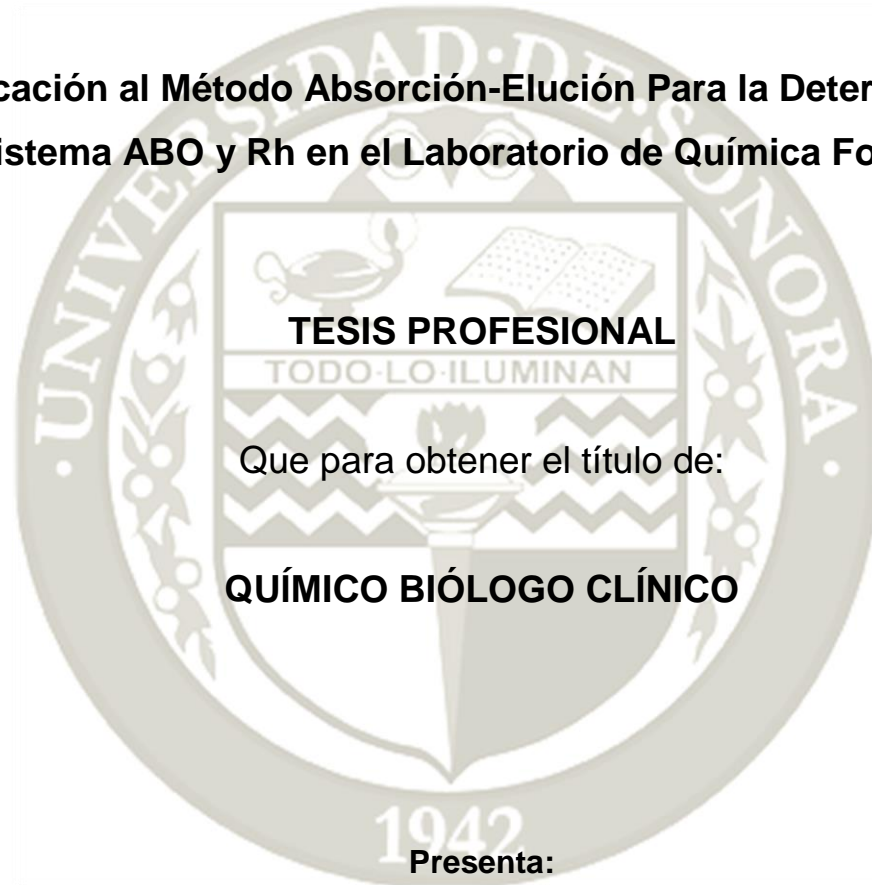


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“Modificación al Método Absorción-Elución Para la Determinación del Sistema ABO y Rh en el Laboratorio de Química Forense”



Alejandra Yadira Canizales Cornejo

Hermosillo, Sonora

Abril del 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| FORMA DE APROBACIÓN..... | 2 |
| DEDICATORIA | 3 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 4 |
| AGRADECIMIENTO ESPECIAL | 5 |
| LISTADO DE TABLAS | 7 |
| LISTADO DE FIGURAS | 8 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 9 |
| OBJETIVOS | 10 |
| General..... | 10 |
| Particulares..... | 10 |
| RESUMEN | 11 |
| I.INTRODUCCIÓN | 13 |
| II. ANTECEDENTES | 14 |
| 1. El Eritrocito..... | 15 |
| 1.1. Concentración de Eritrocitos..... | 15 |
| 2. Membrana Eritrocitaria..... | 17 |
| 2.1. Función de la Membrana | 17 |
| 2.2. Composición de la Membrana | 18 |
| 3. La Respuesta Inmunológica..... | 25 |
| 3.1. Tipos de Respuesta Inmunológica..... | 25 |
| 3.2 Inmunización por Antígenos del Grupo Sanguíneo..... | 25 |
| 3.3. La Reacción Antígeno-Anticuerpo en Inmunología..... | 26 |
| 3.4. Tipos de Reacción Antígeno-Anticuerpo..... | 28 |
| 3.5. Aglutinación..... | 29 |
| 3.6. Centrifugación | 35 |
| 3.7. Medios de Reacción | 35 |
| 3.8. Otros Factores que Interfieren en la Reacción Ag-Ac | 35 |
| 3.9. Conservación de los Sueros..... | 37 |
| 3.10. Lectura e Interpretación de la Reacción Ag-Ac..... | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Principios de Inmunohematología | 38 |
| 4.1. Antígenos..... | 39 |
| 4.2. Anticuerpos | 41 |
| 4.3. Anticuerpos de Grupo Sanguíneo | 42 |
| 5. Estudio de los Grupos Sanguíneos | 44 |
| 6. Sistema ABO | 45 |
| 6.1. Antígenos del Sistema ABO | 46 |
| 6.2. Estructura de los Antígenos del Sistema ABO | 47 |
| 6.3. Fenotipos ABO en diferentes poblaciones | 49 |
| 6.4. Herencia | 50 |
| 6.5. Genética | 51 |
| 6.6. Pruebas para Determinar el Grupo Sanguíneo ABO | 53 |
| 7. Sistema Rh..... | 55 |
| 7.1. Estructura del Complejo Rh y sus proteínas..... | 56 |
| 7.2. Clasificación Actual: Rh Positivo y Rh Negativo..... | 57 |
| 7.3. Fenotipo y Genotipo..... | 58 |
| 8. Técnicas Utilizadas Para la Determinación del Grupo Sanguíneo ABO y Rh en Manchas de Sangre Seca | 60 |
| 9. Métodos de Absorción-Inhibición y Absorción-Elución | 61 |
| III. METODOLOGÍA | 64 |
| 1. Obtención de Muestras Tipificadas Previamente | 64 |
| 2. Procedimiento | 64 |
| 3. Variantes de la técnica | 65 |
| 4. Interpretación de Resultados..... | 65 |
| IV. RESULTADOS | 66 |
| Identificación de Grupo sanguíneo ABO y Rh | 66 |
| V. DISCUSIONES | 70 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 72 |
| VII. RECOMENDACIONES..... | 73 |
| VIII. REFERENCIAS | 74 |
| IX. ANEXOS | 79 |

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios, por darme la fuerza y fe que he necesitado durante toda mi vida, y a lo largo de mi carrera universitaria; a mi familia, principalmente a mi mamá Graciela Cornejo Vega, por ser el mayor apoyo que tengo en mi vida, por luchar siempre por sacar adelante a sus hijos y siempre tener una sonrisa y palabras hermosas para nosotros; a mis hermanos José Cruz y Angélica Canizales Cornejo, que son mi mayor motivación para salir adelante, y a todos los miembros de mi familia por creer siempre en mí y en todo lo que puedo llegar a hacer, gracias por su apoyo y motivación.

Dios los bendiga y los cuide siempre, los quiero mucho.

Atte. Alejandra Yadira Canizales Cornejo

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron en la realización de mi trabajo, a todos aquellos que donaron su tubo de sangre para poder tener mis muestras, principalmente: José Manuel Gonzales (Gordo), Brenda Samaniego, Samuel Urbalejo (Sammy), la María Landavazos, Jazielh Acosta, Xóchitl Cárdenas, Sarahí López, Luis Esquer, Q.B. Arturo Valenzuela Coronado, Perito Criminalista Rubén Heriberto Martínez, Q.B. Eduardo Barreras Morales.

A todo el Departamento Servicios Periciales y Laboratorio de Química forense de la PGJE por su apoyo al trabajar con ustedes. Gracias a todas las químicas que me hechaban porras cuando llegaban en la mañana Q.B. Isabel, Q.B. Diana, Q.B. Ana Laura, Q.B. Luz María; no puede faltar Q.B. Erika Ruiz que pasó varias desveladas conmigo.

Gracias a todos mis maestros de la universidad, de todos me llevo un gran aprendizaje y hermosas experiencias, muy especialmente al M.C. Antonio Rascón y Dr. Aldo Arvizu, nunca olvidaré la confianza que depositaron en mí, sus consejos y sus enseñanzas.

Gracias a mis primeros amigos que tuve en la universidad, las primeras personitas en hablarme, por hacer que esos días no fueran tan difíciles, Brenda Samaniego, Ramsés Ramírez, Angélica López Vázquez, Claudia Gámez Quintanar.

Y a todos los demás amigos que fui haciendo durante la carrera, Gordo, Sammy, Vetito, Sarahí López, Luis Esquer, Víctor Hugo Rodríguez, Sué, Julio Lozano; a mis queridos compañeros de Comité de Graduación Ericka Pacheco, Ana Julia Lorh, Max Vidal, Nallely Ramírez, muchas gracias por todas las pláticas, convivencias que pasamos juntos.

Gracias a toda mi familia, por estar siempre apoyándome en todos los sentidos, son la mejor familia que me pudo haber tocado.

Y por último pero no menos importante a mis amigas, que siempre han estado conmigo apoyándome, Viridiana Rivera junto con su beba Valentina, Tania Duarte y Tania Blanchet gracias por esta amistad y esperemos que siga y siga con el paso de los años, las quiero mucho.

Mil gracias a todos por apoyarme en mi camino para cumplir este sueño.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Quiero agradecer muy especialmente al M.C. Antonio Rascón Careaga y a la Q.B Erika Ruiz García por haber confiado en mí para este proyecto, por apoyarme y alentarme para que lo realizara.

Muchas gracias maestro Antonio, el mejor director de tesis que hubiera podido tener, gracias por sus consejos, enseñanzas; por aceptar este reto junto conmigo, nunca voy a olvidar sus clases, y sus exámenes sorpresa que como me hacían sufrir; gracias por ser un excelente maestro y ser humano, éxito en todo lo que haga siempre.

Química Erika, mil gracias por haberme convencido de aceptar este proyecto, por las desveladas que nos pasamos, y por estar ahí siempre para apoyarme en todo, me encanto trabajar contigo, eres una gran maestra y ser humano, mil gracias y éxito en todo lo que venga.

Gracias a mis sinodales M.C. Lucila Rascón Durán y Q.B. Gabriela Zubiate Cabanillas por su apoyo y dedicación en este trabajo, estoy muy agradecida por haber tenido la oportunidad de conocerlas y trabajar con ustedes.

LISTADO DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|-------|---|--------|
| 1. | Número de moléculas de anticuerpos por glóbulo rojo necesarias para causar su aglutinación, de acuerdo a la clase IgG | 34 |
| 2. | Composición química y ubicación orgánica de algunos antígenos de grupos sanguíneos | 40 |
| 3. | Características más importantes de los anticuerpos de grupos sanguíneos | 43 |
| 4. | Especificidad de los anticuerpos de grupos sanguíneos más comunes | 43 |
| 5. | Generalidades de los grupos sanguíneos | 45 |
| 6. | Antígenos y Anticuerpos del Sistema ABO | 47 |
| 7. | Distribucion en porcentaje de los fenotipos ABO de acuerdo con la raza o grupo étnico | 49 |

LISTADO DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1. | Glóbulo Rojo, vista superior y lateral | 15 |
| 2. | Glóbulo Rojo y Hemoglobina | 16 |
| 3. | Membrana del Eritrocito | 19 |
| 4. | Glicoforina A, una proteína integral con un único dominio transmembranal | 20 |
| 5. | Superficie eritrocitaria (Anticuerpos y Antígenos) | 39 |
| 6. | Diagrama de los Isotipos de Inmunoglobulinas | 42 |
| 7. | Antígenos de membrana del Sistema ABO | 46 |
| 8. | Expresión de los genes ABO | 48 |
| 9. | Diagrama de los diferentes tipos de proteínas y glicoproteínas que conforman los grupos sanguíneos, de acuerdo con su integración con la membrana del eritrocito | 49 |
| 10. | Desarrollo de los antígenos del sistema ABO | 52 |
| 11. | Estructura de los antígenos del sistema ABO | 52 |
| 12. | Hemoclasificación | 53 |
| 13. | Diagrama de la molécula de Rh | 57 |
| 14. | Fundamento de la técnica de absorción-elución | 62 |

JUSTIFICACIÓN

En el estado de Sonora se ha visto la necesidad de técnicas más rápidas y eficientes en la identificación del grupo sanguíneo, en casos de homicidio, atentados, agresiones, etcétera, para poder emitir un dictamen en el menor tiempo posible, indicando si hay concordancia o no, con las muestras encontradas en la escena del crimen y entre los participantes del hecho; logrando con esto, agilizar los procesos legales.

OBJETIVOS

General

Modificar el método de absorción-elución para la determinación del grupo sanguíneo ABO y aplicarlo al sistema Rh (D).

Particulares

Evaluar las variables tiempo y temperatura en la técnica de absorción-elución para la determinación del grupo sanguíneo del sistema ABO y Rh (D).

Analizar la técnica de absorción-elución, probando simultáneamente, temperatura de refrigeración (4°C) y temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), en el proceso de la formación de complejo Ag-Ac para el antígeno (D).

Evaluar la funcionalidad de la técnica en diferentes periodos de refrigeración y temperatura ambiente: 3, 6, 9 horas c/u.

Evaluar si el antisuero anti-D puede ser utilizado diluido en la identificación del antígeno D y analizar los resultados.

Evaluar la estabilidad de los antígenos de los sistemas ABO y Rh en tiempo para su detección por este método.

RESUMEN

La biología forense involucra la identificación y comparación de seres vivos mediante el análisis de fluidos, tejidos y estructuras biológicas de las muestras forenses en la resolución de casos criminales. Una de las evidencias más importantes y más común en una escena de crimen son las manchas de sangre, que se pueden encontrar en diferentes soportes o sometidas a condiciones ambientales adversas, lo cual es importante para la resolución de aspectos relacionados con la ley (Bonnet, 1978; Gaensslen y col., 1989).

En manchas de sangre seca, las células se han roto y por lo tanto, las pruebas de aglutinación directa no son factibles; sin embargo, los antígenos del sistema ABO no se desnaturalizan tan rápidamente por la sequedad y se pueden identificar en este sistema durante algún tiempo, conservando la capacidad de combinarse con anticuerpos específicos. La formación de estos complejos antígeno-anticuerpo, es la base de todos los métodos empleados en la detección de antígenos en el estroma de las células rojas, en manchas de sangre seca; es decir, el problema se reduce a poner en evidencia la presencia de los antígenos presentes en los glóbulos rojos mediante reacciones de aglutinación con antisueros específicos.

La técnica de absorción-elución es actualmente la más satisfactoria para la determinación del sistema ABO en manchas de sangre seca y se reporta, que puede usarse también para el sistema Rh. Debido a esto, una de las principales necesidades del laboratorio de química forense, es realizar la misma técnica de absorción-elución utilizada para el sistema ABO, para la identificación del factor Rh, de una manera confiable y estandarizada (Franco, 2002).

El presente estudio describe la identificación de los grupos sanguíneos ABO y Rh por medio de la técnica de absorción-elución, manejando diversas variantes de la técnica original, como manejo simultaneo de las muestras en refrigeración y TA en el proceso de formación del complejo Ag-Ac para el antígeno Rh (D); periodos de tiempo en refrigeración y TA de 3, 6, 9 horas; diluciones en el antisuero anti-D para Rh, pruebas realizadas periódicamente durante cuatro meses, entre otras.

El análisis de dicha técnica indicó que para el sistema ABO (antígenos A y antígenos B), los resultados fueron constantes y reproducibles. Para los antígenos del sistema Rh (D), solamente en ciertos periodos se observaron resultados constantes y reproducibles; en algunas muestras, principalmente durante los primeros meses, los resultados indicaron aglutinación negativa, cuando debía ser positiva. La utilización de antisuero anti-D diluido fue descartado, debido a que no mostraron aglutinación en ninguna de las muestras. Se obtuvieron resultados

de aglutinación constante durante los cuatro meses de prueba, indicándonos con esto, que las muestras siguen siendo fiables o adecuadas hasta por 4 meses según este estudio.

En conclusión, el presente trabajo, demuestra que aplicando la técnica en refrigeración a 4°C, se obtienen resultados confiables y reproducibles para la identificación de los antígenos del sistema ABO y Rh. Para el sistema ABO, la identificación de los antígenos A y B, se llevó a cabo en los tres periodos de tiempo (3, 6, 9 horas). En el caso del sistema Rh, la identificación del antígeno Rh (D), se llevó a cabo, en los periodos de 6 y 9 horas. No se debe diluir el antisuero anti-D. La técnica resulto ser reproducible en muestras expuestas al medio ambiente hasta por 4 meses.

I. INTRODUCCIÓN

La biología forense involucra la identificación y comparación de seres vivos mediante el análisis de fluidos, tejidos y estructuras biológicas de las muestras forenses en la resolución de casos criminales (Gaensslen y col., 1989).

El reconocimiento, identificación, individualización y evaluación de la evidencia empleando métodos científicos para la resolución de aspectos relacionados con la ley, es de vital importancia. Una de las evidencias más importantes y más común en una escena de crimen son las manchas de sangre, que se pueden encontrar en diferentes soportes o sometidas a condiciones ambientales adversas, lo cual es importante para la resolución de aspectos relacionados con la ley (Bonnet, 1978).

Las muestras sanguíneas tienen un alto contenido de eritrocitos y estos a su vez de hemoglobina, los métodos de detección de muestras sanguíneas se basa en detectar este último elemento (Sheehan y col., 1994).

Uno de los problemas que con frecuencia se presenta en los laboratorios de criminalística, es el de determinar el grupo sanguíneo en sangre seca, la cual se encuentra impregnando prendas de vestir o sobre la superficie de objetos relacionados con algún hecho de sangre (Franco, 2002; Villegas y col., 2005).

La determinación del grupo sanguíneo, en la práctica forense, aporta a los tribunales, en muchas ocasiones, elementos de prueba muy importantes tanto para señalar si una mancha de sangre recogida del lugar de los hechos puede provenir de la víctima o bien del victimario; o con mayor certeza, indicar que no puede haber analogía entre la sangre encontrada y la de la víctima o la de su presunto agresor. Revisadas las técnicas, que para este efecto existen hasta la fecha, se pensó que la más fácil de utilizar y la más conveniente desde el punto de vista inmunológico es la de absorción-elución (Franco, 2002).

En muestras de sangre seca, el problema es más simple ya que se reduce a poner en evidencia la presencia de los antígenos presentes en los glóbulos rojos mediante reacciones de aglutinación con antisueros específicos.

La técnica de absorción-elución es actualmente la más satisfactoria para la determinación del sistema ABO en manchas de sangre seca y se reporta, que puede usarse también para el sistema Rh. Debido a esto, una de las principales necesidades del laboratorio de química forense, es realizar la misma técnica de absorción-elución para el sistema ABO en el sistema Rh, de una manera confiable y estandarizada.

II. ANTECEDENTES

En 1901, Landsteiner descubrió la existencia del sistema ABO, al observar que la sangre humana tenía características individuales que se manifestaban por reacciones de aglutinación, pues encontró que los eritrocitos o glóbulos rojos de unas personas eran aglutinados o agrupados por el suero sanguíneo de solamente algunos individuos. Este descubrimiento dio origen al hallazgo de otros grupos como el MN, el P, el sistema Rh y muchos más.

El antígeno Rho (d) fue caracterizado en 1939 por Levine y Stetson, quienes encontraron el anticuerpo en el suero de una madre, cuyo niño tuvo la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido. Recibió su nombre en 1940 cuando Landsteiner y Weiner inmunizaron conejos con eritrocitos del mono Rhesus y dicho antisuero aglutinaba los eritrocitos del 85% de la población (Rho positivo). Sin embargo, hace algunos años se observó que en realidad Landsteiner y Weiner no habían descubierto el anticuerpo Rh, sino otro anticuerpo que fue denominado LW. Posteriormente, se observó que los pacientes Rh negativo desarrollaban Anti-Rh solamente al ser inmunizados (Transfusión, embarazo, etc.) (Grispan, 1983).

En manchas de sangre seca, las células se han roto y por lo tanto, las pruebas de aglutinación directa no son factibles. Sin embargo, los antígenos del sistema ABO no se desnaturalizan tan rápidamente por la sequedad y se pueden identificar en este sistema durante algún tiempo, conservando la capacidad de combinarse con anticuerpos específicos. La formación de estos complejos antígeno-anticuerpo, es la base de todos los métodos empleados en la detección de antígenos en el estroma de las células rojas, en manchas de sangre seca; es decir, el problema se reduce a poner en evidencia la presencia de los antígenos presentes en los glóbulos rojos mediante reacciones de aglutinación con antisueros específicos (Franco, 2002).

Para poder comprender mejor la manera en que se lleva a cabo la unión antígeno-anticuerpo, y las técnicas con las que podemos corroborar dicha unión, necesitamos conocer el eritrocito, sus antígenos y anticuerpos correspondientes, desde su composición bioquímica, sus características inmunológicas y los factores que los afectan.

1. El Eritrocito

El eritrocito es un disco bicóncavo de más o menos 7 a 7.5 μM de diámetro y de 80 a 100 fL de volumen (Figura 1). Tiñe de rosa a naranja debido a la gran cantidad de proteína acidófila intracelular (la hemoglobina). La célula ha perdido su RNA residual y sus mitocondrias, así como algunas enzimas importantes; por tanto, es incapaz de sintetizar nuevas proteínas o lípidos. El promedio de vida normal del eritrocito es de 100 a 120 días (Mckenzie, 2000).

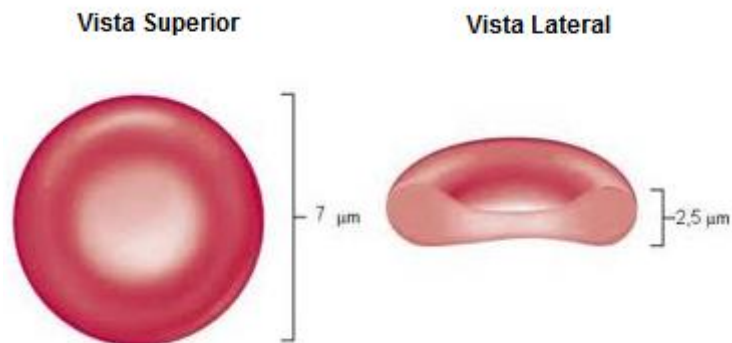


Figura 1. Glóbulo Rojo, vista superior y lateral. (Blog de Anatomía de la sangre humana [Internet], 2012)

1.1. Concentración de Eritrocitos

La concentración normal de eritrocitos varía de acuerdo con la edad, sexo y ubicación geográfica. Una cuenta eritrocitaria (5.2×10^{12} /L) y concentración de hemoglobina elevada (19 g/dL) durante el nacimiento van seguidas por una disminución gradual, la cual continúa hasta muy cerca del segundo o tercer mes de vida extrauterina. En ese momento, los valores de eritrocitos y hemoglobina alcanzan una disminución de hasta 3.5×10^{12} /L y 10 a 11 g/dL, respectivamente.

Durante el nacimiento y los siguientes días, la cuenta de eritrocitos es alta, en promedio aumenta 3.2%. Dentro de la primera semana, la cuenta disminuye a 0.5% y se mantiene baja hasta el segundo mes. A partir del segundo mes, después del nacimiento, existe una elevación gradual de hemoglobina y concentración de eritrocitos hasta alcanzar concentraciones de

adulto, los cuales se logran aproximadamente a los 17 años de edad. Los hombres tienen concentraciones de eritrocitos más altas que las mujeres, pero esta diferencia no se vuelve aparente sino hasta la adolescencia (más o menos 12 años). Personas mayores (de más de 70 años de edad) tienen concentraciones eritrocitarias dentro del rango de referencia, $4.52-5.90 \times 10^{12}/L$ para hombres y $4.10-5.10 \times 10^{12}/L$ para mujeres (Henry, 2005).

Las personas que viven en altitudes elevadas tienen concentraciones eritrocitarias promedio más altas que aquellas que viven a nivel del mar. Las disminuciones en la presión parcial del oxígeno atmosférico a altitudes elevadas producen una elevación fisiológica de los eritrocitos. Esto es un intento del organismo para proporcionar a los tejidos una oxigenación adecuada. La figura 2 es una representación de un glóbulo rojo, con una molécula de hemoglobina y 4 de oxígeno (Mckenzie, 2000).

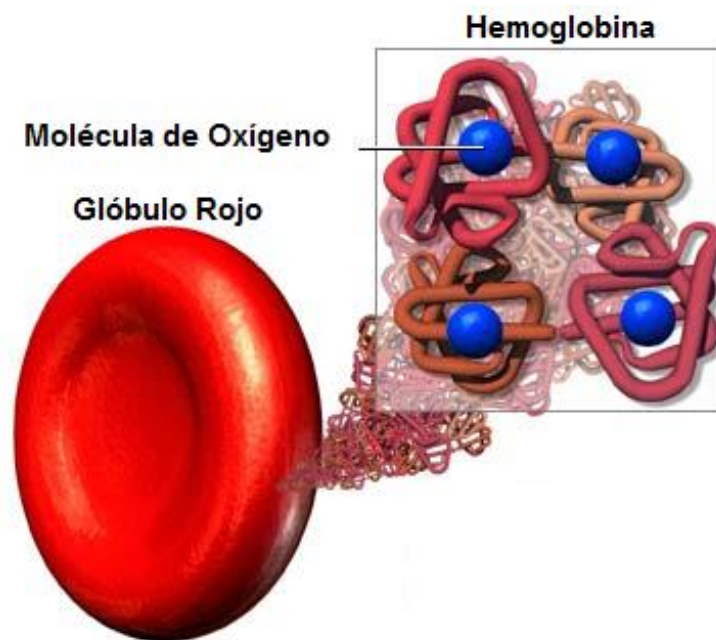


Figura 2. Glóbulo Rojo y Hemoglobina. (ADAM Enciclopedia Medica [Internet], 2009)

2. Membrana Eritrocitaria

De todas los diversos tipos de membranas, la membrana plasmática de los eritrocitos (glóbulos rojos) de los seres humanos, es la más estudiada y comprendida (Figura 3). La obtención de estas células es de bajo costo y en grandes cantidades, ya que están presentes como células individuales y no necesitan ser separadas de un tejido complejo. Las membranas intactas de los eritrocitos, pueden ser purificadas, colocándolos en una solución salina hipotónica; las células responden a este shock osmótico, absorbiendo agua hasta hincharse, como el área de la superficie aumenta, la célula se vuelve permeable, y su contenido, compuesto principalmente por hemoglobina, comienza a salir, dejando solamente la membrana plasmática. Una vez que la membrana está aislada, las proteínas pueden solubilizarse y separarse, usando electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de un detergente iónico dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), permitiendo de esta manera, su estudio individual (Karp, 2010).

2.1. Función de la Membrana

Una membrana intacta normal, es absolutamente esencial para la función del eritrocito y su supervivencia. Hay anomalías heredadas o adquiridas en la membrana, en la estructura de la membrana o en su composición, las cuales pueden producir anemia grave.

Cerca del inicio del siglo XX, los investigadores empezaron a establecer la complejidad de la membrana del eritrocito. Hedin realizó experimentos que demostraron las propiedades osmóticas y la permeabilidad del eritrocito. Encontró un aumento en el volumen eritrocitario en soluciones hipotónicas y en soluciones tales como la urea o el glicerol. Sin embargo, soluciones de cloruro de sodio o sucrosa producían un encogimiento de la célula. Las propiedades antigénicas de la membrana se reconocieron muchos años después por Landsteiner. Él descubrió que el suero humano provocaba aglutinamiento de los eritrocitos en distintos individuos. Originalmente dividió a estos individuos en tres grupos A, B y C, de acuerdo a los patrones de aglutinación eritrocitaria con el suero humano. En la actualidad, se emplea la terminología de grupo A, B y O para identificar los grupos sanguíneos en estos patrones de aglutinación. Cientos de otros antígenos eritrocitarios se han identificado en los últimos 80 años. Muchos se han descubierto a partir de 1940 (Mckenzie, 2000).

Debido a que el contenido de la célula está completamente rodeado por la su membrana

plasmática, toda comunicación entre la célula y el medio exterior debe ser mediado por esta estructura. En este sentido, la membrana plasmática tiene doble función; por un lado debe conservar los materiales disueltos en la célula, de manera que no debe permitir fugas hacia el ambiente exterior, mientras que por otro lado, debe permitir el intercambio necesario de materiales, dentro y fuera de la célula. La bicapa lipídica de la membrana es ideal para evitar la pérdida de solutos cargados y polares de la célula. En consecuencia, debe hacerse una vía especial para permitir el movimiento de nutrientes, iones, productos de desecho y otros compuestos, dentro y fuera de la célula. Básicamente, hay dos medios para el movimiento de sustancias a través de la membrana: pasiva por difusión o activa por un proceso de transporte acoplado de energía. Ambos tipos de movimientos llevara al flujo de un ion u otro componente particular. El termino flujo indica que el movimiento de la sustancia es hacia la célula (flujo de entrada) y hacia afuera de la célula (flujo de salida), pero que una excede a la otra (Karp, 2010).

2.2. Composición de la Membrana

La membrana eritrocitaria es un complejo proteínico-fosfolípido compuesto por 52% de proteína, 40% de lípido y 8% de carbohidrato. Esta estructura química y su composición controlan las funciones de transporte y flexibilidad de la membrana, y determinan las propiedades antigénicas. (Figura 3).

2.2.1. Composición lipídica. Aproximadamente el 95% del contenido lípido de la membrana, consiste en cantidades iguales de colesterol no esterificado y fosfolípidos. El colesterol influye en el área de la superficie de la célula y es responsable de la permeabilidad pasiva de cationes de la membrana.

Aunque están presentes algunas cantidades menores de otros fosfolípidos, como la lisolecitina, existen cuatro tipos principales de fosfolípidos que se encuentran en la membrana eritrocitaria: fosfatidiletanolamina (cefalina), fosfatidilcolina (lecitina) esfingomielina y fosfatidilserina.

Una pequeña parte de los lípidos de membrana son glucolípidos en forma de flucoesfingolípido. Hay dos grupos de glucoesfingolípido, cerebrósido y gangliósidos, los cuales son derivados glucosados de las ceramidas. Los glucolípidos son responsables de las propiedades antigénicas de la membrana (Mckenzie, 2000).

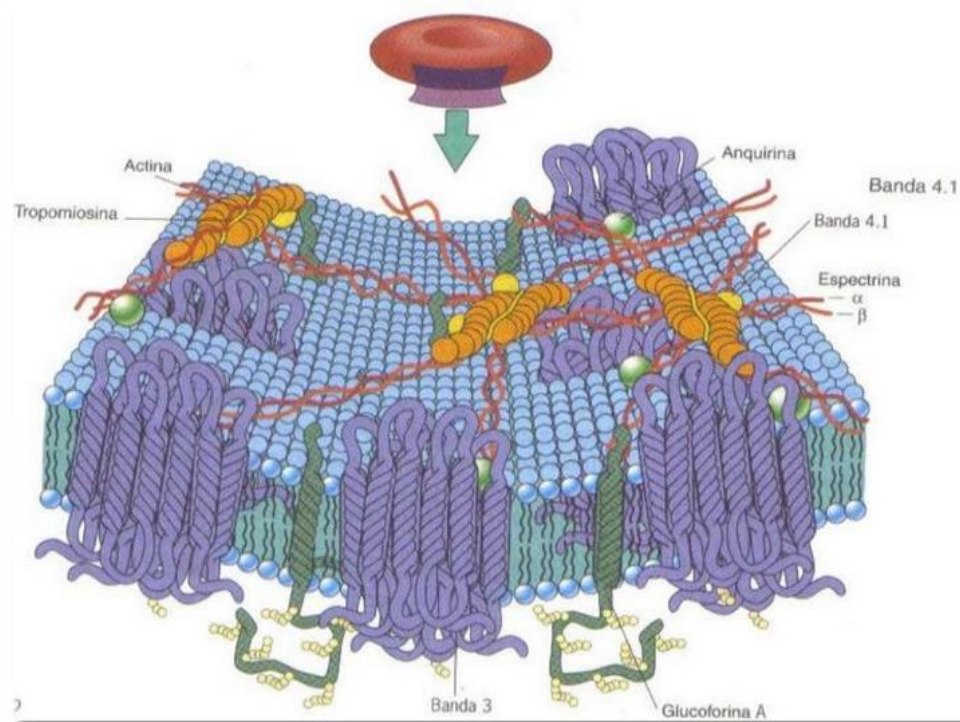


Figura 3. Membrana del eritrocito. (Cell and Molecular Biology, Concept and Experiment, Karp G, 2010)

2.2.2. Composición proteínica. Las proteínas de membrana del eritrocito son de dos tipos: proteínas integrales, que están firmemente enlazadas en la doble capa de lípidos, y las proteínas periféricas, las cuales están fuera del complejo lípido en el lado citoplasmático de la membrana, pero adherido a los lípidos de membrana o a las proteínas integrales mediante ligaduras iónicas y de hidrógeno. Ambos tipos de proteína de membrana son sintetizados durante el desarrollo celular (Mckenzie, 2000).

Las proteínas integrales más abundantes son, las llamadas proteína banda 3 y glucoforina A. La proteína banda 3 (Proteína de intercambio de iones), denominada así por ser la tercera banda que aparecía a partir de la banda superior de una corrida en la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), está presente como un dímero compuesto por dos subunidades idénticas (un homodímero). Cada subunidad atraviesa la membrana al menos una docena de veces y contiene una cantidad relativamente pequeña de carbohidratos (6-8% del peso de la molécula). Las proteínas de banda 3 sirven como un canal de intercambio pasivo de

aniones a través de la membrana (intercambio de Cl por bicarbonato). Se han asociado con el envejecimiento celular, la generación del antígeno de senescencia celular, unión de IgG, remoción celular y el mantenimiento de la integridad celular. Una de las funciones fundamentales del dominio N-terminal de la banda 3 es el anclaje de la membrana eritrocitaria al citoesqueleto subyacente. El extremo amino terminal se une a la hemoglobina, proteínas 4.1 y 4.2, anquirina y varias enzimas glucolíticas. Por lo tanto, la banda 3 constituye el elemento central de un macrocomplejo de proteínas integrales y periféricas en la membrana del eritrocito (Murray, 2009; Arce y Villaescusa, 2005).

La primera proteína de membrana, en tener su secuencia de aminoácidos determinada, fue la Glicoforina A. La disposición de la cadena de polipéptidos de glicoforina A en la membrana plasmática es mostrada en la figura 4 (Otras glicoforinas relacionadas, como B, C, D y E, están presentes en la membrana en menores concentraciones). Así como la banda 3, la glicoforina A está presente en la membrana como un dímero; a diferencia de la proteína de banda 3, cada subunidad de glicoforina A atraviesa la membrana solo una vez, y contiene una cubierta de carbohidratos muy espesa, que consiste en 16 cadenas de oligosacáridos, los cuales conforman el 60% del peso de la molécula, y sobresalen desde la superficie del eritrocito. (Karp, 2010; Murray, 2009).

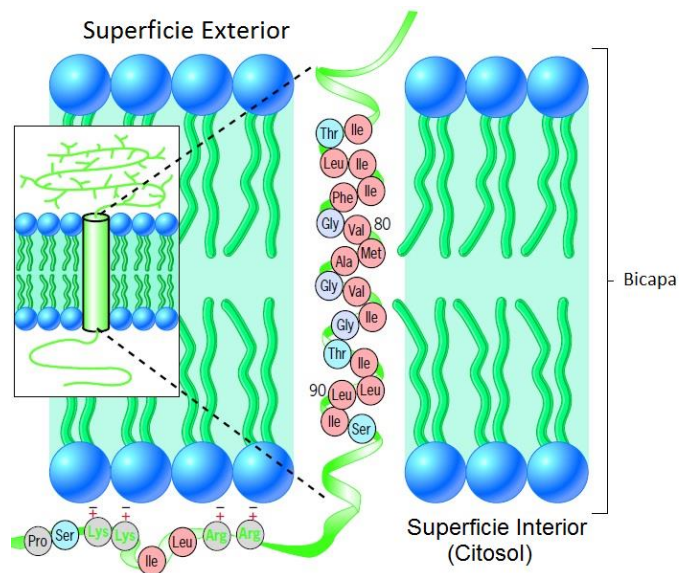


Figura 4. Glicoforina A, una proteína integral con un único dominio transmembranal. (Cell and Molecular Biology, Concept and Experiment, Karp G, 2010)

Se cree que la función principal de la glicoforina, deriva del gran número de cargas negativas transmitidas en el ácido siálico, que por lo regular es el azúcar del extremo terminal de cada cadena de carbohidrato. Debido a estas cargas, los glóbulos rojos se repelen entre ellos, con lo cual se evita que las células se agrupen mientras circulan a través de los pequeños vasos del cuerpo. Cabe destacar que las personas que carecen de glicoforina A y B en sus glóbulos rojos no muestran efectos negativos debido a la ausencia de dichas glicoforinas. Por otro lado, las proteínas de banda 3, en estos individuos están mayormente glicosiladas, aparentemente para compensar las cargas negativas faltantes, necesarias para prevenir la interacción entre las células. El extremo carboxilo terminal se extiende hacia el citosol y se une a la proteína 4.1, que a su vez se une a la espectrina.

La glicoforina también es el receptor utilizado por el protozoario que causa la malaria, ya que proporciona una ruta de entrada en los glóbulos rojos. El polimorfismo de esta proteína, es el fundamento del sistema de grupos sanguíneos. Las diferencias en la secuencia de aminoácidos de glicoforinas determina si una persona tiene el grupo sanguíneo MM, MN o NN (Karp, 2010; Murray, 2009).

La anquirina es una proteína de forma piramidal que se une a la cadena β de la espectrina, y también a la proteína banda 3, lo que asegura la fijación de la espectrina a la membrana. La actina se une a la espectrina y estabiliza las uniones entre las dos subunidades, existe en los eritrocitos como filamentos cortos de doble hélice; el extremo cola de dímeros de espectrina se une a actina, y esta a su vez a la proteína 4.1, formando así, el complejo proteína 4.1-espectrina-actina, ayudando a estabilizar dicha unión.

Las proteínas periféricas de la membrana plasmática del eritrocito están localizadas en la superficie interna y constituyen un esqueleto de membrana fibrilar que juega un papel muy importante en la determinación de la forma bicóncava de los eritrocitos. El esqueleto de la membrana puede estabilizar dominios dentro de la membrana que encierra a determinados grupos de proteínas de membrana, y puede restringir considerablemente el movimiento de estas proteínas. El mayor componente del esqueleto es una proteína fibrosa alargada, llamada espectrina. La espectrina es un dímero de aproximadamente 100 nm de longitud, el cual consiste en una subunidad α y una subunidad β , que se entrelazan una alrededor de la otra. Las regiones de la cabeza de los dímeros de espectrina, se asocian para formar tetrámero; las colas se asocian a oligómeros de actina, que pueden unirse a varios tetrámeros de espectrina. Por otro lado, también está unida a la superficie interna de la membrana por medio de enlaces no covalentes, a otra proteína periférica, llamada anquirina, que a su vez, está unida de forma no covalente, a un dominio citoplasmático de una molécula de banda 3. Los filamentos de

espectrina están organizados en arreglos hexagonales y pentagonales; esta red de dos dimensiones, se construye, mediante la vinculación de ambos extremos de cada filamento de espectrina, a un grupo de proteínas, que incluyen un filamento corto de actina y tropomiosina, proteínas que suelen participar en actividades contráctiles (Karp, 2010).

Si las proteínas periféricas son removidas del eritrocito, la membrana se fragmenta en pequeñas vesículas, lo cual indica, que se requiere de la red de proteínas interior para mantener la integridad de la membrana. Los glóbulos rojos deben ser altamente deformables, resistentes y capaces de soportar las fuerzas de cizallamiento, las cuales tienden a separarlos. La red de espectrina y actina le da a la célula la fuerza, elasticidad y flexibilidad necesaria para llevar a cabo sus funciones.

Otro componente de la membrana que vale la pena mencionar por su efecto sobre la membrana es el calcio. La mayor parte del calcio intracelular (80%) se encuentra en relación con la membrana del eritrocito. El calcio se mantiene en una concentración intracelular extremadamente baja por la actividad de bomba ATP (Mckenzie, 2000; Karp, 2010).

En los eritrocitos el calcio, es un elemento crucial para la regulación, la función y la programación de muerte y remoción de los eritrocitos del sistema circulatorio. Como en otras células, el calcio intracelular libre en el eritrocito es regulado en forma muy precisa por un complejo sistema de homeostasis del calcio. Particularmente en los eritrocitos esta homeostasis requiere una regulación estrecha, debido a que pequeños incrementos en esta concentración citoplasmática de calcio ocasionan cambios que incluyen su muerte celular programada (eriptosis).

En las células, el incremento de calcio intracelular libre puede generarse por varios mecanismos que modifican el influjo de calcio transmembranal: i) Canales de calcio operados por voltaje (VOC del inglés "voltaje open channels"), los cuales permiten el rápido influjo masivo de calcio hacia el citosol tras una despolarización de la membrana plasmática, ii) Canales de calcio operados por ligandos (ROC del inglés "receptor open channels"), controlados por varios antagonistas (por ejemplo, adrenalina), que también abre el canal y permite el influjo de calcio al interior, iii) Liberación de calcio de los reservorios intracelulares, en los que el influjo de calcio a través de la membrana plasmática, puede a su vez disparar la liberación de calcio almacenada en una serie de reservorios intracelulares como lo es el retículo endoplásmico, la mitocondria y el aparato miofibrilar (Quintanar y Calderón, 2007).

La entrada de calcio al citoplasma se realiza principalmente a través de canales de calcio presentes en la membrana plasmática, y la concentración de calcio intracelular libre se mantiene normalmente a tan bajos niveles mediante la interacción del calcio con otras proteínas

acarreadoras o amortiguadoras de calcio. De tal forma que alteraciones en esta precisa regulación de calcio intracelular libre que sobrepasen esta capacidad amortiguadora de calcio en las células, pueden alterar drásticamente la fisiología celular.

En el caso del eritrocito, como célula no excitable sin núcleo y sin orgánulos, la importancia del calcio intracelular libre fue ignorada durante mucho tiempo. Es importante recordar que los eritrocitos no cuentan con orgánulos intracelulares, lo cual imposibilita para emplear los reservorios intracelulares en el control de calcio intracelular libre, hecho que simplifica el manejo y el estudio de los efectos del calcio intracelular libre en estas células.

Los sistemas de entrada de calcio en los eritrocitos no han sido totalmente caracterizados. Se ha demostrado la entrada de calcio al eritrocito por canales catiónicos no selectivos dependientes del estado de óxido-reducción del eritrocito, ya que se ha observado que el daño oxidativo, es decir, el incremento de la condición oxidante sobre la antioxidante en el eritrocito, caracterizada básicamente por una disminución de la concentración glutatión reducido, lo cual abre permeabilidades no específicas a cationes, permitiendo el incremento de calcio intracelular libre y empleando este incremento como un sistema efector del daño oxidativo para inducir respuesta en la célula. Por otro lado para mantener el estado estacionario de la concentración de calcio intracelular libre en el eritrocito se requiere la salida del mismo de manera eficiente, para ello el eritrocito cuenta con la ATPasa de calcio dependiente de magnesio, tipo PMCA4 (debido a que se encuentra en la membrana plasmática y es una isoforma tipo 4 la que se encuentra en los eritrocitos humanos) y es activada por calmodulina. El incremento de calcio intracelular libre se une a la calmodulina y se activa la afinidad de la ATPasa para su salida, por lo cual la retención de calcio por amortiguadores intracelulares solo depende de la capacidad de formación de algunas sales con cloro y fosfato, y la unión a algunas proteínas, que a su vez están limitadas por la propia concentración de calcio miofibrilar (Quintanar y Calderón, 2007; Karp, 2010).

El calcio intracelular libre afecta la elasticidad, la estabilidad, la forma, el volumen, la estructura y algunas de las funciones intracelulares del eritrocito. Estabiliza el citoesqueleto a través del complejo calcio-calmodulina, manteniendo la estructuración espectrina-actina y espectrina-anquirina. De este modo, un incremento en el calcio intracelular libre induce una serie de cambios tales como: i) reducir el volumen celular, ii) aumentar la fragilidad de la membrana, iii) alterar la estructura y organización del citoesqueleto, activando proteasas específicas para el citoesqueleto, lo cual altera la morfología de los eritrocitos, generando los llamados equinocitos en los que se reduce la afinidad haciendo más rígida la estructura, aumentando así las posibilidades de ruptura en las presiones capilares. A concentraciones de

calcio intracelular mayores a $0.1 \mu\text{M}$ la constante de unión de calcio-calmodulina reduce la afinidad de la proteína 4.1 a la región espectrina-actina, lo cual conlleva a un debilitamiento de la red del citoesqueleto del eritrocito. También se ve afectado el dominio citoplasmático de la banda 3 y su unión al complejo espectrina-anquirina, debilitando aún más la trama de citoesqueleto y afectando la elasticidad y estructura del eritrocito (Quintanar y Calderón, 2007).

3. La Respuesta Inmunológica

De acuerdo a Roitt, los fundamentos de la inmunología son: el reconocimiento de lo extraño, la memoria y la especificidad. El resultado de dichos procesos confiere protección al individuo (inmunidad), lograda mediante su exposición a infecciones bacterianas o virales, es decir, que no forman parte de su estructura celular. El primer contacto con el agente infeccioso imprime en el individuo una información (memoria) que le permitirá reconocer y atacar a ese agente cuando de nuevo se lo encuentre en el futuro. Esta protección que se ha establecido, está dirigida solamente contra el agente original infectante (especificidad). La respuesta del organismo ante un antígeno extraño (respuesta inmune) podrá ser afectada por las propiedades del antígeno, la dosis y la ruta de administración, el destino metabólico del antígeno en el huésped y otros factores no bien definidos inherentes a este último (Roitt y Delves, 2011).

3.1. Tipos de Respuesta Inmunológica

Cuando un antígeno entra en el organismo, puede provocar dos tipos de respuesta:

- a) Una respuesta humoral, en la cual se sintetizan anticuerpos en las células plasmáticas, que son liberados en el plasma y otros fluidos orgánicos.
- b) Una respuesta celular, en donde los linfocitos participan en la denominada inmunidad mediada por células, para producir efectos biológicos, tales como la hipersensibilidad retardada o de rechazo de tejidos transplantados.

3.2 Inmunización por Antígenos del Grupo Sanguíneo

La aloinmunización (isoimmunización), es la producción de anticuerpos por un organismo, en respuesta a la introducción de antígenos provenientes de otro diferentes, pero de la misma especie. El recién nacido no posee aloanticuerpos de grupos sanguíneos, pero unos pocos meses después, fabricará anti-A y/o anti-B, si los antígenos correspondientes, están ausentes de los glóbulos rojos. Estos tipos de anticuerpos son conocidos como naturales, porque no ha existido un estímulo antigénico que los genere. Se ha demostrado, que estos anticuerpos, probablemente, se desarrollan como resultado de la exposición ambiental a antígenos, estrechamente relacionados con la estructura química de los grupos sanguíneos; por ejemplo,

la *Escherichia coli* tiene en su membrana un antígeno muy parecido al grupo sanguíneo B (Linares, 1986; Arbeláez, 2009).

Otros anticuerpos naturales que se encuentran a menudo son anti-I, anti-Lewis, anti-P, anti-M y anti-N; esto sugiere, que existen elementos en el ambiente que poseen determinantes antigénicos en común con las sustancias I, Lewis, P y MN, presentes en la membrana del glóbulo rojo. Los anticuerpos de esta categoría generalmente son del tipo IgM y reaccionan a temperaturas muy por debajo de los 37°C.

En general, los anticuerpos son el resultado de una respuesta inmunológica del organismo a un antígeno extraño, pero por costumbre, se denominan anticuerpos inmunes solamente a los anticuerpos de grupos sanguíneos que se desarrollan después de una estimulación bien definida, como lo es, por ejemplo, una transfusión o el embarazo. Siguiendo al estímulo inicial, los anticuerpos del tipo IgM son los primeros en aparecer, seguidos muy pronto por los IgG. Ambos tipos de anticuerpos, producidos en estas condiciones, reaccionan mejor a 37°C que a temperaturas más bajas (Arbeláez, 2009).

Los anticuerpos del sistema ABO (anti-A y anti-B) son los únicos que se encuentran normalmente en los humanos, según el antígeno que esté presente en sus glóbulos rojos; por lo tanto, son anticuerpos esperados. Los anticuerpos de grupos sanguíneos de cualquier otra especificidad, que se produzcan con o sin estímulo determinado son denominados irregulares, atípicos o inesperados (Linares, 1986).

3.3. La Reacción Antígeno-Anticuerpo en Inmunología

La reacción entre el antígeno y su anticuerpo correspondiente, puede llevarse a cabo *in vivo* o *in vitro*. La reacción *in vivo*, generalmente coincide con la invasión del organismo por antígenos extraños, contra los que reaccionan los anticuerpos, como sucede en la reacción hemolítica transfusional; o mediante transferencia pasiva de anticuerpos, como es el caso de la enfermedad hemolítica del recién nacido. En estados de autoinmunidad la reacción *in vivo* puede causar enfermedades, la neutropenia inmune, etcétera.

La reacción *in vitro* es de particular importancia porque ella permite que tanto los antígenos como los anticuerpos puedan ser determinados y estudiados en el laboratorio. La naturaleza específica de estas reacciones depende de muchas variables, relacionadas con la clase de anticuerpos, las condiciones de reacción y en particular, con ciertas características del antígeno. (Linares, 1986).

Algunos principios generales rigen la reacción antígeno-anticuerpo, entre ellos cabe señalar los siguientes:

1. Especificidad, es decir, que el anticuerpo reacciona solamente con su determinante antigénico.
2. Reaccionan las moléculas enteras, esto es, que no se produce intercambio de partes o fracciones, ni se forma un nuevo producto.
3. La unión del antígeno con el anticuerpo es firme pero reversible, es decir, que bajo las condiciones apropiadas, tanto uno como el otro se pueden recuperar, sin que hayan cambiado.
4. Es un fenómeno de superficie, que no altera la estructura primaria de las partes reaccionantes.
5. Las partes reaccionantes (antígenos y anticuerpos) se combinan en proporciones variables, dependiendo de las condiciones del experimento. Esta característica, es la diferencia con la reacción química, en la cual, la proporción de los elementos es siempre exacta.
6. El tiempo en que se produce la reacción es variable, a veces muy corto tomando menos de un minuto, pero que en otras circunstancias bien conocidas requiere de un tiempo mayor.

La reacción antígeno-anticuerpo ocurren en dos fases o etapas; en la primera, el antígeno se combina con el anticuerpo (interacción físico-química) y en la segunda, posiblemente a través de cambios electroquímicos, y de atracción entre fuerzas moleculares con cargas eléctricas positivas y negativas, se producen complejos antígeno-anticuerpo. Las fases generalmente se superponen en tiempo, pero en la medida en que se forman los complejos, intervienen ciertas condiciones de reacción inherentes al tipo de antígeno y del anticuerpo involucrados, pero en particular, es importante el tamaño del antígeno (Rojas, 2006).

Los anticuerpos son inmunoglobulinas y por lo tanto, son solubles; su tamaño molecular, por consiguiente, es de menor importancia en este sentido. Los antígenos pueden ser relativamente pequeños o grandes, o aún más importante, ser parte de una estructura colosal como los eritrocitos, leucocitos, células tisulares o bacterias. Por esta razón, el tamaño del antígeno es de importancia capital en la determinación de la naturaleza física del complejo antígeno-anticuerpo (Linares, 1986).

La interacción específica de antígenos y anticuerpos conduce a la formación de asociaciones macromoleculares denominadas complejos inmunes, los cuales pueden ser disociados en sus componentes básicos (antígenos y anticuerpos), por altas concentraciones salinas, pH extremos y detergentes. Ello indica que la interacción antígeno-anticuerpo involucra enlaces no covalentes y, por lo tanto constituye una reacción de la naturaleza reversible.

Las fuerzas que participan en la interacción antígeno-anticuerpo son básicamente cuatro tipos: fuerzas electroestáticas, puentes de hidrogeno, fuerzas de Van der Waals y fuerzas hidrófobas. Las interacciones electroestáticas se establecen entre aminoácidos cargados o entre dipolos eléctricos, como ocurre en el establecimiento de puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals. Las interacciones hidrófobas, que resultan de la exclusión de agua por parte de superficies hidrófobas interactivas, parecen cumplir un papel fundamental en la unión de anticuerpos con proteínas de alto peso molecular, pero no con péptidos de bajo peso molecular. Una característica particular de los anticuerpos es la presencia de numerosos residuos aromáticos en sus sitios de reconocimiento antigénico. Estos facilitan el establecimiento de interacciones de tipo hidrófobas, Van der Waals y puentes de hidrogeno con los epítomos antigénicos (Geffner y Fainboim, 2008).

3.4. Tipos de Reacción Antígeno-Anticuerpo

Las siguientes reacciones *in vitro* han sido aplicadas para demostrar la reacción antígeno-anticuerpo en el campo de la transfusión sanguínea:

- Aglutinación
- Hemólisis
- Inhibición
- Absorción
- Precipitación
- Fijación de complemento
- Radioinmunoensayo
- Fluorescencia
- Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

Algunas veces, es necesario usar varios de estos métodos en el estudio de un determinado grupo sanguíneo o anticuerpo. Por ejemplo, en el sistema ABO, los antígenos y anticuerpos se han demostrado mediante técnicas de aglutinación, hemólisis, inhibición, absorción y elución, radioinmunoensayo y fluorescencia (Linares, 1986).

La aglutinación y la hemólisis, son las técnicas más usadas en la serología de los grupos sanguíneos. La inhibición y la absorción-elución, aun cuando no son técnicas de uso frecuente en el banco de sangre, sí son regularmente usadas en los laboratorios de referencia para la

identificación de anticuerpos, y en los laboratorios forenses para la caracterización de material sanguíneo y otros fluidos orgánicos. La absorción es la remoción de un anticuerpo en un suero, mediante su fijación a un antígeno presente en la membrana de eritrocitos o de otras partículas. La elución es la técnica usada para disociar o separar el anticuerpo unido al antígeno eritrocitario.

La precipitación, fijación de complemento y radioinmunoensayo, son usados ampliamente en los bancos de sangre para la detección de antígenos de la hepatitis viral, y en el estudio de otras enfermedades. La fluorescencia se ha empleado para demostrar la presencia de antígenos de grupos sanguíneos en tejidos, y de inmunoglobulinas en células y otros componentes tisulares (Rojas, 2006).

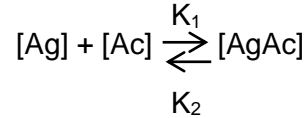
3.5. Aglutinación

La reacción antígeno-anticuerpo más utilizada en el banco de sangre es la aglutinación. En ella, el anticuerpo reacciona con el antígeno, el cual es parte de una estructura de mayor tamaño, como los eritrocitos, formándose masas o aglutinados que pueden ser evidenciados a simple vista o con el microscopio. Esta reacción se puede realizar mediante centrifugación en tubo de ensaye, sedimentación o en lámina.

La reacción de aglutinación de los glóbulos rojos ocurre en dos fases o etapas: la primera, representa la reacción inmunoquímica específica conocida como sensibilización y en la cual el anticuerpo se une al antígeno; en esta fase puede haber activación del complemento. La segunda fase, representa el proceso físico de la aglutinación, que resulta de la unión de los glóbulos rojos mediante puentes de anticuerpos. En algunas reacciones, las dos fases ocurren simultáneamente, mientras que en otras solamente se realiza la primera (Rojas, 2006; Linares, 1986).

3.5.1. Primera fase: Sensibilización. La reacción entre el anticuerpo y el antígeno (situado en la membrana del glóbulo rojo) es reversible, es decir, el anticuerpo se asocia o combina con su antígeno para formar complejos antígeno-anticuerpo, pero también se disocia hasta alcanzar un equilibrio, entendiéndose por tal, el punto en el cual la cantidad de complejos formados es igual a la cantidad disociada. Se ha establecido que la reacción entre el antígeno y el anticuerpo obedece a la ley de acción de masas.

La reacción puede ser representada de la siguiente forma:



Donde [Ag], [Ac] y [AgAc] representan la concentración del antígeno, del anticuerpo y de los complejos antígeno-anticuerpo formados, respectivamente, K_1 y K_2 son proporciones constantes de formación y disociación de complejos. La ecuación según la ley de acción de masas es como sigue:

$$\frac{[AgAc]}{[Ag \times Ac]} = \frac{K_1}{K_2} = K$$

Siendo K la constante de equilibrio o constante de asociación de la reacción y refleja la fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo. De tal manera que mientras más alta es la constante de equilibrio, mayor será la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo formados y la unión entre ellos será más estable. De dos anticuerpos con igual concentración, el que muestre la constante de asociación más alta, tendrá mayor avidéz (Rojas, 2006).

La constante de equilibrio puede variar según las condiciones de reacción, por lo que es importante que en el laboratorio de banco de sangre, se diseñen condiciones de reacción específicas, con el objeto de alcanzar el máximo equilibrio, es decir, la mayor formación de complejos antígeno anticuerpo. Entre los factores que afectan la constante de equilibrio (o primera fase de la aglutinación) se encuentran:

1. Relación entre la concentración de antígenos y anticuerpos

La velocidad con la que el anticuerpo se une a la célula y la cantidad de anticuerpo combinado depende tanto de la concentración celular como de la concentración de anticuerpos. Los mejores resultados se obtienen cuando ambas partes se encuentran en proporciones adecuadas. Es posible observar reacciones de aglutinación muy débiles o negativas cuando el antígeno o el anticuerpo están en exceso, fenómeno que se conoce como prozona.

2. Temperatura

Los anticuerpos de los grupos sanguíneos difieren con respecto a su actividad térmica óptima y son reactivos en un rango de temperatura restringido. Los anticuerpos fríos, generalmente IgM, reaccionan de forma óptima a bajas temperaturas, entre 4°C y 25°C. Por otro lado, los anticuerpos calientes, generalmente IgG, reaccionan mejor a 37 °C. Los anticuerpos que reaccionan *in vitro* sólo a temperatura por debajo de los 37 °C se considera que no tienen significado clínico y raramente causan destrucción de los glóbulos rojos.

3. pH

El pH de la sangre varía entre 7.3 y 7.4, es decir, muy cerca de lo neutral. La mayoría de los grupos sanguíneos demuestran su óptima reactividad entre 6.5 y 7.5. El punto isoeléctrico de la mayoría de los anticuerpos es aproximadamente 7.5. A un pH inferior al punto isoeléctrico el anticuerpo tiene carga positiva. Esto facilita su unión con los eritrocitos (carga negativa). Anticuerpos como los anti-M, reaccionan mejor a pH bajo, y para los anti-D se reporta el pH óptimo entre 6,5 y 7,0. Por esta razón el pH óptimo para la sensibilización está entre 6,5 y 7,5.

4. Tiempo de incubación

La formación del complejo antígeno-anticuerpo es una reacción que requiere de cierto tiempo para que se produzca. En este sentido, es necesario un periodo de incubación, el cual, a menudo es muy corto para la mayoría de los anticuerpos sanguíneos. Por definición, es el lapso requerido para que una cantidad equivalente de anticuerpo, se una a su respectivo antígeno.

5. Fuerza iónica del medio de reacción

Es una de las condiciones fisicoquímicas, que influyen notablemente en la unión del anticuerpo con su correspondiente antígeno eritrocitario. Esta fuerza mide la intensidad del campo eléctrico generado por la presencia de iones en el medio de reacción, los cuales determinan y modifican la magnitud de las fuerzas electrostáticas producidas.

Los glóbulos rojos están sometidos a fuerzas electrostáticas, porque poseen cargas eléctricas negativas en su superficie. Los anticuerpos de mayor tamaño molecular, como IgM, que reaccionan óptimamente en medio salino, se combinan con los antígenos globulares, induciendo la aglutinación de los eritrocitos. En la rutina, el medio iónico más usado para suspender los glóbulos rojos es la solución fisiológica de cloruro de sodio al 0.90% (Linares, 1986; Arbeláez, 2009).

Se ha demostrado que reduciendo la fuerza iónica del medio, la concentración de iones electropositivos alrededor de la célula, también es menor y esto facilita la interacción

de anticuerpos del tipo IgG (cargados positivamente) con los glóbulos rojos (cargados negativamente), incrementándose la formación de complejos antígeno-anticuerpo (Linares, 1986; Arbeláez, 2009).

3.5.2. Segunda fase: Aglutinación. Una vez que los glóbulos rojos han sido sensibilizados por los anticuerpos correspondientes, ellos pueden ser o no, directamente aglutinados. El término anticuerpo incompleto se usa algunas veces para señalar un anticuerpo que reacciona con eritrocitos suspendidos en salina pero que no es capaz de aglutinarlos; tales anticuerpos generalmente son del tipo IgG. La incapacidad de estos anticuerpos para causar la aglutinación en medio salino puede ser el resultado de varios factores, entre ellos:

1. Número y localización de los antígenos en la membrana eritrocitaria.
2. Características moleculares del anticuerpo.
3. Potencial Zeta (Z).

3.5.2.1. Número de sitios antigénicos en la membrana. Se ha estimado el número de antígenos eritrocitarios solamente para algunos sistemas, entre ellos: ABO, Lewis, Ii, Kell y Duffy. El mayor número de antígenos por célula corresponde al grupo A (aproximadamente 1×10^6) y el menor para el Kell (2×10^3). Aunque es cierto que muchos de los anticuerpos del tipo IgG no aglutinan los glóbulos rojos suspendidos en salina, existen algunas excepciones, como por ejemplo IgG anti-A, anti-B y anti-M. La razón para la que el IgG anti-A, aglutine los hematíes A suspendidos en salina, lo cual no ocurre con el IgG anti-Rh, reside simplemente en que el número de puntos antigénicos para A es 100 veces mayor que para Rh. Sin embargo, ciertos sueros IgG anti-D aglutinan glóbulos rojos D suspendidos en salina, lo que probablemente se deba, a que existe mayor cantidad de sitios antigénicos D en este sitio de células, que en otras D positivo.

La investigación adicional, ha demostrado que se requiere una mayor concentración de determinantes antigénicos en la membrana eritrocitaria para que pueda haber aglutinación directa en medio salino por anticuerpos del tipo IgG, en comparación con los del tipo IgM. Cuando la concentración antigénica cae por debajo de cierto nivel, los anticuerpos IgG se fijan a su antígeno pero no se observa aglutinación, a menos que los glóbulos rojos sean especialmente tratados (Linares, 1986).

Se han mencionado otros factores que pueden favorecer o influir en la aglutinación; entre ellos se citan:

- El grado hasta donde el antígeno puede proyectarse sobre la membrana eritrocitaria. Por ejemplo, el antígeno A puede proyectarse más que el Rh.
- La proximidad de los sitios antigénicos. Esta variable depende a su vez del número de puntos antigénicos en cada célula, de su distribución normal en forma de grumos o zonas de alta concentración de antígeno y finalmente de su capacidad para movilizarse y formar grumos después de combinarse con el anticuerpo. En este sentido, existe evidencia de que los antígenos pueden movilizarse en la membrana, pudiendo en algunos casos, ser un pre-requisito para que se produzca la aglutinación (Linares, 1986; Arbeláez, 2009).

3.5.2.2. Características moleculares del anticuerpo. Existen notables diferencias entre las características de las moléculas IgG e IgM. La molécula de IgG es monomérica, constituida por dos cadenas pesadas y dos ligeras, y tiene dos sitios de unión al antígeno (Fragmento Fab) siendo la máxima separación o distancia de apertura entre ellos de 140 Å. La molécula de IgM es pentamérica, por lo cual tienen 10 sitios potenciales de unión y la máxima distancia entre ellos es de 300 Å.

Los anticuerpos IgM aglutinan los glóbulos rojos suspendidos en salina; en cambio, la gran mayoría de los IgG no lo hacen. Esta diferencia puede residir en el tamaño de ambas moléculas y en el número de sitios de unión al antígeno (Arbeláez, 2009).

Los anticuerpos generalmente reaccionan mejor a temperaturas bajas como ocurre con los anticuerpos naturales de especificidad anti-A1, -H1, -Le_a, Le_b y P1, que no causan aglutinación a temperaturas mayores de 20 a 25°C, pero ocasionalmente algunos de ellos pueden aglutinar a 30°C y aún se puede observar ligeras aglutinaciones a 37°C. Estos anticuerpos con tan amplio rango térmico, generalmente fijan complemento.

La gran mayoría de los anticuerpos IgG no aglutinan los eritrocitos en medio salino, pero pueden hacerlo si se agrega albúmina bovina. Otros coloides sintéticos tienen un efecto similar y se ha señalado que el efecto potenciador de estas sustancias coloidales, depende del hecho de que ellos incrementan la constante dieléctrica del medio de reacción (reducción del potencial Z) y en esta forma, reducen o acortan la distancia que separa los eritrocitos entre sí, pudiendo la molécula de IgG establecer un puente de unión entre los antígenos de dos células para formar aglutinados (Linares, 1986).

El potencial Z para la aglutinación de los anticuerpos IgM es diferente que para los IgG (18mV y 6.5mV respectivamente). Por tal razón, los anticuerpos IgM por ser de mayor tamaño, pueden cubrir distancias mayores entre los eritrocitos que los IgG (Tabla 1) (Linares, 1986).

Tabla 1. Número de moléculas de anticuerpos por glóbulo rojo necesarias para causar su aglutinación, de acuerdo a la clase IgG

| Especificidad | IgM | IgG | Referencia |
|---------------|--------|--------|-------------------|
| Anti-A | 25 | 20.000 | Grenbury, 1963* |
| | 50 | 7.000 | Economidou, 1967* |
| Anti-D | 120 | - | Holburn, 1971* |
| Anti-I | 65-440 | - | Olesen, 1996* |

Citado por Mollison PL, 1983

3.5.2.3. Potencial Z. Los eritrocitos poseen una carga eléctrica negativa sobre su superficie, originado por la presencia de ácido siálico, lo cual los hace repelerse e impide que entren en contacto. Esta fuerza se conoce como potencial Z y debido a ella, los glóbulos rojos se mantienen como unidades individuales, no se agregan espontáneamente y pueden circular y cumplir con su función de transporte de gases.

Cuando los glóbulos rojos se suspenden en soluciones electrolíticas, por ejemplo, solución salina fisiológica, la carga eléctrica negativa atrae los iones de Na⁺. La energía o fuerza de repulsión que existe entre ellos se reduce y la distancia que los separa puede ser cubierta fácilmente por anticuerpos IgM, pero no por los IgG.

La longitud de las moléculas de IgG resulta muy corta para cubrir la distancia que existe entre dos glóbulos rojos adyacentes, bajo las condiciones normales creadas por las fuerzas electrostáticas que los mantienen separados. Sin embargo, dichos anticuerpos pueden, algunas veces aglutinar los glóbulos rojos en un medio que contenga albúmina, debido a que ésta eleva la constante dieléctrica del medio de reacción, bajando a su vez el potencial Z y permitiendo que los glóbulos rojos se acerquen lo suficiente para que se produzca la aglutinación. Las enzimas proteolíticas, como la papaína, ficina, bromelina y tripsina, también favorecen la aglutinación de los glóbulos rojos por los anticuerpos IgG pero siguiendo un mecanismo diferente, mediante el cual ellas alteran o desdoblan el ácido siálico de la membrana del glóbulo rojo, reduciendo en esta forma el potencial Z (Linares, 1986).

3.6. Centrifugación

La centrifugación facilita el acercamiento de los glóbulos rojos, a fin de que los anticuerpos hagan el contacto necesario entre los sitios antigénicos y se produzca la aglutinación; de esta manera, se acelera y aumenta el fenómeno de aglutinación. Sin embargo, la centrifugación debe ser la adecuada para obtener un botón de células aglutinadas en el fondo del tubo y un sobrenadante claro. El exceso de centrifugación conduce a un fuerte empaquetamiento de los hematíes, lo cual dificulta su suspensión y por otro lado, puede conducir a lecturas falsas positivas (Linares, 1986).

3.7. Medios de Reacción

El fenómeno de aglutinación requiere de medios adecuados para que se produzca. Tiene como función facilitar tanto la formación de complejos antígeno anticuerpo como la formación de aglutinados celulares, es decir, que ellos influyen en las dos fases de aglutinación. Los medios de reacción más usados son:

- Solución salina
- Albúmina bovina
- Enzimas proteolíticas
- Soluciones de baja fuerza iónica (LISS)

3.8. Otros Factores que Interfieren en la Reacción Ag-Ac

La reacción antígeno-anticuerpo puede ser afectada por ciertos factores que pueden relacionarse con: el antígeno y el anticuerpo (Linares, 1986).

3.8.1. El Antígeno. Los glóbulos rojos deben ser seleccionados y bien preservados, con el objeto de lograr la máxima reactividad durante la prueba, de lo contrario pueden producirse reacciones falsas (positivas o negativas). La reactividad del antígeno puede estar influida por ciertos factores, tales como:

3.8.1.1. Efecto de dosis. Diferencia entre la fuerza de reacción antígeno-anticuerpo, manifestada por el mayor o menor grado de aglutinación, observada entre glóbulos rojos que son homocigotos, y otros que son heterocigotos para un mismo antígeno, cuando se ponen en contacto con un anticuerpo específico.

3.8.1.2. Edad de las células. Las células frescas reaccionan mejor que las que han sido conservadas largo tiempo.

3.8.1.3. Temperatura de conservación. Los antígenos eritrocitarios se mantienen bajo congelación de -30°C. Entre 1 a 6 °C, la reactividad es satisfactoria hasta los 21 días, pero a temperatura ambiente se deterioran rápidamente.

3.8.1.4. Suspensiones celulares. Con relación al antígeno, es importante señalar que mientras más concentrada es la suspensión, más débil será la reacción. Las indicaciones para la mayoría de la pruebas, especifican que las suspensiones celulares deben estar entre 2% al 5% (Linares, 1986).

3.8.2. El Anticuerpo. En el estudio de los grupos sanguíneos se puede observar reacciones variables entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo; frecuentemente son el resultado de diferencias en la reactividad del anticuerpo mismo. No todos los sueros que contienen anticuerpos de una sola especificidad, reaccionan en la misma forma.

Los sueros conservados, generalmente pierden reactividad y pueden dar como resultado falsos negativos. Los sueros comerciales, exhiben iguales características y es la razón, por la cual traen una fecha de vencimiento, y recomendaciones para su mejor conservación. Algunas características de los anticuerpos son las siguientes:

- ❖ **Avidez.** Es la velocidad con que un anticuerpo se combina y se estabiliza con su antígeno correspondiente. No está relacionada con la especificidad.
- ❖ **Título.** Si un suero contiene un determinado anticuerpo y es diluido progresivamente, llegara a un punto en el cual ya no podrá ser detectado. Esta prueba de cuantificación de los anticuerpos, es conocida como titulación, y su valor es la reciproca de la dilución, en la cual se observa la mínima aglutinación. El método más usado es el de la doble dilución 1:2 – 1:4 – 1:8, etcétera (Rojas, 2006).

3.9. Conservación de los Sueros

Los anticuerpos son moléculas lábiles y con facilidad pierden su actividad. Por esta razón, siempre que sea posible, se deben usar sueros frescos para todas las pruebas, mantenerlos en refrigeración cuando no están en uso o congelados si se desea un depósito prolongado. Las altas temperaturas conducen una pérdida rápida de la actividad del anticuerpo (Linares, 1986).

3.10. Lectura e Interpretación de la Reacción Ag-Ac

El resultado final de la reacción antígeno-anticuerpo puede manifestarse bajo la forma de hemólisis o aglutinación; ambas deben ser descritas en forma precisa. El uso de lámparas como fuente de luz y el empleo de una lupa o espejo amplificador, aumenta la sensibilidad de la lectura.

Para iniciar la lectura de la prueba, el primer paso es observar el sobrenadante para detectar la presencia de hemólisis parcial o total. Si es negativa, se procede a desprender suavemente el botón de células para precisar si existe aglutinación (Arbeláez, 2009).

4. Principios de Inmunoematología

La inmunología como ciencia abarca un amplio campo de pensamiento médico y en su definición, se han introducido diversos conceptos que van desde “la resistencia a las infecciones” hasta “la capacidad del organismo para identificar y reaccionar contra antígenos o tejidos extraños, pero no contra los propios”. Inicialmente fue desarrollada por los bacteriólogos, desde donde se ha extendido a otros campos de la medicina, siendo adoptada y ampliamente aplicada por los investigadores en sus diferentes áreas de trabajo e investigación. Así nació la Inmunoematología, cuando Landsteiner descubrió los antígenos y anticuerpos que integran los grupos sanguíneos del sistema ABO, descubrimiento que tuvo la mayor importancia clínica. Desde aquel tiempo (1900), múltiples descubrimientos en ese campo han conducido al mejor entendimiento de los mecanismos inmunes que operan tanto en condiciones de salud, como en las enfermedades (Linares, 1986).

En la Inmunoematología, se aplican los principios básicos inmunológicos, para el estudio de antígenos presentes en los elementos formes de la sangre y su comportamiento serológico. Igualmente, estudia los desórdenes hematológicos relacionados con el estado inmune del individuo.

Dos términos son de uso frecuente en inmunología: antígenos y anticuerpos. Cada uno es dependiente del otro, pero ambos comparten importantes propiedades, como por ejemplo, la especificidad, según la cual el anticuerpo resultante de la estimulación antigénica solamente reconocerá al antígeno que estimuló su producción. La figura 5 es una representación gráfica de un glóbulo rojo, sus antígenos de superficie y anticuerpos.

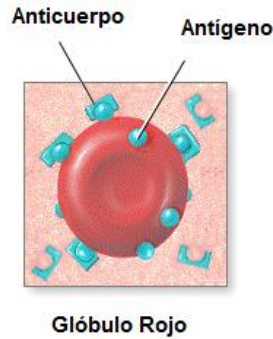


Figura 5. Superficie eritrocitaria (Anticuerpos y Antígenos). (ADAM Enciclopedia Medica [Internet], 2009)

4.1. Antígenos

Son en su mayoría sustancias proteicas, aun cuando ciertos polisacáridos, lípidos y hasta ácidos nucleicos pueden tener propiedades antigénicas. Estructuralmente, un antígeno contiene grupos químicos ordenados en una arquitectura tridimensional, conocida como determinante antigénico o epítopes, pudiendo existir varios de ellos en cada antígeno. Cuando un organismo es expuesto a un antígeno y las células inmunológicamente competentes lo reconocen como extraño, puede producir anticuerpos contra los determinantes antigénicos; la característica fundamental de estos anticuerpos, es reaccionar específicamente contra el antígeno o determinante antigénico que genera su producción.

El antígeno responsable de inducir una respuesta inmune, se denomina inmunógeno y puede reaccionar *in vivo* o *in vitro* con el anticuerpo específico. *In vitro*, la reacción antígeno-anticuerpo dependerá de ciertas condiciones, tales como aglutinación, hemólisis, precipitación, inhibición, etcétera (Linares, 1986).

Un factor importante que afecta la inmunogenicidad de un antígeno es su tamaño molecular. Las moléculas con capacidad inmunogénica generalmente tienen un peso molecular de 10 kDa más y se han citado pocos ejemplos de antígenos con peso molecular de 4 kDa (glucagón). Moléculas más pequeñas (ej., drogas como la penicilina) han sido denominadas haptenos, los cuales no tienen poder antigénico por sí solos, pero pueden ser inmunogénicos cuando se acoplan o fijan a proteínas “transportadoras” de mayor peso molecular. Los haptenos

pueden combinarse con el anticuerpo específico una vez formado.

Los antígenos de grupos sanguíneos son configuraciones inmunoquímicas, presentes en la membrana de los glóbulos rojos, y pueden ser glucolípidos, proteínas y glucoproteínas (Tabla 2). Los antígenos ABH han sido los más ampliamente estudiados y se encuentran bajo la forma de glucolípidos, que son proyectados en la membrana eritrocitaria. La porción de azúcar de la molécula, transporta el determinante antigénico que le confiere la especificidad ABH (Arbeláez, 2009).

Los antígenos ABH se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo, estando presentes en otros tejidos, células y líquidos orgánicos. Por el contrario, antígenos como los del Sistema Rh están restringidos a la membrana del glóbulo rojo, el material antigénico parece ser una lipoproteína y forman parte integral de la membrana (Linares, 1986; Arbeláez, 2009).

Tabla 2. Composición química y ubicación orgánica de algunos antígenos de grupos sanguíneo

| | | |
|--|--|-------------------------|
| Glucolípidos (Oligosacáridos + lípido) | A,B,H P1 | Membrana del eritrocito |
| | Le ^a , Le ^b | Plasma |
| Proteína (polipéptido + lípido) | Rh | Membrana del eritrocito |
| Glucoproteína (polipéptido + oligosacárido) | A,B,H Le ^a , Le ^b | Secreciones (moco) |
| | M,N | Membrana del eritrocito |

Fuente: Linares, 1986

No se conoce si los antígenos de los grupos sanguíneos, pueden desempeñar alguna función biológica en el organismo; los antígenos ABH, tienen amplia distribución orgánica, su ausencia de la membrana del glóbulo rojo, como sucede en el fenotipo Bombay, no alteran la estructura de la membrana, no deforman la célula, ni se acorta su tiempo de vida. Por el contrario, las moléculas en las cuales residen antígenos, como los del sistema Rh y Kell, sí parecen jugar un papel importante en la integridad de la membrana eritrocitaria (Linares, 1986; Arbeláez, 2009).

4.2. Anticuerpos

Las proteínas plasmáticas que tienen actividad de anticuerpos, se han denominado inmunoglobulinas, las cuales son producidas por los Linfocitos B, en respuesta a la presencia de un antígeno extraño. Una característica fundamental de los anticuerpos, es su especificidad, es decir, su capacidad de reaccionar solamente con el antígeno que estimuló su formación.

La molécula de inmunoglobulina, consta de una o más unidades básicas y cada unidad está compuesta a su vez de cuatro cadenas de polipéptidos: dos cadenas pesadas (H) que contienen entre 420 a 440 aminoácidos y que le confieren la especificidad a la inmunoglobulina, y dos cadenas ligeras más cortas (L) formadas por 210 a 220 aminoácidos. Estas cadenas están unidas entre sí por enlaces disulfuro (S-S) y otras uniones de tipo no covalente (Linares, 1986; Arbeláez, 2009).

Se han reconocido cinco clases de inmunoglobulinas en base a las diferencias antigénicas observadas en las cadenas pesadas: IgG (γ : Gamma), IgM (μ : Mu), IgA (α : Alpha), IgD (δ : Delta) e IgE (ϵ : Épsilon) (Figura 6). Existen dos tipos de cadenas ligeras denominadas κ (kappa) y λ (lambda), las cuales son comunes a las cinco clases de inmunoglobulinas, de tal manera que en cada molécula de inmunoglobulina, existen dos cadenas ligeras del mismo tipo, que pueden ser dos kappa o dos lambda. Aproximadamente el 70% de las IgG, contienen cadenas ligeras del tipo κ y el 30% del tipo λ . Los anticuerpos de grupos sanguíneos pertenecen a las clases IgG, IgM y en raras ocasiones a la clase IgA.

La secuencia de aminoácidos de ambas cadenas, ha permitido dividir las en segmentos bien identificados, de aproximadamente 100 aminoácidos cada uno, denominados "dominios o regiones". Una cadena ligera IgG tiene una región variable (V_L) y otra constante (C_L). Una cadena pesada IgG tiene una región variable (V_H) y tres constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}). Las regiones variables (V_H y V_L) confieren la especificidad al anticuerpo y en ciertas partes de estas regiones, se han observado cambios muy frecuentes o sustituciones en las moléculas de aminoácidos. Estos segmentos hipervariables, también varían considerablemente en su longitud, por lo que han sido denominados zonas calientes, pues parecen ser las regiones más importantes, que controlan la especificidad de anticuerpos (Abbas, 2012).

El sitio de unión para el antígeno, consiste en una configuración formada por las regiones variables de ambas cadenas, en cambio, las regiones constantes caracterizan la clase y subclase de la inmunoglobulina.

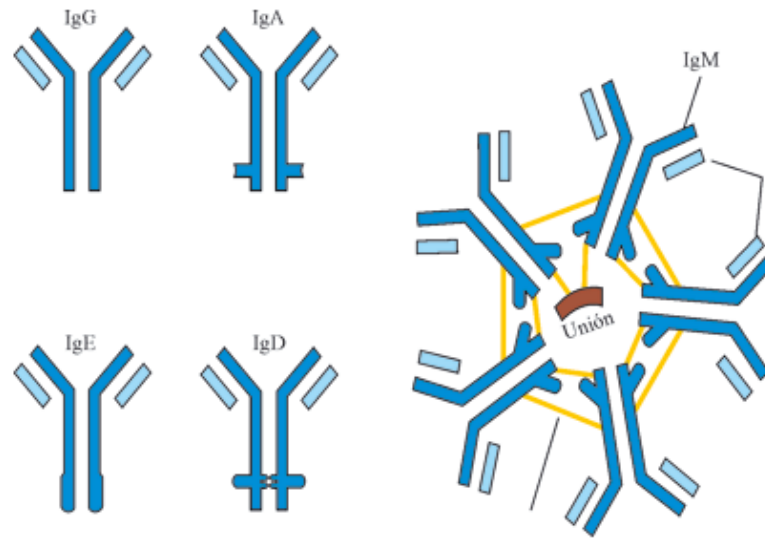


Figura 6. Diagrama de los Isotipos de Inmunoglobulinas (Terapia Intensiva, Caballero, [Internet] 2006)

El tratamiento de la molécula IgG con papaína, produce tres fragmentos: dos de ellos idénticos formados por las cadenas L y una parte de las cadenas H, correspondientes a la porción que se une al antígeno, por lo cual se ha denominado fragmento Fab. El tercer fragmento denominado Fc, formado por el resto de las cadenas H, desempeña varias funciones biológicas concernientes con la activación del complemento, transferencia placentaria, sensibilización dérmica, fijación a macrófagos (Abbas, 2012).

4.3. Anticuerpos de Grupo Sanguíneo

Inicialmente, los anticuerpos fueron clasificados empíricamente según su comportamiento serológico, como anticuerpos completos, cuando aglutinaban los hematíes suspendidos en medio salino y como incompletos, aquellos que no lo hacían. En la actualidad, se identifican dentro del grupo de las inmunoglobulinas que tienen relación con los anticuerpos de grupos sanguíneos. Las tablas 3 y 4 indican las características más importantes de dichos anticuerpos y especificidad respectivamente.

Tabla 3. Características más importantes de los anticuerpos de grupos sanguíneos

| Propiedades | Inmunoglobulinas | | |
|---------------------------------|------------------|------------|---------|
| | IgG | IgM | IgA |
| Clases | | | |
| N° subclases | 4 | 1 | 2 |
| Peso molecular (daltons) | 150.000 | 900.000 | 160.000 |
| Movilidad electroforética | Gamma | Gamma-beta | Alfa |
| Constante de sedimentación | 6.7 S | 19 S | 7-15 S |
| Cadenas H | Γ | M | A |
| Cadenas L | κ o λ | κ o λ | κ o λ |
| Tipo de respuesta | Secundaria | Primaria | ? |
| Mecanismo de producción | Inmune | Natural | ? |
| Síntesis mg/kg/día | 20-40 | 3-55 | 3-17 |
| Secreción | No | No | Sí |
| Activación del complemento | Sí | Sí | No |
| Fijación a monocitos/macrófagos | Sí | No | No |
| Cruce de placenta | Sí | No | No |
| Eritroblastosis fetal | Sí | No | No |
| Hemólisis in vitro | Sí | No | No |
| Reacción en salina | No | Sí | No |
| Aglutinación directa | No | Sí | Sí |

Fuente: Linares, 1986

Tabla 4. Especificidad de los anticuerpos de grupos sanguíneos más comunes

| Inmunoglobulina | Cruzan la placenta | E.H.R.N | Tipos de anticuerpos | |
|-----------------|--------------------|---------|--------------------------------------|----------------------|
| IgG | Sí | Sí | Anti-AB | Anti-Fy ^b |
| | | | Anti-D | Anti-JK ^a |
| | | | Anti-c | Anti-JK ^b |
| | | | Anti-E | Anti-S |
| | | | Anti-K | Anti-s |
| | | | Anti-k | Anti-Lu ^a |
| IgM | No | | Anti-A | Anti-E |
| | | | Anti-B | Anti-M |
| | | | Anti-H | Anti-S |
| | | | Anti-I | Anti-P ₁ |
| | | | Anti-Le ^a | Anti-Lu ^a |
| | | | Anti-Le ^b | |
| IgA | No | Sí | Raros anticuerpos han sido descritos | |

Fuente: Linares, 1986

5. Estudio de los Grupos Sanguíneos

Los primeros pasos en el estudio de los grupos sanguíneos fueron dados por Landois, quien en 1875 señalaba, que si los glóbulos rojos de una especie eran mezclados con el suero sanguíneo proveniente de otra especie, se producía un fenómeno de aglutinación o de hemólisis. En 1900, Erlich y Morgenroth observaron un fenómeno igual, pero entre animales de la misma especie. Fue Karl Landsteiner, en 1900 quien señaló primero, la aglutinación de glóbulos rojos humanos por el suero proveniente de otras personas, dando lugar a este hallazgo al descubrimiento del sistema ABO, el cual fue completado dos años más tarde por von Decastello y Sturly, quienes descubrieron el cuarto grupo del sistema: el grupo AB.

Una nueva y excitante fase en el estudio de los grupos sanguíneos se reinició a partir de 1939, con los trabajos de Levine y Stetson, y de Landsteiner y Wiener, quienes establecieron las bases para el conocimiento de un nuevo sistema: el Rh y su papel fundamental en la etiología de la enfermedad conocida como eritroblastosis fetal o Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (Arbeláez, 2009).

El estímulo científico por estos descubrimientos, fue de tal magnitud que dio origen al nacimiento de una nueva especialidad, la Inmunohematología, de la cual, Landsteiner fue su líder hasta 1943. La rápida expansión de la terapia transfusional y el desarrollo de métodos serológicos de mayor sensibilidad, ha conducido al descubrimiento de una gran variedad de grupos sanguíneos. Hoy en día, tenemos conocimiento de que alrededor de unos 400 antígenos están presentes en la membrana del glóbulo rojo, y seguramente su número continuara aumentando (Linares, 1986).

6. Sistema ABO

Landsteiner demostró que los glóbulos rojos contenían por lo menos dos factores designados como aglutinógenos A y B, con los cuales se podía explicar los cuatro grupos que existían y así postuló que cada persona podía tener uno de ellos (A o B), ambos (AB) o ninguno (O). Reconoció la presencia de anticuerpos en el suero y señaló la relación recíproca que había entre ellos y los antígenos presentes en los glóbulos rojos, demostrando que cuando un determinado antígeno estaba ausente, su correspondiente anticuerpo se encontraba en el suero o plasma (Tabla 5).

Así, ha quedado establecido que los antígenos del sistema ABO son los únicos para los cuales existe el correspondiente anticuerpo, siendo ello una característica constante y predecible en el suero de individuos normales.

El sistema ABO es de interés en una gran variedad de campos científicos, por ejemplo, en ciencias como la etnología, la antropología, la genética, la medicina y química forense. Además de los cuatro grupos sanguíneos (A, B, AB y O), se sabe que existen subgrupos adicionales que exhiben diferentes patrones y grados de aglutinación. Los antígenos A y B fueron identificados inicialmente sobre la membrana de los eritrocitos y posteriormente sobre la superficie de otros tipos de células, así como también en algunas secreciones (Figura 7). Por lo tanto, el sistema también es llamado sistema de grupo histo-sanguíneo, más que sistema de grupo sanguíneo. Debido a que estos antígenos existen en otras células diferentes a los eritrocitos, la compatibilidad ABO es importante no solo en la transfusión de sangre, sino también en el trasplante de células, tejidos y órganos. Igualmente, la medicina forense tiene en cuenta al grupo sanguíneo ABO, al realizar el análisis de evidencias de la escena del crimen, tales como sangre, saliva, líquido seminal y cabello.

Tabla 5. Generalidades de los grupos sanguíneos

| Grupo sanguíneo | Antígenos | Anticuerpos | Genotipo |
|-----------------|-----------|-------------|----------|
| O | H | Anti-A, B | OO |
| A | A | Anti-B | AO-AA |
| B | B | Anti-A | BO-BB |
| AB | A y B | Ninguno | AB |

Fuente: Linares, 1986

La expresión de los antígenos ABO presenta cambios durante el desarrollo fetal y del individuo, especialmente en los primeros años de vida, en los ancianos y en la patogénesis de ciertas enfermedades. Por lo tanto, la expresión de los genes ABO es tema de interés en diferentes áreas de la salud, como son la biología del cáncer y la biología molecular, celular y del desarrollo. Cuando una persona no tiene un antígeno en particular en sus eritrocitos, se espera que su suero contenga un anticuerpo dirigido contra ese antígeno de cual carece.



Figura 7. Antígenos de membrana del Sistema ABO.
(ADAM Enciclopedia Medica [Internet], 2009)

6.1. Antígenos del Sistema ABO

El sistema ABO comprende dos partes: antígenos presentes en los glóbulos rojos y los correspondientes anticuerpos presentes en el suero. Bajo condiciones normales, todos los individuos poseen los anticuerpos contra los correspondientes antígenos A y B, que no están presentes en sus propias células. De esta manera, se establece una interrelación constante y predecible entre los antígenos y anticuerpos del sistema, lo cual constituye la base fundamental para que en la determinación del grupo ABO, se realicen las pruebas celulares para evidenciar antígenos y pruebas séricas o grupo inverso, para determinar los anticuerpos, ambas pruebas se complementan. La tabla 6 indica el grupo sanguíneo, con sus subgrupos y anticuerpos correspondientes en el suero (Arbeláez, 2009; Linares, 1986).

Tabla 6. Antígenos y Anticuerpos del Sistema ABO

| Grupo | Subgrupo | Antígenos sobre los eritrocitos | Anticuerpos (Aglutininas en el suero) |
|-------|--------------------------------------|---------------------------------|--|
| O | --- | Ninguno ^a | Anti-A Anti- A ₁ Anti-B Anti-AB ^b |
| A | A ₁ A ₂ | A + A ₁ A | Anti-B |
| B | --- | --- | Anti-A Anti- A ₁ |
| AB | A ₁ B A ₂ B | A + A ₁ + B A + B | Ninguno ^c |

a: Normalmente los eritrocitos tienen el antígeno H, pero la cantidad está influenciada por el grupo ABO; las células O tienen la mayor cantidad de H y los eritrocitos A₁B la menor cantidad.

b: Inseparable

c: Anti- A₁, en 1% de las personas A₂ y en 22% a 35% de las personas A₂B.

Fuente: Arbeláez, 2009

6.2. Estructura de los Antígenos del Sistema ABO

Los antígenos del sistema ABO están compuestos por azúcares de la superficie de los eritrocitos, unidos a un componente denominado ceramida, el cual se encuentra en la membrana de los eritrocitos. Una serie de cuatro azúcares se unen a la ceramida. A esta estructura de cuatro azúcares o sustancia precursora, se le unen otros azúcares que le dan la especificidad a cada antígeno ABO.

6.2.1. Biosíntesis. El primer paso en la biosíntesis de los antígenos ABO es la adición de la L-fucosa a la galactosa terminal (Gal) de un precursor común (sustancia precursora) unido a los lípidos o proteínas de membrana, por la enzima alfa-1,2 fucosiltransferasa (transferasa H), dando origen al antígeno H. Posteriormente, se forman los determinantes para los grupos sanguíneos A o B por la acción de las enzimas transferasas, que catalizan la adición de azúcares específicos: la transferasa A para los que tendrán grupo A y la transferasa B para los que tendrán grupo B, formando así los antígenos A y B, respectivamente. En el caso de las personas con grupo O, se produce una transferasa O que es inactiva, quedando el antígeno H sin modificarse (Figura 8). Las personas que sintetizan el antígeno A exclusivamente, tendrán

grupo sanguíneo A; las que sintetizan el antígeno B exclusivamente, tendrán grupo sanguíneo B; y las que producen ambos antígenos A y B, tendrán grupo AB (Arbeláez, 2009).

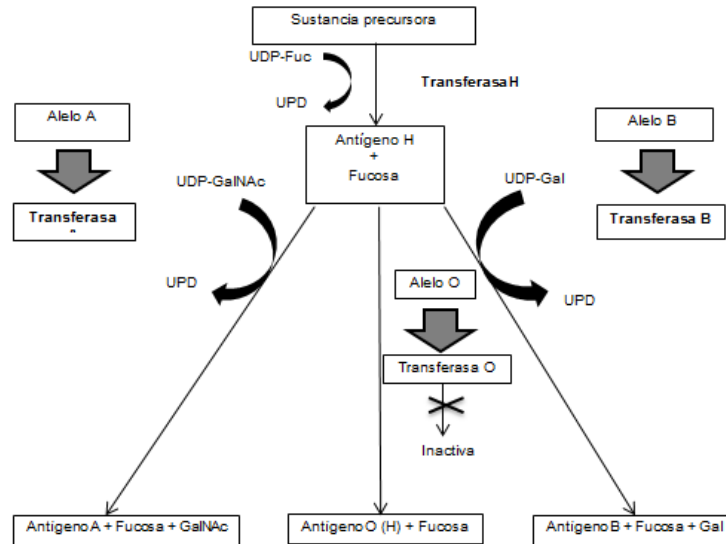


Figura 8. Expresión de los genes ABO. (Arbeláez, 2009)

6.2.2. Proteínas transportadoras de antígenos. Los antígenos que conforman los grupos sanguíneos hacen una parte integral de la membrana del eritrocito y pueden atravesar completamente la membrana una sola vez, dejando su extremo N-terminal en la parte externa de la célula y su extremo C-terminal en el interior (estos antígenos son llamados de Tipo 1); también hay de Tipo 2, los cuales dejan su extremo N-terminal en la parte interna de la célula y su extremo C-terminal en la externa; de Tipo 3, que atraviesan la membrana varias veces y pueden tener ambos extremos, N y C-terminal, en el interior, o tener el C-terminal en el interior y el N-terminal en el exterior de la célula (como sucede con la glicoproteína Duffy); y finalmente, pueden no atravesar la membrana, sino están anclados a ella mediante una estructura lipídica (glicosilfosfatidilinositol o GPI), que serían los Tipo 5. No existen glicoproteínas tipo 4 en la membrana de lo eritrocitos. La figura 9 representa cada uno de los tipos de proteínas y glicoproteínas que forman la membrana (Arbeláez, 2009).

En el caso del sistema sanguíneo ABO, muy poco se conoce acerca de las funciones de estos azúcares en los eritrocitos, excepto que ellos hacen parte del glucocálix, una matriz de azúcar que rodea la célula y la protege de daños químicos e invasión de patógenos.

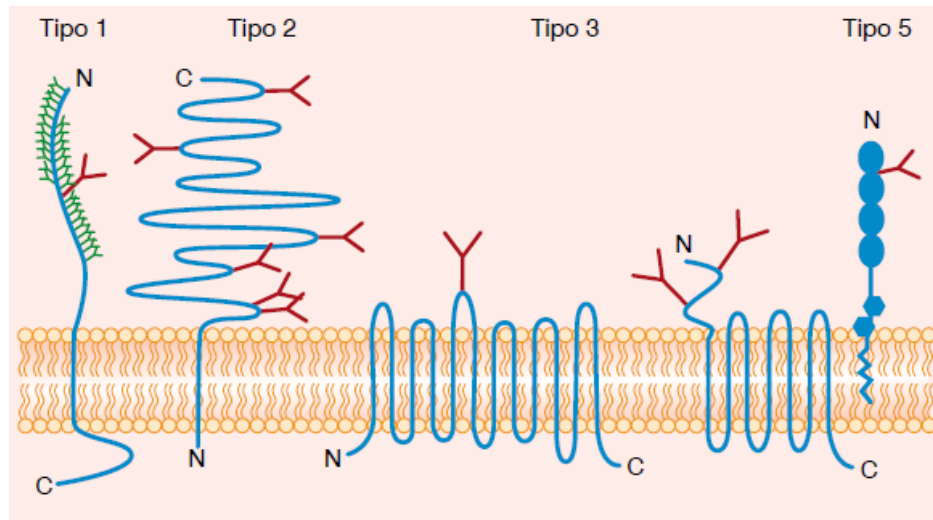


Figura 9. Diagrama de los diferentes tipos de proteínas y glicoproteína que conforman los grupos sanguíneos, de acuerdo con su integración con la membrana del eritrocito. (Arbeláez, 2009)

6.3. Fenotipos ABO en diferentes poblaciones

La distribución de los cuatro grupos sanguíneos A, B, AB y O varía en las diferentes poblaciones del mundo y depende de la frecuencia de los tres alelos del gen ABO en las poblaciones, siendo el más frecuente el grupo O, seguido del grupo A, grupo B y grupo AB (Arbeláez, 2009).

Tabla 7. Distribución en porcentaje de los fenotipos ABO de acuerdo con la raza o grupo étnico

| Raza o grupo étnico | (n) | Fenotipo | | | |
|---------------------------|-----------|----------|------|------|-----|
| | | O | A | B | AB |
| Blancos no hispanos | 2.215.623 | 45,2 | 39,7 | 10,9 | 4,1 |
| Hispanos* | 259.233 | 56,5 | 31,1 | 9,9 | 2,5 |
| Negros no hispanos | 236.050 | 50,2 | 25,8 | 19,7 | 4,3 |
| Asiáticos* | 126.780 | 39,8 | 27,8 | 25,4 | 7,1 |
| Indígenas norteamericanos | 19.664 | 54,6 | 35,0 | 7,9 | 2,5 |
| Todos los donantes | 3.086.215 | 46,6 | 37,1 | 12,2 | 4,1 |

*Los hispanos incluyen mexicanos (68,8%), puertorriqueños (5%), cubanos (1,6%) y otros donantes hispanos (24,6%)

*Los asiáticos incluyen chinos (29,8%), filipinos (24,1%), hindúes (13,8%), japoneses (12,7%), coreanos (12,5%) y vietnamitas (7,1%)

Fuente: Arbeláez, 2009

6.3.1. Subgrupos de A y B. Los subtipos del grupo sanguíneo ABO se denominan subgrupos y/o variantes. Los subgrupos de ABO se diferencian por las cantidades de antígenos A, B u O (H) sobre los eritrocitos. Los más comunes son los subgrupos de A y B, y de estos dos, son más comunes los subgrupos de A. Los dos principales subgrupos de A son A_1 y A_2 . Los subgrupos son clasificados por la cantidad de antígeno A, y esta cantidad disminuye en el orden A_1 , A_2 , A_3 , A_{end} , A_m , A_{el} . Los subgrupos varían también en las diferentes poblaciones; por ejemplo en los europeos aproximadamente el 80% de las personas del grupo sanguíneo A y AB poseen el subgrupo A_1 y el restante 20% el A_1 o A_2B .

Entre los subgrupos A_1 y A_2 hay diferencias cualitativas y cuantitativas. La transferasa A_1 es más eficiente que la transferasa A_2 en convertir la sustancia H al antígeno A. Aproximadamente el 80% de las poblaciones de grupo sanguíneo A o grupo AB tienen eritrocitos que son aglutinados por anti-A, por lo tanto son clasificadas como A_1 o A_1B , el restante 20% cuyas células son aglutinadas por anti-A pero no por anti- A_1 , son A_2 o A_2B .

6.3.2. Subgrupos AB. El grupo sanguíneo AB se clasifica en 9 grupos (A_xB , A_1B_x , A_mB , A_1B_m , $A_{el}B$, A_1B_{el} , $cisAA_2B_3$, $cisA_2B$ y $cisA_1B_3$) de acuerdo con la cantidad de antígeno A o B. En particular $cisAB$ es un fenotipo muy raro y tiene tres tipos sanguíneos, $cisAA_2B_3$ (A_2B_3/O), $cisA_2B$ (A_2B_3/B) y $cisA_1B_3$ (A_1B_3/A_1). La detección de esta variante AB es muy importante, especialmente en transfusiones sanguíneas y en la solución de problemas de paternidad.

6.3.3. Antígeno H. En antígeno H se encuentra sobre la membrana de los eritrocitos, excepto en las personas de fenotipo Oh (fenotipo Bombay). Como H es un precursor de A y B, las personas de los grupos sanguíneos A, B y AB tienen menos H que las personas O. El orden de reactividad de anti-H con eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos es $O > A_2 > A_2B > B > A_1 > A_1B$ (Arbeláez, 2009).

6.4. Herencia

La herencia en el sistema ABO es controlada de acuerdo a las leyes de Mendel y se hace mediante cuatro genes comunes: A_1 , A_2 , B y O, y una serie de genes alelos menos frecuentes como son A_3 , A_x , A_m , etc. En la mayoría de los casos la combinación es directa y la combinación de los tres alelos A, B y O, determinan los cuatro grupos sanguíneos: A, B, AB y O. La forma en que estos genes controlan la producción de los antígenos ABO fue reconocida por Bernstein en

1924, cuya teoría, con pequeños cambios, continúa siendo aceptada. El señaló que cada individuo hereda dos genes ABO, uno de cada padre, y que estos genes determinarían la presencia de los antígenos ABO en los glóbulos rojos de las personas (Arbeláez, 2009).

La presencia del antígeno A o B en los glóbulos rojos puede ser determinada mediante pruebas serológicas empleando los antisueros apropiados y de esta manera, se pone en evidencia la existencia del gen que controla la presencia del correspondiente antígeno. El gen O es silente y su existencia es deducida por la ausencia de los antígenos A y B en la membrana eritrocitaria.

6.5. Genética

Hay tres genes que controlan la expresión de los antígenos ABO. El gen H, ubicado en el cromosoma 19, codifica para la producción de una enzima transferasa (transferasa H), que une una molécula de L-fucosa a la galactosa terminal (Gal) de un precursor común (sustancia precursora) unido a los lípidos o proteínas de membrana del eritrocito, dando origen al antígeno H, el cual es el paso anterior a la formación de los antígenos de los grupos sanguíneos ABO. Los individuos que son homocigotos para el gen nulo (h/h) no producen el antígeno H y desarrollan anticuerpos anti-H; por lo tanto, estas personas aparte de no producir el antígeno H, tampoco producen los antígenos A o B, y su suero contiene anti-A anti-B y anti H. Este fenotipo se conoce como el fenotipo Bombay (Arbeláez, 2009).

El gen ABO, ubicado en el cromosoma 9, posee tres alelos que son el A, el B y el O, que varían de acuerdo a las sustituciones de nucleótidos, los cuales determinan las especificidades de las enzimas para las cuales codifican. El alelo A codifica para la enzima transferasa A, que cataliza la adición de un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) al antígeno H, generándose así el antígeno A. El alelo B codifica para la enzima transferasa B, que cataliza la adición de un residuo de D-galactosa (Gal) al antígeno H, generándose el antígeno B. El alelo O solo difiere del alelo A en la delección de un nucleótido (guanina G en la posición 261), lo que tienen como consecuencia un cambio en el marco de lectura o *frameshift* y la producción de una proteína sin actividad de transferasa. La figura 8 es una representación de la estructura de los antígenos sanguíneos, indicando el residuo terminal de cada uno.

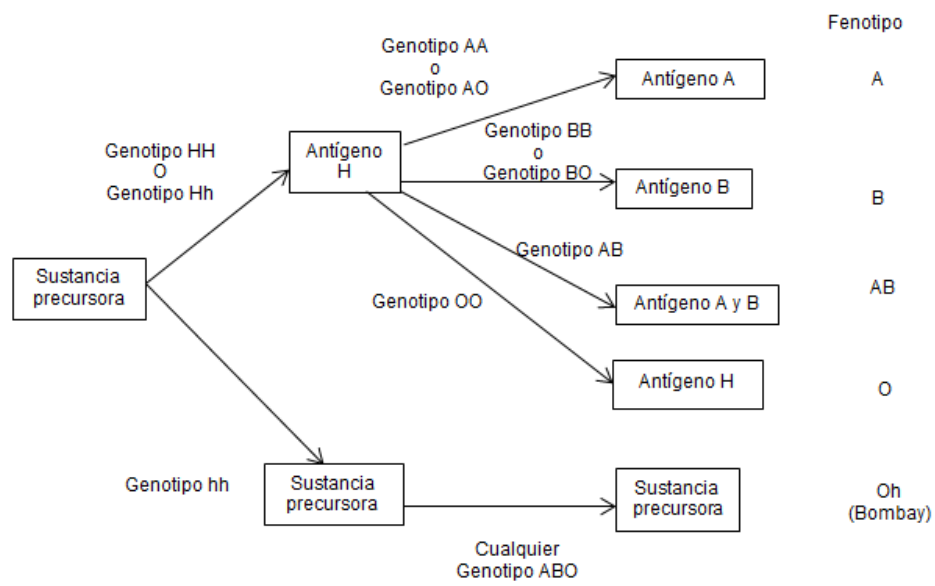


Figura 10. Desarrollo de los antígenos del sistema ABO. (Arbeláez, 2009)

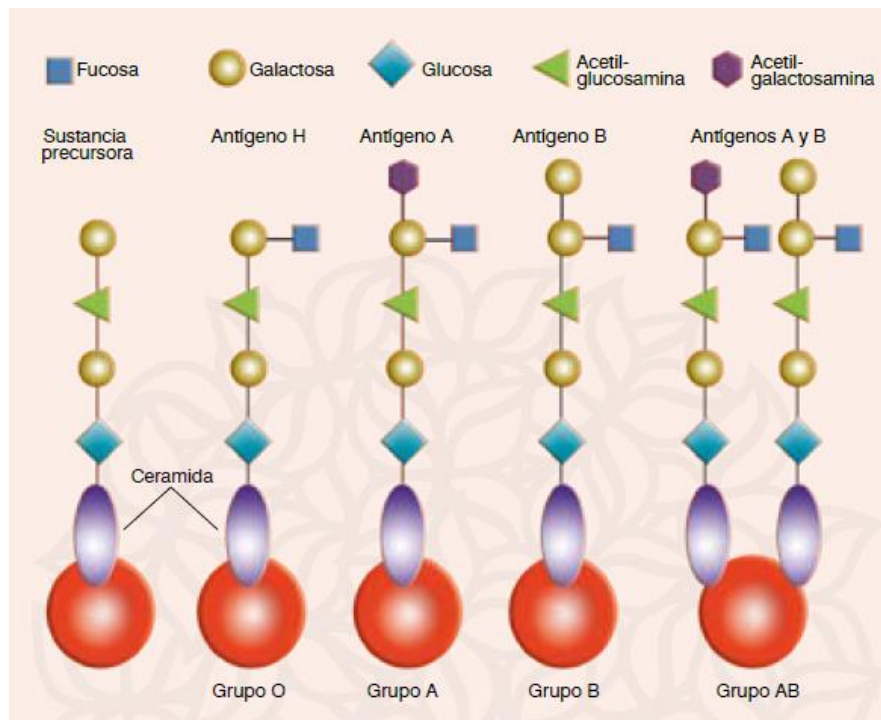


Figura 11. Estructura de los antígenos del sistema ABO. (Arbeláez, 2009)

El gen, ubicado también en el cromosoma 19, codifica para una enzima (fucosiltransferasa) que se expresa en el epitelio de tejidos secretores, incluidas las glándulas salivales y los tractos respiratorio y gastrointestinal.

6.6. Pruebas para Determinar el Grupo Sanguíneo ABO

La prueba para la clasificación sanguínea de rutina, se basa en una técnica de hemaglutinación. Se utilizan reactivos comerciales que contienen anticuerpos específicos para cada antígeno, los cuales se mezclan con la sangre a clasificar. Después de mezclar una gota del reactivo con una gota de sangre, se observa la presencia de aglutinación (Figura 12).

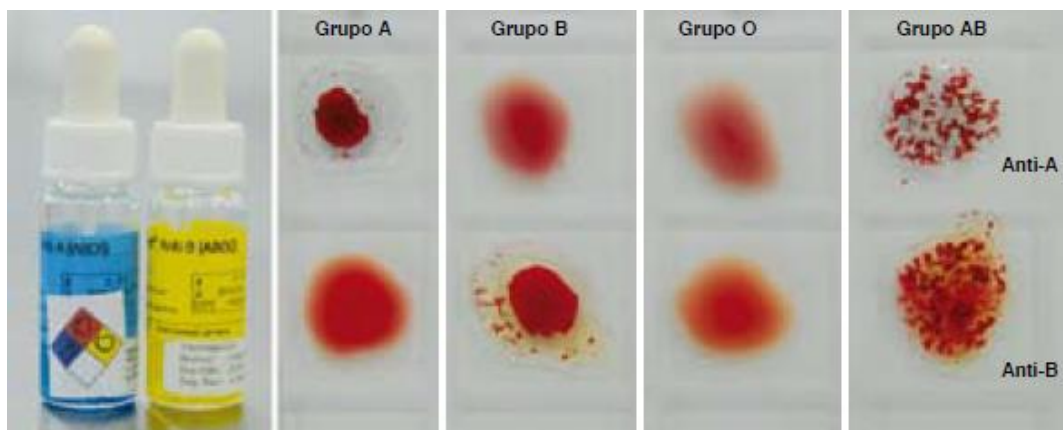


Figura 12. Hemoclasificación. (Arbeláez, 2009)

Idealmente las pruebas de rutina para determinar el grupo sanguíneo ABO deben hacerse en dos partes: primero buscando en los eritrocitos la presencia de antígenos A y/o B en la membrana (prueba globular directa), y segundo, buscando en el suero o plasma los anticuerpos anti-A y/o anti-B que correspondería tener esa persona (prueba sérica o inversa). Por lo tanto, las pruebas globulares y las inversas se complementan y una confirma la otra. En general, los anticuerpos ABO se detectan a temperatura ambiente, en solución salina y reaccionan de forma óptica a 4°C.

Los reactivos anti-A y anti-B aglutinan la mayoría de las células antígeno-positivas por contacto directo, aun sin centrifugación. Sin embargo, en el suero de algunas personas los anticuerpos

anti-A y anti-B son muy débiles para aglutinar los eritrocitos sin centrifugación o sin incubación prolongada; por lo tanto, las pruebas séricas deben ser realizadas por un método eficiente que detecte hasta los anticuerpos débiles, como por ejemplo, usando técnicas en tubo, microplato o de aglutinación en columna (Arbeláez, 2009).

7. Sistema Rh

El sistema Rh es, después del ABO, el más importante de los sistemas de grupo sanguíneos, por sus implicaciones clínicas en la transfusión sanguínea y en la etiopatogenia de la enfermedad hemolítica del recién nacido.

En su descubrimiento concurren dos hallazgos relevantes. El primero de ellos acaeció en 1939, con la publicación por Levine y Stetson, sobre su histórico trabajo, descubriendo como una madre que terminaba de dar a luz a un feto muerto y macerado, había desarrollado una severa reacción hemolítica, por la transfusión de sangre proveniente de su esposo. Ellos encontraron, que el suero de la madre aglutinaba los glóbulos rojos de su esposo y además, del 80% de las personas de grupo O con los cuales se cruzó. Se demostró que el antígeno responsable, era diferente de los ya conocidos ABO, MN y P (Linares, 1986; Dvorkin y col., 2010; Agre y Cartron, 1991).

En la interpretación de estos hallazgos, postularon que la madre había sido inmunizada, desarrollando anticuerpos contra un antígeno del cual ella carecía, pero que estaba presente en los glóbulos rojos del feto, a su vez, heredado del padre. Cuando la paciente fue transfundida con la sangre del esposo, el anticuerpo reaccionó con dicho antígeno causando la reacción hemolítica. Levine y Stetson publicaron este descubrimiento como “Un caso de aglutinación intra grupo”, sin darle nombre al factor sanguíneo que acababan de descubrir; si ellos le hubiesen asignado un nombre, sería ése y no Rh la denominación de este sistema (Linares, 1986).

Un segundo hallazgo, esta vez experimental, se produce en 1949, como resultado de las pruebas en animales, de Landsteiner y Wiener. Ellos inmunizaron conejos y cobayos con glóbulos rojos de los monos *Macacus Rhesus*; obtuvieron un suero que aglutinaba los glóbulos rojos de los monos *Rhesus* y del 85% de la población blanca de Nueva York. Las personas cuyas células eran aglutinadas por el nuevo suero anti-*Rhesus* fueron clasificadas como Rh positivo y el restante 15% que no reaccionaban, como Rh negativo (Machado y col., 2010).

El siguiente paso fue la demostración de Wiener y Peters, de que el anticuerpo anti-Rh, aparentemente, el mismo que había sido elaborado en animales contra los glóbulos rojos del mono *Rhesus*, podría ser encontrado en el suero de algunas personas, quienes habían presentado una reacción hemolítica después de haber recibido una transfusión de sangre ABO compatibles. Hasta este momento, todo sugería que el antígeno presente en el glóbulo rojo del *Macacus Rhesus* y el hallado en los humanos era el mismo, por consiguiente, los

correspondientes anticuerpos deberían poseer igual especificidad (Linares, 1986).

Subsecuentes investigaciones demostraron que dichos antígenos eran diferentes; se determinó que la mayoría de los glóbulos rojos humanos contienen el antígeno del Rhesus y además, otro diferente pero relacionado con este. A sugerencia de Levine, se conservó la denominación de factor Rh para el antígeno del humano y se asignó el nombre de LW (Landsteiner-Wiener) al antígeno común al hombre y al mono. Desde entonces, los estudios realizados en el campo del Rh se han efectuado con el suero proveniente de humanos (Grispan, 1989).

7.1. Estructura del Complejo Rh y sus proteínas

El grupo sanguíneo Rh, es el sistema más complejo, polimórfico e inmunogénico, conocido en los humanos. Sus principales antígenos son D (RH1), C (RH2), E (RH3), c (RH4) y e (RH5), cuenta con más de 49 diferentes antígenos caracterizados. Los glóbulos rojos Rh positivo y Rh negativo, se refieren a la presencia y ausencia, respectivamente, del antígeno D, pero ambas expresan los antígenos C/c y E/e. Los antígenos se encuentran en dos proteínas expresadas en la membrana de los eritrocitos y sus precursores inmediatos, RhD (CD240D) y RhCE (CD240CE), los cuales, llevan los antígenos D (Rh1) y C, c, E, e (Rh2-Rh5) en varias combinaciones (ce, Ce, CE). Ambas proteínas RhD y RhCE son hidrofóbicas y no glicosiladas, con un peso molecular de 30-32 kD. Compuestas por 417 aminoácidos que se distribuyen en seis segmentos extracelulares (responsables de la respuesta inmune), doce transmembranales y siete intracelulares. El gen RHD fue descubierto en el año de 1992, dos años después del RHCE. Actualmente, a pesar de la existencia de más de 170 alelos RHD descritos, este gen no ha sido completamente caracterizado (Machado y col., 2010; Agre y Cartron, 1991).

Las proteínas del Rh se expresan exclusivamente en la superficie del eritrocito en vertebrados superiores y son un tetrámero con dos moléculas de RhAG y dos de Rh (CE o D). La proteína RhD expresa el antígeno D, mientras que la proteína RhCE expresa tanto a los antígenos C o c (que involucran la segunda asa extracelular), junto con los antígenos E y e (que involucran la cuarta asa extracelular) de la misma proteína. La figura 13 es una representación de una molécula de Rh. Existen otras proteínas accesorias al Rh no relacionadas necesariamente con su expresión, con distinta localización génica, masa molecular y número de copias por eritrocito. Se incluyen: Lw o ICAM-4 (Ag LW 19p13.3), proteína asociada a la

integrina, IAP o CD47 (antígeno no conocido, 3q13), glicoforina B GPB o sialoglicoproteína (N, S, s, U. 4q28-q31), banda 3 o AE1 (Diego, 17q12-q21), glicoproteína Fy o DARC. Los antígenos de la familia Rh aparecen en las etapas tempranas de la diferenciación eritropoyética. El anti-D se une aproximadamente a 3% de las BFU-E, a 68 % de las CFU-E y a todos los eritrocitos maduros. Los antígenos del Rh se expresan a partir de la sexta semana de vida intrauterina (Batista, 2005).

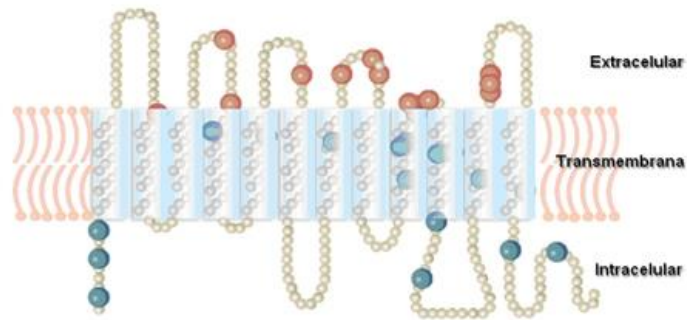


Fig.13 Diagrama de la Molécula de Rh. (Fleury Medicina e saúde [Internet], 2011)

La función de las proteínas del Rh en el humano aún se desconoce, sin embargo, se sabe que tienen 20 % de homología con los transportadores de amonio (Amt) presentes en levaduras, bacterias y algunas plantas. El Rh se encuentra relacionado con otras enfermedades, la enfermedad por Rhnull presenta estomatocitosis, esferocitosis, aumento de la fragilidad globular y anemia hemolítica moderada. Los pacientes con leucemia mieloide crónica, metaplasia mieloide, policitemia vera o mielofibrosis, ocasionalmente presentan doble población de eritrocitos con diferente Rh, en algunos casos asociados con aberraciones cromosómicas. (Batista, 2005).

7.2. Clasificación Actual: Rh Positivo y Rh Negativo

La terminología de Rh positivo y Rh negativo para referirse a la presencia o ausencia del factor Rho antígeno D, presente en la membrana del glóbulo rojo, se mantiene en la actualidad, y

desde el punto de vista clínico, se considera que es suficiente dividir a los humanos en dos grupos. La distinción se hace clasificando los glóbulos rojos con el suero anti-Rh o anti-D producido en humanos, las muestras de sangre que son aglutinadas por dicho suero se clasifican como Rh (D) positivo y denotan la presencia del antígeno Rh (D) en la membrana del eritrocito; las sangres que no muestran aglutinación son denominadas Rh (D) negativo y expresan la ausencia del antígeno (Linares, 1986).

A diferencia del sistema ABO, en donde existen anticuerpos naturales, las personas Rh negativo no contienen bajo condiciones normales, anticuerpos anti-Rh. La formación de este anticuerpo es casi siempre el resultado de la exposición, ya sea por la transfusión o el embarazo, al efecto inmunizante de los glóbulos rojos que contienen el antígeno Rh. La antigenicidad del factor Rh, es mayor que la de cualquier otro grupo sanguíneo, considerándose que de las personas O Rh negativo, que reciben una unidad de sangre O Rh positivo, entre el 50 al 75% se inmunizan.

Los estudios familiares han demostrado que el antígeno D es determinado genéticamente, y el gen que controla su producción se comporta como un autosoma dominante, el gen Rh reside en el cromosoma N°1 y con raras excepciones, las personas que poseen el gen D tienen el antígeno directamente detectable en sus glóbulos rojos (Linares, 1986).

7.3. Fenotipo y Genotipo

En la práctica, existen solamente 5 reactivos para la determinación de los respectivos antígenos: anti-D, anti-C, anti-c, anti-E y anti-e, sin embargo, en la rutina solo se determina el antígeno D usando el suero anti-D. Los demás antígenos se emplean, principalmente, en estudios de familias o en la resolución de problemas de aloinmunización Rh.

La determinación de los antígenos presentes en los glóbulos de una persona, es lo que se conoce como fenotipo. Cuando se determina el fenotipo, la ausencia de un antígeno debe corresponder a la presencia del alelo alterno, el cual estará en doble dosis (homocigoto). En cambio, si ambos están presentes se refieren como heterocigotos (con excepción del antígeno D). A partir del fenotipo se deduce el genotipo, el cual expresa la constitución genética del individuo, con respecto a un determinado rasgo o característica. Debido a que cualquier antígeno puede ser el producto de diferentes complejos, no siempre es posible deducir el genotipo con certeza. Por este motivo, el genotipo se expresa en términos de probabilidades, basadas en el conocimiento de la frecuencia, con la cual una determinada combinación de

antígenos, representa la expresión de un complejo genético (Linares, 1986).

Los antígenos polivalentes tendrán más de una copia de un determinante en particular. Aunque la afinidad de cualquier lugar de unión al antígeno, puede ser la misma para cada epítipo de un antígeno polivalente, la fuerza de la unión del anticuerpo con el antígeno deberá tener en cuenta la unión de todos estos lugares, a todos los epítipos disponibles. Esta fuerza global de la unión se llama avidéz, y es mucho mayor que la afinidad de cualquier lugar de unión al antígeno aislado. De este modo, una molécula de IgM de afinidad baja puede unirse aún más fuertemente a un antígeno polivalente, debido a que muchas interacciones de afinidad baja (hasta 10 por molécula de IgM), pueden producir una interacción con avidéz elevada. Esto se debe a que un anticuerpo con múltiples lugares de unión, tendrá al menos una interacción con unión ligada físicamente al antígeno durante un mayor tiempo, que un anticuerpo con solo dos lugares de unión; este último tiene más posibilidades de desprenderse del antígeno, y por tanto, menos avidéz por el antígeno, aunque cada fragmento Fab en las dos formas posea una afinidad equivalente por el antígeno (Rojas, 2006; Linares, 1986).

8. Técnicas Utilizadas Para la Determinación del Grupo Sanguíneo ABO y Rh en Manchas de Sangre Seca

El sistema ABO ha sido un foco importante en el área de la ciencias forenses, ya que los registros que se tienen de este sistema sanguíneo son muy prevalentes; los antígenos A, B y H presentes en los eritrocitos, también se asocian con otras células y tejidos de todo el cuerpo y se sabe que son muy estables en condiciones violentas, tales como calentamiento o secado (Nishi y col., 1979).

En 1923, Vittorio Siracusa desarrollo el método de absorción-inhibición, el cual detecta el tipo de antígenos presentes en la superficie de los glóbulos rojos. Después desarrollo el método de absorción-elución en 1930, y todas estas pruebas, además de las modificaciones y variantes, han sido aplicadas en la serología forense.

La tipificación de la sangre y los fluidos corporales en el trabajo forense, por lo general, implica manchas de sangre y no la sangre completa y líquida; el material manchado puede ser viejo y puede haber estado sometido a condiciones adversas. No hay glóbulos rojos enteros en las manchas de sangre, ya que las membranas, se rompen cuando las manchas se secan. Sin embargo, los antígenos de superficie sobreviven y son más estables que los anticuerpos séricos. Cuando las muestras de sangre seca se retienen sobre un buen soporte, como son fibras textiles, las partículas allí adheridas conservan eficientemente el material antigénico.

La tipificación mediante el método de absorción-elución puede llevarse a cabo en muestras muy pequeñas (hilos o fibras) y se ha demostrado que funciona en manchas que tienen 10 años o más. Este método también es más sensible que el método de absorción-inhibición y es usualmente el método de elección (Bell, 2008).

Las sustancias antigénicas A y B son muy comunes en la naturaleza, encontrándose en plantas, animales y en insectos. Esto representa un peligro de falsos positivos si otro material biológico ha contaminado la muestra forense. Los falsos negativos son posibles si la muestra ha sido expuesta a clima extremo o es muy vieja. Esto ilustra un problema común en las ciencias forenses: a menudo no es la exactitud ni la precisión de un método de prueba lo que determina su éxito, de hecho, es el estado de la muestra. Las manchas de sangre son más difíciles de tipificar que la sangre completa; la edad, el clima o daños en las manchas de sangre hacen más difícil o imposible la tipificación (Karthika y Elumalai, 2013).

9. Métodos de Absorción-Inhibición y Absorción-Elución

Para identificar el grupo sanguíneo y fluidos corporales en el sistema ABO y otros sistemas sanguíneos, se utilizan dos métodos. El método de absorción-inhibición, el cual fue desarrollado en 1923, seguido por el método de absorción-elución, desarrollado en 1930, ambos en Italia, por Vittorio Siracusa (WFS, 2005).

Muchas modificaciones y variantes han ido apareciendo, pero a pesar de esto, los procedimientos generales se han podido aplicar a otros sistemas de grupo de sanguíneo. Aunque los glóbulos rojos se rompen cuando se seca la mancha de sangre, los antígenos A y B que están presentes en la superficie celular persisten. Como resultado, estos métodos funcionan en sangre entera, fluidos corporales (asumiendo que la persona es secretora) y manchas de cualquiera de estos fluidos.

El método de absorción-inhibición actúa reduciendo la potencia de un antisuero basado en el tipo sanguíneo y la cantidad de antígenos presentes en la mancha. Por ejemplo, si la mancha de sangre proviene de una persona con tipo sanguíneo B, la muestra contendrá antígenos B. Si un antisuero anti-A de una potencia conocida es adherido a la mancha, no pasará nada. Por el contrario, si un antisuero anti-B es adherido, algunos de los anticuerpos se unirán a los antígenos B, reduciendo la potencia original del antisuero. Esta reducción de la potencia, es la inhibición, por la cual, este método es llamado absorción-inhibición (Bell, 2008).

Aunque es eficaz, el método de absorción-inhibición es menos sensible que el método de absorción-elución, por lo tanto, requiere muestras más grandes. Esto representa un problema si la mancha es muy pequeña, o la cantidad de muestra es limitada, una situación encontrada normalmente en los análisis forenses. Consecuentemente, la utilización del método de absorción-elución, es más común en aplicaciones forenses (Bell, 2008).

El método de absorción-elución, está basado en la elución de anticuerpos unidos a los antígenos presentes en la mancha. La técnica de absorción-elución, tiene como fundamento un primer proceso de absorción específica; primero, se lleva a cabo la absorción específica, entre la mancha problema y su anticuerpo homólogo; después de que la absorción es completa, el excedente de anticuerpo se elimina por medio de lavados con solución salina fría, el complejo antígeno-anticuerpo se disocia por calentamiento, generalmente a 56°C; el anticuerpo eluido se pone en contacto con eritrocitos lavados de propiedades antigénicas conocidas; finalmente la aglutinación indica la presencia de un antígeno de la misma especificidad que el de las células utilizadas como testigo conocido (Figura 13) (Franco, 2002; Jan y John, 1973).

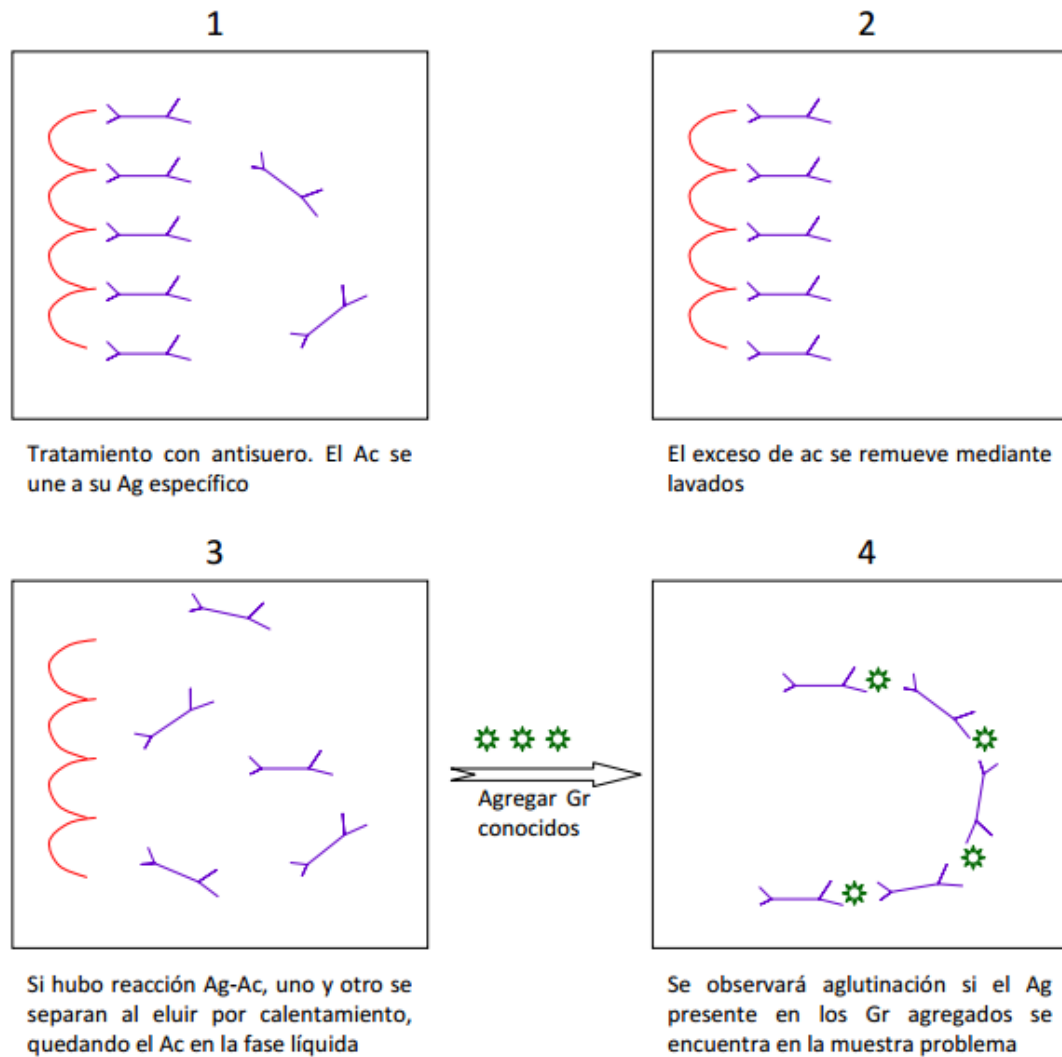


Figura 14. Fundamento de la técnica de absorción-elución. (Hematología Forense y otras técnicas serológicas, Franco, 2002)

A continuación se enlistan las técnicas conocidas para la identificación del grupo sanguíneo ABO y Rh en manchas de sangre seca:

- Técnica de Absorción-Elución para la Determinación del Grupo del Sistema ABO en Manchas de Sangre Seca (Anexo 1)
- Técnica de Absorción-Elución para la Determinación de los Factores Rh en Manchas de Sangre Seca (Anexo 2)

- Técnica de Absorción-Inhibición para la Determinación de Grupo del Sistema ABO en Manchas de Sangre (Anexo 3)

Según la bibliografía, se considera más conveniente desde el punto de vista inmunológico, la utilización de la técnica de absorción-elución para la identificación del grupo sanguíneo ABO y Rh, en muestras de sangre seca analizadas en el laboratorio de química forense, además de la optimización de recursos, ya que con dicha técnica se requiere una cantidad mínima de muestra (Franco, 2002; Bell, 2008).

III. METODOLOGÍA

1. Obtención de Muestras Tipificadas Previamente

Para la preparación de las muestras problema conocidas y control, se recolectaron muestras de sangre conocidas (A, B, O positivo y O negativo) en tubos con EDTA, por medio de la técnica de venopunción; posteriormente, cada tubo fue vaciado por separado, en una superficie de piso firme, formándose así la mancha de sangre, que se dejó secar, por uno, dos, tres y cuatro meses.

2. Procedimiento

Para la determinación del grupo sanguíneo ABO y Rh se utilizó la técnica de Absorción-Elución (Anexo 3) con una serie de modificaciones, las cuales se indican a continuación.

Con ayuda de un hisopo y un trozo de manta humedecidos con solución salina, se tomó la muestra de sangre; se colocó la manta sobre la mancha de sangre, y con el hisopo se frotó suavemente hasta que la manta quedará totalmente impregnada. Dicho procedimiento se repitió con las tres manchas de sangre restantes. Para fijar las muestras, fueron cubiertas con metanol; una vez secas, se procedió a cortar los trozos de manta de 3mm², los cuales fueron agregados a sus tubos correspondientes.

Una vez acomodadas las muestras en orden en la gradilla, se procedió con los pasos siguientes, indicados en la técnica de absorción-elución. Se utilizaron antisueros de la marca SPINREACT, los cuales fueron diluidos previamente con el Buffer Final de Fosfatos. Se agregó a cada tubo de la hilera anti-A, dos gotas de la dilución de antisuero anti-A (1:10), a los de la hilera anti-B, dos gotas de la dilución de antisuero anti-B (1:10), a la hilera Rh y Rh T.A., 1 gota de anti-D sin diluir, a la hilera Rh1, dos gotas de la dilución Rh1 (1:5) y a la hilera Rh2, dos gotas de la dilución Rh2 (1:10). Los tubos marcados con (4°C), se dejaron en refrigeración a 4°C, en un refrigerador marca SOBRINOX, modelo RVS-114, por 3, 6, 9 horas; mientras que las hileras marcadas con (TA), se dejaron a temperatura ambiente.

Al concluir el tiempo de refrigeración/TA se prosiguió con la técnica; se lavó cada tubo refrigerado, con solución salina fría hasta obtener una solución clara e incolora. Se realizó el mismo procedimiento para los tubos a TA, solo que se utilizó solución salina a TA. Posteriormente, se añadió a cada tubo dos gotas de solución salina a TA.

Se colocó la gradilla en el baño maría, marca THERMO SCIENTIFIC, modelo 2837, a 56°C durante 10 min; al concluir el tiempo de incubación, se fueron sacando los tubos en grupos de 6; con la ayuda de un aplicador de madera, se sacó el trozo de manta de cada tubo.

Para confirmar la presencia de los anticuerpos correspondientes en las muestras, se agregó una gota de glóbulos rojos lavados al 2%: del grupo A a los tubos de la hilera A, del grupo B a los tubos de la hilera B y Rh positivo a los de la hilera R; se llevó a cabo la centrifugación de los tubos, en una centrifuga marca KITLAB, modelo B80 6/05, durante 1 min a 3.400 rpm, y por último se observó si había o no aglutinación.

3. Variantes de la técnica

- Cada muestra se analizó por triplicado.
- Las muestras se dividieron en 3 grupos (refrigeración y TA): 3 horas, 6 horas y 9 horas.
- Después de 3 horas de refrigeración/TA, se llevó a cabo la técnica con el primer grupo de muestras, mientras los otros grupos cumplían con el tiempo indicado para realizarles la técnica (6, 9 horas).

4. Interpretación de Resultados

-Observación macroscópica de los tubos.

Si se observa aglutinación:

- En el tubo problema de la hilera anti-A, el grupo corresponderá al A.
- En el tubo problema de la hilera anti-B, el grupo corresponderá al B.
- En los tubos problemas de las hileras anti-A y anti-B, el grupo corresponderá al O.
- En el tubo problema de la hilera anti-D, el Rh será positivo; en caso contrario negativo.

Muestra conocida “B” Rh Positivo

Para la muestra conocida “B” Rh Positivo, se observó que en los tres intervalos de tiempo (3, 6, 9 horas), y durante los cuatro meses, se obtuvo resultado de aglutinación negativa para el antígeno A, y positiva el para antígeno B, indicándonos la ausencia y presencia respectivamente de dichos antígenos, confirmándonos así el grupo sanguíneo B.

En el caso del antígeno D, no se obtuvieron resultados de aglutinación positiva constantes durante el periodo de tres horas, en ninguno de los cuatro meses, tanto en las muestras refrigeradas como en las de TA. En los periodos de seis y nueve horas, se observan resultados de aglutinación positiva constantes, únicamente para las muestras refrigeradas. Podemos resaltar el periodo de seis horas, donde se muestra aglutinación positiva constante en los tres primeros meses, y solamente un resultado de aglutinación negativa en el cuarto mes, por lo tanto, la variabilidad de los resultados es mínima, lo cual nos indica la presencia del antígeno D, confirmándonos el factor Rh positivo en dichas muestras.

| Tiempo | # de Muestra | Mes#1 | | | | Mes#2 | | | | Mes#3 | | | | Mes#4 | | | |
|---------|--------------|-------|---|----------------|----------------|-------|---|----------------|----------------|-------|---|----------------|----------------|-------|---|----------------|----------------|
| | | Tubo | | | | Tubo | | | | Tubo | | | | Tubo | | | |
| | | A | B | D ^a | D ^b | A | B | D ^a | D ^b | A | B | D ^a | D ^b | A | B | D ^a | D ^b |
| 3 horas | 1 | - | + | - | N | - | + | - | - | - | + | + | + | - | + | + | + |
| | 2 | - | + | - | N | - | + | - | - | - | + | + | - | - | + | - | + |
| | 3 | - | + | - | N | - | + | - | - | - | + | + | - | - | + | + | + |
| 6 horas | 1 | - | + | + | N | - | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + |
| | 2 | - | + | + | N | - | + | + | - | - | + | + | - | - | + | + | - |
| | 3 | - | + | + | N | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + | - | - |
| 9 horas | 1 | - | + | + | N | - | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + |
| | 2 | - | + | + | N | - | + | + | - | - | + | + | - | - | + | + | - |
| | 3 | - | + | - | N | - | + | + | - | - | + | - | - | - | + | + | + |

| | |
|---|------------------------------|
| A: Muestra + anti-A (4°C) | (+): Aglutinación Positiva |
| B: Muestra + anti-B (4°C) | (-): Aglutinación Negativa |
| D ^a : Muestra + anti-D (4°C) | (N): No se realizó la prueba |
| D ^b : Muestra + anti-D (TA) | |

V. DISCUSIONES

El presente estudio describe la identificación de los grupos sanguíneos ABO y Rh por medio de la técnica de absorción-elución, técnica mayormente utilizada debido a su especificidad inmunológica.

En el sistema ABO, antígenos A y antígenos B, los resultados fueron constantes, lo cual, puede deberse a su composición química, principalmente formada por carbohidratos. Dichas moléculas son más estables y pueden conservarse durante más tiempo.

Para los antígenos del sistema Rh, la conservación de los componentes que los conforman es más compleja, debido a que se encuentran principalmente constituidos por proteínas, las cuales son más termolábiles, y se desnaturalizan fácilmente, proporcionándonos con esto, resultados de aglutinación negativa, cuando debería ser positiva, ya que estos antígenos, por diferentes razones, ya no están presentes en las muestras o no pudieron ser detectados.

En el caso de la identificación del antígeno D, hubo modificaciones con la realización de la técnica; primeramente, se utilizaron diluciones del antisuero anti-D (1:5, 1:10), las cuales fueron descartadas de los resultados, ya que no mostraban aglutinación en ninguna de las muestras, indicándonos que al diluir dicho antisuero, se ve afectada la unión Ag-Ac, lo cual pudiera deberse a la poca concentración de anticuerpos, a la inestabilidad en los anticuerpos y/o antígenos producida por cambios de pH, reactividad de las moléculas, entre muchos otros factores, por lo tanto, el antisuero anti-D para Rh, debe seguir utilizándose concentrado.

Por otro lado, la prueba con el antisuero anti-D a TA, no se realizó en el primer mes, debido a que no se había analizado la posibilidad de que la molécula de Rh reaccionara favorablemente, si se mantenía a TA, en lugar de refrigerar a 4°C; sabemos que algunos antígenos reaccionan favorablemente a esta temperatura, pero en este caso no fue así. Los resultados de aglutinación positiva obtenidos fueron esporádicos, lo cual nos indica una inconsistencia con la metodología; esto pudiera deberse a que a temperatura ambiente, los grados pueden oscilar entre 20 y 25°C, por lo tanto la temperatura no es constante, a diferencia de las muestras en refrigeración a 4°C, donde si se mantiene constante la temperatura durante todo el periodo.

En las muestras refrigeradas a 4°C con antisuero anti-D, no se observaron resultados constantes de aglutinación positiva durante los dos primeros meses, sino hasta a partir del tercer mes, esto pudo deberse a errores en la realización de la técnica, durante los dos

primeros meses; al terminar el proceso de elución (separación del complejo Ag-Ac por medio de calentamiento), las muestras fueron sacadas en su totalidad de la incubadora, y se iban procesando una por una; durante este tiempo, las muestras iban perdiendo su temperatura, lo cual puede revertir el proceso de elución o afectar a los anticuerpos presentes, evitando así, la formación de un nuevo complejo Ac-Ac al agregar los glóbulos rojos lavados. A partir del tercer mes, las muestras eran retiradas de la incubadora en grupos de seis, y una vez concluido el proceso, se proseguía con el siguiente grupo; a partir de esta modificación los resultados de aglutinación positiva para Rh comenzaron a ser constantes y reproducibles. Otra modificación muy importante, fue en el proceso de centrifugación, donde la mayoría de las muestras debieron ser centrifugadas en dos o tres ocasiones para poder observar aglutinación positiva.

Si bien es cierto que hubo variaciones en los resultados para la identificación del antígeno D, se obtuvieron resultados constantes y favorables en algunos periodos; se debe tomar en cuenta los errores técnicos que se presentaron en la realización del estudio, además de la inestabilidad de la molécula de Rh para formar complejos Ag-Ac, lo cual, como indican algunas bibliografías, puede reducirse, utilizando potenciadores de reacción, como albúmina, el uso de este reactivo podría mostrar menor variabilidad en los resultados.

Los falsos negativos son posibles si la muestra ha sido expuesta a clima extremo o es muy vieja. Esto ilustra un problema común en las ciencias forenses: a menudo no es la exactitud ni la precisión de un método de prueba lo que determina su éxito, de hecho, es el estado de la muestra. Las manchas de sangre son más difíciles de tipificar que la sangre completa; los factores propios de los antígenos, la edad, el clima, el polvo, contaminación con partículas del medio ambiente, daños en las manchas de sangre, sin descartar los errores en la realización de la técnica, mal manejo de muestras y reactivos, entre otras, hacen más difícil o imposible la tipificación, debido a que estos factores están siempre presentes y pueden afectar los resultados esperados.

Las muestras fueron analizadas por un periodo de cuatro meses, durante los cuales mostraron un comportamiento constante y reproducible, mayormente para los antígenos del sistema ABO y con poca variabilidad para el sistema Rh.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que:

Aplicando la técnica en refrigeración a 4°C, se obtienen resultados confiables y reproducibles para la identificación de los antígenos del sistema ABO y Rh, utilizando los siguientes periodos de tiempo:

- Para el sistema ABO, 3, 6 y 9 horas.
- En el caso del sistema Rh, 6 y 9 horas.

No se debe diluir el antisuero anti-D.

Se pueden obtener resultados en muestras expuestas al medio ambiente hasta por 4 meses.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar la técnica de absorción-elución para la determinación del grupo del sistema ABO y Rh en manchas de sangre seca, con un periodo mínimo de 6 horas de refrigeración a 4°C.

VIII. REFERENCIAS

1. Franco M. 2002. Hematología forense y otras técnicas serológicas. 4ta edición. Editorial Porrúa.
2. Linares J. 1986. Inmunoematología y Transfusión. 1ra Edición, Caracas, Venezuela. 176p.
3. Mckenzie S. 2000. Hematología Clínica. 2da Edición. Editorial El Manual Moderno.
4. Abbas A, Lichtman A, Pillal S. 2012. Inmunología celular y molecular. 7ma Edición. Editorial Elsevier Inc. 527p.
5. Massimo F, Giancarlo M. 2013. ABO blood group: old dogma, new perspectives. Volume 0, Issue 0, Pages 1–9, ISSN (Online) 1437-4331, ISSN (Print) 1434-6621.
6. Negre M, Castelló A, Gil P, Verdú F. 2003. ¿Manchas de sangre?: seguridad en pruebas de orientación. Bloodstains? Reliability of the presumptive test. Cuadernos de Medicina Forense Nº 34.
7. Villegas M, Acevedo M, Miranda J y Pinto E. 2005. Validación de técnicas para detección de sangre, sangre humana y grupo sanguíneo ABO en diferentes soportes y condiciones con fines forenses. Validation of techniques for detection of blood, human blood and sanguineous group ABO under different supports and conditions with forensic purposes. Cuadernos de Medicina Forense, 11(42),
8. Castelló A, Álvarez M, Miquel M, Verdú F. 2002. Revelado de manchas latentes: efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA. Development of latent stains: effectiveness of luminol and evaluation of its effect on DNA analysis. Cuadernos de Medicina Forense Nº 28.
9. Pawan M, Lata K, Aarti S, Sonal C. 2011. Efficacy and accuracy of ABO blood group determination from saliva. Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology; 23 (3):163-167.

10. Tetsuya K, Maloto Y, Tomoaki M, Atsushi A. 1999. Effects of solvents displacement on sensitivity and specificity of monoclonal antibodies for ABO blood grouping of forensic specimens with an absorption-elution test. *Legal Medicine (Legal Med)*; 68-75.
11. Toshimitsu W, Atsushi A, Yutaka O, Sumitaka Y, Takuma T, Manabu Y. 2003. ABO and Rh phenotyping by absorption-elution technique using cerebral dura mater. *Department of Legal Medicine* 5 S187-S190.
12. Gurminder K, Vijay K. 1998. Comparison of absorption-inhibition and absorption-elution methods in the detection of ABO (H) antigens in sweat stains. *Current Science*, Vol. 57, No.22.
13. Baptista H. 2005. El sistema Rh, una mirada a fondo. *RevMedInstMexSeguroSoc*; 43 (Supl 1):3-8.
14. Jan S, John E. 1973. A Simple Procedure for ABO Typing of Dried Bloodstains on Fibers by the Absorption-Elution Technique. *Journal of the Forensic Science Society*, Volume 13, Issue 3, Pages 217-222.
15. Kind S. 1960. Absorption-elution grouping of dried blood smears. *Nature*; 185: 397-8.
16. Kobayashi T, Yokota M, Mitani T, Akane A. 1999. Effects of solvent displacement on sensitivity and specificity of monoclonal antibodies for ABO blood grouping of forensic specimens with an absorption-elution test. Saka 541-0053, Japan. *Leg Med (Tokyo)*. Apr; 1(2):68-75.
17. Gaensslen R; Lee C. 1983. "Forensic Science An Introduction to Criminalistics De Forest P.R", New York: McGraw –Hill, 632-643.
18. Bonnet E. 1978. *Medicina Legal*. 2da Edición. Editorial Buenos Aires: López Libreros Editores.

19. Sheehan F. Kobilinsky L. 1994. "Identificación de Sangre Humana" J. Of Chemical Education, 61, 1, 2.
20. Grispan S. 1983. Grupos Sanguíneos ABO y Rh, REV. MEDICA HONDUR. VOL. 51.
21. Brett A. Schweers, Jennifer O, Boonlayangoor P, Karl A. 2008. Developmental validation of a novel lateral flow strip test for rapid identification of human blood (Rapid Stain Identification™-Blood). Forensic Science International: Genetics 2. 243-247.
22. Arbeláez C. 2009. Sistema de grupo sanguíneo ABO. Medicina y Laboratorio 2009; 15: 329-347.
23. Instituto de Ciencias Forenses de Puerto Rico. 2011 [Internet] <http://www.icf.gobierno.pr/criminalistica/quimica.php>
24. Criminalistica.mx, 2013, [Internet] <http://www.criminalistica.com.mx/areas-forenses/quimica-forense>
25. World of Forensic Science. 2005. Siracusa, Vittorio. Retrieved November 24, 2014 from [Internet] <http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-3448300516.html>
26. Roitt I, Delves P. 2011. Roitt's Essential Immunology. Tenth Edition. Blackwell Publishing. Cap 1, 2,3,4,5. Pp 1-128.
27. Encyclopedia of forensic science. 2008. Bell S. Rev. Ed. Library of Congress Cataloging-in Publication Data. Facts On File, Inc. NY. Cap 2.
28. Nishi K, Tanaka N, Okazaki S, Maeda H, Tsuji T, Nagano T. Effect of heat on blood group A- and B-active glycolipid extracted from AB human erythrocytes. Jpn J Legal Med 1979; 33:86-90.
29. Maeda H, Nishi K, Okazaki S, Tsuji T, Tanaka N, Nagano T. 1979. Activity changes of blood group antigens in dried blood stains on standing. J Wakayama Med Soc.; 30:211-218(in Japanese).

30. Cox M. 1991. A Study of the Sensitive and Specificity of Four Presumptive Tests for Blood. *J Forensic Sci.*; 36(5): 1503-1511.
31. Machado L, Szulman A, Barreto J, Araujo E, Fernández A. 2010. Bases Moleculares do sistema Rh e suas aplicacoes em obstetricia e medicina transfusional. *RevAssocMedBras* 2010; 56(6): 724-8.
32. Karthika B, Elumalai M. 2013 Apr. Identity of blood group from dental pulp of deceased human. *Int J Pharm Bio Sci*; 4(2): (B) 1000-1004.
33. Agre P, Cartron J. 1991. Molecular Biology of the Rh Antigens. *Blood*, Vol 78, No 3 (August 1). pp551-563.
34. Henry J. 2005. El laboratorio en el diagnóstico clínico. Marbán Libros, S.L.; p. 479-517.
35. Bleuter E, Kipps T, Coller B, Seligsohn U, Lichtman M. 2005. Williams Hematología. Marbán.
36. Murray R. 2009. Reed blood cells. 28va Edición. Editorial McGraw-Hill.
37. Karp G. 2010. Cell and molecular Biology: Concepts and Experiments. Ed McGraw-Hill.
38. Rojas O. 2006. Inmunología (de memoria). 3ra Edición. Editorial Médica Panamericana.
39. Arbeláez C. 2009. Fundamentos de genética e inmunología para bancos de sangre y medicina transfusional. *Medicina & Laboratorio*, Volumen 15, Números 1-2.15: 37-68.
40. Arce A, Villaescusa R. 2005. Organización de la membrana celular: banda 3, estructura y función. Instituto de Hematología e Inmunología
41. Mollison P. 1987. Transfusión de sangre en medicina clínica. Editorial Reverte, S.A. Impreso en España.
42. Fainbiom L. Geffner J. 2005. Introducción a la Inmunología Humana. 5a Edición. Editorial Médica Panamericana. Capítulo 10, Sección 3. Pp283.

43. Dvorkin M. Cardinali D. Lermoli R. 2010. Bases fisiológicas de la práctica médica. Editorial Médica Panamericana. 14^a edición. Sección 3. Capítulo 21.
44. Quintanar M. Calderón JV. 2007. Calcio y Eritrocitos. REB 26(1): 3-10.

IX. ANEXOS

Anexo 1

Técnica de Absorción-Elución para la Determinación del Grupo del Sistema ABO en Manchas de Sangre Seca

Material Empleado

1. Sueros hemoclasificadores anti-A, anti-B, anti-AB y lectina anti-H
2. Metanol
3. Na_2HPO_4
4. KH_2PO_4
5. NaCl
6. Tubos de ensaye 13 x 100
7. Pipetas Pasteur
8. Bulbos de goma
9. Tijeras
10. Aplicadores de madera
11. Guantes desechables
12. Tela estéril y sin apresto, de algodón
13. Gradilla para tubos de ensaye de 13 x 100
14. Refrigerador
15. Centrifuga
16. Baño maría a temperatura constante
17. Horno

Reactivos

1. Buffer salino (solución estándar)
 - a) Solución 1/15 M de Na_2HPO_4 (9.47gr/L)
 - b) Solución 1/15 M de KH_2PO_4 (9.08gr/L)

2. Buffer final:

A 72mL de la solución a) añadir 50mL de la solución b) y 8.5gr de cloruro de sodio Q.P.
Aforar a 1000mL en matraz volumétrico (pH: 7.2)

3. Preparación de antisueros:

Los sueros anti-A y anti-B, se diluyen de la siguiente manera:

-1:10: a 1mL de antisuero, se añaden 9mL de solución final.

El suero anti-D, se maneja sin diluir.

Procedimiento

1. Cortar cuatro fragmentos de tela impregnada con sangre problema, que medirán 3mm cuadrados (cuando la mancha problema no se encuentre sobre tela, absorberla con solución salina en pequeños trozos de tela de algodón), y colocar cada recorte en los tubos necesarios.
2. Los tubos se colocan en una misma columna de una gradilla, columna que se marcará como problema.
3. En la forma antes descrita se prepara otra serie de tubos en cuyo interior se colocaran fragmentos de tela manchados con sangre de grupo conocidos: A, B, AB, O, marcándose tal columna como testigo.
4. Igualmente se colocará otra serie de tubo que contengan fragmentos de una parte de la tela de estudio, que no se encuentren maculadas con sangre y se pondrán en una tercera columna asignada como control.
5. Obsérvese en el diagrama siguiente como las hileras horizontales de la gradilla se marcarán: anti-A, anti-B, anti-AB, anti-H; en cada una de ellas y en la columna correspondiente al testigo, se encontrará al respectivo tubo conteniendo muestras de grupo sanguíneo conocido, requisito sin el cual la técnica carece de validez.

| | Problema | Test | Control |
|---------|----------|-----------------|---------|
| Anti-A | ○ | ⊙ _A | ○ |
| Anti-B | ○ | ⊙ _B | ○ |
| Anti-AB | ○ | ⊙ _{AB} | ○ |
| Anti-H | ○ | ⊙ _O | ○ |

6. Fijar las manchas de sangre impregnadas en tela, cubriéndolas con metanol cuando menos durante 15 minutos. Después de este tiempo eliminarlo totalmente.
7. Agregar a cada tubo de la hilera anti-A, dos gotas de anti suero anti-A, dos gotas de suero anti-A; a los de la hilera B, suero anti-B; a los de la hilera AB, suero anti-AB y a los de la hilera anti-H, lectina anti-H.
8. Dejar en refrigeración durante toda la noche a 4°C
9. Lavar con solución salina fría 6 veces o hasta obtener una solución clara e incolora.
10. Añadir a cada tubo dos gotas de solución salina a temperatura ambiente.
11. Colocar la gradilla en el baño maría a 56°C durante 10 o 15 min.
12. Sacar cuidadosamente los trozos de tela con un aplicador de madera, diferentes para cada tubo.
13. Agregar una gota de glóbulos rojos lavados al 2%.
 - Del grupo A a los tubos de la hilera A
 - Del grupo B a los tubos de la hilera B
 - Del grupo AB a los tubos de la hilera marcada AB
 - Del grupo O a los de la hilera H

14. Centrifugar durante treinta segundos a 3.400 revoluciones por minuto.

15. Observar si existe o no aglutinación.

Anexo 2

Técnica de Absorción-Elución para la Determinación de los Factores Rh en Manchas de Sangre Seca

Para efectuar estas determinaciones es indispensable contar con una muestra de sangre fresca del grupo O que contenga los cinco antígenos de sistema Rh (R1R2).

Preparación para las células testigo: Estas células deberán prepararse inmediatamente antes de ser utilizadas, a partir de una muestra de sangre con las características anotadas en el párrafo anterior, lavándolas tres veces con solución salina y tratándolas posteriormente con bromelina comercial diluida 1:10 con una solución buffer Ph-5.7, que se prepara como sigue:

Buffer de fosfatos pH-5.7:

14 volúmenes de Na_2HPO_4 0.2 molar

14 volúmenes de NaH_2PO_4 0.2 molar

15 volúmenes de agua destilada

Procedimiento

1. Colocar dos gotas de glóbulos rojos lavados R1R2 en un tubo de 12x75.
2. Agregar a un segundo tubo 0.1mL de la solución buffer, quedando así la enzima diluida 1:10. Mezclar perfectamente.
3. Colocar cada tubo en la incubadora durante 5 a 6 minutos.

4. Añadir cuatro gotas de buffer con bromelina a las dos gotas del paquete globular R1R2. Mezclar.
5. Colocar este tubo en la incubadora a 37°centrigrados, exactamente durante diez minutos.
6. Sacar el tubo de la incubadora y llenarlo con solución salina estéril y fresca; centrifugar inmediatamente; de esta manera lavar con solución salina tres veces más, usando pipeta Pasteur para eliminar el sobrenadante, dejando al fondo el paquete globular y agitando la solución salina en cada lavado.
7. Con los glóbulos lavados hacer una suspensión al 3.5%, aproximadamente.

Preparación de las Muestras

1. Manera de efectuar las diluciones de sueros:
 - a) Diluir los antisueros anti-D y anti-c, usando una gota de suero y 9 gotas de solución salina con lo que quedarán diluidos 1:10.
 - b) Los sueros anti-C, anti-E y anti-e se diluirán en la proporción de 1:2, es decir, una gota de suero y una gota de solución salina.
 - c) La albúmina bovina se diluirá al 1.5% con solución salina.
2. Cortar fragmentos de tela manchada tanto con sangre problema como con sangre testigo, de 3x3 mm para los grupos c y D y de 4x4 para los grupos C, E y e.

Aplicación de la Técnica

1. Colocar los fragmentos de tela en sus respectivos tubos.
2. Añadir una gota del antisuero específico en cada uno de los tubos correspondientes, a la dilución arriba indicada.

| | C | <u>C</u> | D | E | <u>e</u> |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Testigo | | | | | |
| Positivo | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| PROBLEMA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| Testigo | | | | | |
| Negativo | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

3. Tapar bien los tubos y colocar la gradilla en la que se encuentran, dentro de la incubadora a 37°C, durante toda la noche.
4. A la mañana siguiente lavar con solución salina durante dos horas, cambiando seis veces esa solución con intervalos de veinte minutos.
5. Quitar la última solución salina y agregar 3 gotas de albúmina diluida como se indica en c) a cada tubo, para la elución.
6. Incubar durante 40 minutos el baño de agua a 60°C, sin tapar.
7. Sacar la gradilla con los tubos del baño y rápidamente retirar las piezas de tela, con la ayuda de los aplicadores de madera.
8. Agregar células testigo H1R2 tratadas con bromelina y tapar los tubos.
9. Incubar a 37° centígrados durante hora y media.
10. Centrifugar durante un minuto.

11. Leer macroscópicamente y después anotar los resultados, pasar el contenido de cada tubo a una laminilla que contenga una gota de solución salina, mezclar y leer al microscopio, cuidando de haber anotado previamente en cada laminilla la letra correspondiente.

Anexo 3

Técnica de Absorción-Inhibición para la Determinación de Grupo del Sistema ABO en Manchas de Sangre

El material antígeno se coloca en contacto con su anticuerpo homólogo a fin de efectuar su absorción específica. El anticuerpo en el sobrenadante, se observa con eritrocitos de propiedades antigénicas conocidas; cabe señalar la conveniencia de trabajar con testigos de grupo conocido.

Preparación de la Solución Buffer

Solución a) Prepara una solución de fosfato ácido de sodio Na_2HPO_4 1/15 molar (9.47 gramos por litro).

Solución b) KH_2PO_4 1/15 molar (9.08 gramos por litro).

1. Buffer final: En un matraz volumétrico de 1,000mL, colocar 72 mL de la solución a); 28 mL de la solución b) y aforar a 1,000 mL con solución salina (8.5 gr de NaCl en 1,000 mL de agua destilada); el pH final deberá ser de 7.2

Preparación de los Sueros:

-Anti-A: Se diluyen 3.5 mL del suero con 450 mL del buffer pH 7.2

-Anti-B: Se diluyen 1.0 ml del suero con 450 mL del buffer arriba señalado.

-Anti-H: Se utiliza sin diluir.

NOTA: En este procedimiento, el antisuero debe ser preparado titulado el antígeno ya que se prueba el anticuerpo residual, siendo por lo tanto de suma importancia la concentración inicial.

Preparación de las células conocidas: Lavar tres veces con el buffer salino pH 7.2 y hacer una suspensión al 2% con eritrocitos conocidos de los grupos O, A2 y B.

Procedimiento

1. Cortar fragmentos de tela impregnada de muestra problema (3mm) y en hileras de tubos: anti-A, anti- B y anti-H.
2. Poner tres gotas de cada uno de los sueros en sus respectivas hileras.

| | Problema | Test | Control |
|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Anti-A | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| Anti-B | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| Anti-H | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

Interpretación de los Resultados

1. Si se observa aglutinación con anti-A y con anti-B, pero no con anti-H, el grupo buscado será O.
2. Si hay aglutinación en los tubos con anti-B y con anti-H, pero no en el de anti-A, el grupo será A1.
3. Si no existe aglutinación con anti-A ni con anti-B, pero si con anti-H, el grupo es AB.
4. Si se obtiene aglutinación con anti-B, pero no la hay con anti-A ni con anti-H, el grupo corresponderá al A2.
5. Si hay aglutinación con anti-A y con anti-H, pero no con anti-B, el grupo será B.

Anexo 4

Técnica de Absorción-Elución para la Determinación del Grupo del Sistema ABO en Manchas de Sangre Seca Modificada

Material Empleado

1. Sueros hemoclasificadores anti-A, anti-B, anti-D, marca SPINREACT
2. Metanol
3. Na_2HPO_4 ,
4. KH_2PO_4
5. NaCl
6. Tubos Falcón
7. Pipetas Pasteur
8. Tijeras
9. Aplicadores de madera
10. Guantes desechables
11. Tela estéril y sin apresto, de algodón
12. Gradilla
13. Refrigerador, marca SOBRINOX, modelo RVS-114
14. Centrifuga, marca KITLAB, modelo B80 6/05
15. Baño maría a temperatura constante, marca THERMO SCIENTIFIC, modelo 2837

Reactivos

Buffer salino (solución estándar)

-Solución 1/15 M de Na_2HPO_4 (9.47gr/L)

-Solución 1/15 M de KH_2PO_4 (9.08gr/L)

Buffer final: A 72mL de la solución a) añadir 50mL de la solución b) y 8.5gr de cloruro de sodio

Q.P. Aforar a 1000mL en matraz volumétrico (pH: 7.2)

Preparación de antisueros:

Los sueros anti-A y anti-B, se diluyen de la siguiente manera:

1:10: a 1mL de antisuero, se añaden 9 mL de solución final.

El suero anti-D, se maneja sin diluir y con dos diluciones:

1:10: a 1mL de antisuero, se añaden 9 mL de solución final

1:5: a 2mL de antisuero, se añaden 8 mL de solución final.

Procedimiento

1. Tomar la muestra de sangre, de la mancha puesta previamente en el suelo, con un pequeño trozo de manta. (Se repitió con las 3 manchas restantes).
2. Fijar las manchas de sangre impregnadas en las mantas, cubriéndolas con metanol hasta que se sequen.
3. Cortar 6 fragmentos de tela impregnada con sangre problema (A positivo) que medirán 3mm cuadrados (cuando la mancha problema no se encuentre sobre tela, absorberla con solución salina en pequeños trozos de tela de algodón), y colocar cada recorte en los tubos necesarios.
4. Colocar los tubos una misma columna de una gradilla.
5. En la forma antes descrita, preparar otra serie de tubos, en cuyo interior se deben colocar los fragmentos de tela manchados con sangre del grupo: B positivo, y así sucesivamente con los otros grupos sanguíneos.
6. Igualmente colocar otra serie de tubos que contenían fragmentos de tela con manchas de sangre O negativo, los cuales se colocarán en una columna asignada como control.

7. Acomodar y rotular las hileras con los tubos correspondientes, según como indica el diagrama siguiente: anti-A, anti-B, Rh, Rh T.A., Rh1, Rh2.

| Fila | 2 Gotas | M1 | M2 | M3 |
|-------------|----------------|-----------|-----------|-----------|
| A | Anti-A (1:10) | 0 | 0 | 0 |
| B | Anti-B (1:10) | 0 | 0 | 0 |
| Rh | Anti-D | 0 | 0 | 0 |
| Rh1 | Anti-D (1:5) | 0 | 0 | 0 |
| Rh2 | Anti-D (1:10) | 0 | 0 | 0 |

8. Agregar a cada tubo de la hilera anti-A, dos gotas de antisuero anti-A, a los de la hilera anti-B, dos gotas de antisuero anti-B, a la hilera Rh y Rh T.A., 1 gota de antisuero anti-D sin diluir, a la hilera Rh1, dos gotas de la dilución Rh1 y a la hilera Rh2, dos gotas de la dilución Rh2.
9. Dejar en refrigeración a 4°C las hileras marcadas (4°C), y en TA las hileras marcadas con TA por periodos de tiempo de 3, 6, 9 horas
10. Lavar con solución salina fría 6 veces o hasta obtener una solución clara e incolora. Las muestras que se incubarán a TA, deberán lavarse con solución salina a TA.
11. Añadir a cada tubo dos gotas de solución salina a temperatura ambiente.
12. Colocar la gradilla en el baño maría a 56°C durante 10 o 15 min.
13. Sacar cuidadosamente los trozos de tela con un aplicador de madera, diferente para cada tubo.
14. Agregar una gota de glóbulos rojos lavados al 2%.
 -Del grupo A a los tubos de la hilera A
 -Del grupo B a los tubos de la hilera B
 -Rh positivo a los de la hilera Rh.

15. Centrifugar durante 1 minuto a 3.400 revoluciones por minuto.

16. Por último observar si hay o no aglutinación.