davis. BLOOD GROUPING IN MAN. 6a. ed. Editorial Blackwell, - Oxford, 1975.

## A P E N D I C E

### 8.1) PREPARACION DE LA SOLUCION ACUOSA DE GLUTARALDEHIDO AL 2.5%

#### Material:

- Matraz Erlenmeyer de 1000 ml
- Balanza analítica
- Agua Destilada
- Frasco color ambar de 100 ml

#### Reactivos:

- Glutaraldehído 2.5 gr.

Disolver el glutaraldehído en 1000 ml de agua destilada.

### 8.2) PREPARACION DEL AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINOS A pH DE 7.2

#### Material:

- Balanza analítica
- Matraz Erlenmeyer de 1000 ml.

#### Reactivos:

- Cloruro de Sodio (NaCl) 8.5 gr.
- Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 6.87 gr.
- Fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2.48 gr.

Disolver estos reactivos en 1000 ml. de agua destilada.

8.3) ELABORACION DE LA SOLUCION DE CITRATO-FOSFATOS PARA LA SOLUCION DE GLICERINA.

Material:

- Balanza analítica
- Matraz Erlenmeyer de 1000 ml

Reactivos:

- Citrato de Potasio ( $K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$ ) 19.4 gr.
- Fosfato de Sodio ( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ) 3.1 gr.
- Fosfato disódico ( $Na_2HPO_4$  anhidro) 6.37 gr.

Disolver los reactivos en 600 ml de agua destilada.

- Preparar las soluciones a las concentraciones deseadas, de glicerina con esta solución.

8.4) MEDIO DE CITRATO-FOSFATO-DEXTROSA-ADENINA-I (CPDA-I)

Material:

- Matraz aforado estéril
- Bomba para filtrar
- Porta filtro con filtros de 0.2  $\mu$ , 0.4  $\mu$ , 0.8  $\mu$ , y prefiltro estéril
- Balanza analítica

Reactivos:

- Citrato trisódico ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) 5.88 gr.

- Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	3.149	gr.
- Acido cítrico ( $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	0.55	gr.
- Adenina	0.08	gr.
- Inosina	0.35	gr.
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.040	gr.
- Cloranfenicol	0.33	gr.
- Sulfato de neomicina	0.10	gr.
- Albúmina bovina 22%	17.0	ml.

En una probeta graduada colocar los reactivos y aforar a un litro con agua destilada ajustando el pH a 7.3 con solución normal de NaOH.

Filtrar la solución en medio estéril.

#### 8.5) PREPARACION DEL REACTIVO DE SUCROSA FOSFATOS PARA LA FIJACION DEL -- COMPLEMENTO.

##### Material:

- Matraz Erlenmeyer de 1000 ml
- Balanza analítica.

##### Reactivos:

- Agua libre de Hierro	1 000	ml.
- Sucrosa	9.2	gr.
- Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	0.7098	gr.
- Fosfato sódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	0.6900	gr.

Disolver la sucrosa en 91 ml. de fosfato disódico y ajustar el pH-

con el fosfato sódico a 6.1.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

#### 8.6) GLUTARALDEHIZACION DE ERITROCITOS.

- En un matraz Erlenmeyer de 250 ml. colocar 100 volúmenes del amortiguador de fosfatos salinos.
- Agregar 4 volúmenes de los eritrocitos.
- Mezclar suavemente
- Añadir 20 volúmenes de la solución de glutaraldehído al 2.5%.
- Mezclar suavemente.
- Dejar a temperatura ambiente 1 hora.
- Después de este lapso de tiempo, lavar los eritrocitos glutaraldehizados tres veces con solución salina fisiológica al 0.9% (SSF), a 1200 rpm durante 20 minutos.
- Resuspender los eritrocitos lavados al 10%, en el medio de conservación CPDA-I.
- Almacenar los eritrocitos a 4°C.

#### 8.7) CONGELACION DE ERITROCITOS CON GLICERINA, DESCONGELACION Y GLUTARALDEHIZACION.

- En un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- Poner 1 volumen del paquete globular, previamente lavado tres veces con SSF.
- Agregar un volumen de la solución al 20 %
- Mezclar suavemente
- Agregar 1 volumen de solución de glicerina al 60%

- 50 -

- Mezclar suavemente
- Congelar en hielo seco y acetona (-70°C)
- Almacenar durante 30 días a -20°C
- Descongelar a temperatura ambiente
- Lavar una vez con cada una de las soluciones de glicerina a concentraciones decrecientes (16, 8, 4, 2 %).
- Por último, lavar tres veces con SSF, hasta la desaparición de hemólisis
- Glutaraldehizar como los eritrocitos frescos.

#### 8.8) OPSONIZACION DE ERITROCITOS POSITIVOS Y NEGATIVOS, CON ANTI-D (Rho)

- Hacer dos alícuotas; una con eritrocitos R1r (positivos) y otra con eritrocitos rr (negativos)
- Hacer una dilución 1:32 del suero anti-D (Rho), con solución salina fisiológica al 0.9%.
- Agregar 1 volumen de la dilución del suero anti-D (Rho), con 1 volumen de eritrocitos.
- Incubar 1 hora a baño maría a 37°C
- Glutaraldehizar
- Almacenar a 4°C.

#### 8.9) OPSONIZACION DE ERITROCITOS CONTROL POSITIVO Y CONTROL NEGATIVO CON COMPLEMENTO.

- Hacer dos alícuotas, con eritrocitos R1r; una para control positivo y otra para control negativo.

- Mezclar 5 sueros de diferentes personas de grupo O positivo. Hacer dos alícuotas; una con suero con complemento y otra con suero descomplementado a 56°C por 30 minutos.

- A la alícuota destinada para control positivo, agregar 8.5 volúmenes del reactivo de sucrosa fosfatos, más 1 volumen del paquete globular previamente lavado con solución salina, y 0.5 volumen del suero sin descomplementar.

- La alícuota destinada para control negativo, agregar las mismas cantidades de reactivos y suero, pero este debe ser descomplementado.

- Dejar incubar ambas alícuotas, a temperatura ambiente por 30 minutos

- Glutaraldehizar

- Almacenar.