



*Universidad de Oriente  
Facultad de Ciencias Naturales  
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial  
Santiago de Cuba*

*Tesis en opción al título académico de  
Master en Biotecnología  
"Mención Industrial"*

*Título: Caracterización del antígeno Rh D, en  
donantes de sangre de Santiago de Cuba*

*Autor : Lic. Ariel Matos Bayeau.*

*Tutores : Dr. C. Antonio Bencomo Hernández  
Dra. C. Clara Martínez Manríquez*

*Año 2005  
Año de la Alternativa Bolivariana para las Américas*

*Pensamiento*

..  
*“Para qué, sino para poner paz entre los hombres,  
han de ser los adelantos  
de las Ciencias “*

*José Martí*

*Pensamiento*

## *Agradecimiento*

---

*A Dr. C. Antonio Bencomo, por su acertada tutoría, apoyo material y oportunas sugerencias para el desempeño exitoso del trabajo.*

*A Dra.C.Clara Martínez, tutora de este trabajo, por sus horas de abnegada dedicación en la revisión del trabajo y su certera orientación para la corrección del mismo.*

*A mis queridas compañeras del Laboratorio de Hemotipología: Reyna Isaac, Mercedes Vega y Nancy Rivero; que conjuntamente con Yaima, Yohanis y Yudeisi, mostraron su apoyo, esfuerzo y dedicación al laboratorio, mientras estuve dedicado a la maestría.*

*A todos mis compañeros del Departamento de Laboratorio: Irene, Nayibe, Neris, Nilda, Elvia, Elvira, Yuleisy, Dora, Marlene, Rosabell, Gabriel, Luis y demás integrantes, por su interés y preocupación para que terminara la maestría.*

*A todos los miembros del Departamento. de Donaciones y especialmente a: Nara, Virgen, Marlene. Rosa, Asunción, Zulima, Ada Mirta, Suallen, Mileidis y Fono, por su colaboración en la extracción de las muestras.*

*A las compañeras de las secciones de Estadística, Admisión y Pizarra: Noralis, Yanet, Duraisy, Odalys, Judith, Maylen,, Mercedes y el resto del colectivo, por su apoyo en la localización de los donantes.*

*A las bibliotecarias del centro Inés, Yisell y Dania, por su apoyo y colaboración en el suministro oportuno de la bibliografía y a la informática Maroibis, por su valiosa colaboración..*

*A la Dra; Rasa Castellanos, por su apoyo, orientaciones y ayuda de inestimable valor y la Dra; Rosa Robinson por su consejos y orientaciones muy útiles.*

*A la Lic. Berta Cuevas, Dra; Odalys Garcia y Dra: Niurka Alí, por su apoyo y colaboración en el cumplimiento de la diferente etapa del trabajo*

*A los Lic. Carlos Suárez y Lic. Ana Maria Piñol, por su colaboración en el desempeño de este trabajo.*

## *Agradecimiento*

---

*A todos los demás trabajadores del Banco de Sangre que han colaborado con la ejecución de este trabajo.*

*Al colectivo de trabajadores del Laboratorio de Inmunohematología del Instituto de Hematología, que gentilmente ayudaron en el montaje de las técnicas de laboratorio.*

*Al Lic. Rene Rivero, por el suministro de valiosa literatura científica acerca del tema y para Anita, por su tenaz empeño de enviarme la búsqueda bibliográfica realizada sobre el tema,*

*A Lic. Esteban Gutiérrez, por su colaboración en la realización del trabajo.*

*A Maria y Adaris de la Dirección Provincial de Seguridad Social.*

*Al Dr. Israel Escalona y el Lic. Justo Herrera, por su incondicional apoyo y su incalculable ayuda durante la confección de este trabajo.*

*A mis amigos Alberto Pujals y Felipe Solis por su apoyo emocional y aliento.*

*A Guillermo y Migdalia, que me atendieron y acogieron en su casa durante las horas de trabajo en la computadora.*

*Al colectivo de profesores de la maestría por contribuir a mi superación Profesional.*

*A familiares y amigos que de una forma u otra han colaborado con el desarrollo de este trabajo.*

## *Agradecimiento*

---

El sistema de grupo sanguíneo Rh, es uno de los más polimórficos de los conocidos en humanos. El antígeno D, su principal componente puede presentar alteraciones en su expresión, originando fenotipo D débiles y parciales. En esta investigación se realiza una caracterización fenotípica del antígeno D, en 9 560 donantes de la provincia Santiago de Cuba. La determinación del fenotipo D débil se realizó mediante un estudio comparativo entre la técnica de Policationes con respecto a la prueba de Coombs indirecto. Se determinó la frecuencia de los fenotipos D débiles y D parciales. La caracterización de los fenotipos D parciales, se realizó mediante un panel de anticuerpos monoclonales. A partir de los D débiles seleccionados del total de donantes, se identificaron serológicamente los D parciales en: D II, D IVa, D VI tipo I, DVI tipo III, D VII y DFR, los que se relacionaron con su haplotipo Rh.

Blood group Rh, is one of the most polymorphics known in humans. Antigen D, its main component, can show alterations on its expression, bringing about weak D, and partials phenotype .On this investigation, a phenotype characterization of antigen D in 9560 blood donators from Santiago de Cuba, is carried out, weak D phenotype determination was done by means of a comparative study between the Policationes technique and the indirect Coombs. The frequency of weak D and partials D phenotypes was determined. The characterization of partial phenotypes was done by means of a panel of monoclonal antibodies. From the weak D selected from the total of the donators, the partials D were identified in D II, D IV a , D VI Type I , DVI type III , D VII and DFR, which were related with its haplotype Rh..

Los hematíes clasificados como D débiles poseen el antígeno D, pero expresado tan débilmente que no aglutinan directamente con los antisueros anti-D, porque poseen un número relativamente pequeño de sitios antigénicos (3)(5).

La tipificación de estos individuos en la búsqueda del antígeno D debe realizarse por un método de gran sensibilidad, bajo costo y que permita realizar de forma masiva el fenotipaje en la población de donantes de sangre (6).

La técnica de Coombs indirecto es la prueba universalmente utilizada para la determinación del D débil. En la misma se necesita de un período de incubación a 37°C, de los hematíes con el reactivo anti-D, varios lavados celulares, el uso del suero de Coombs y de un tiempo mínimo de una hora (2); sin embargo existen otras de mayor sensibilidad como son: automáticas (Autoanalizador)(7) y manuales (Técnica del Polibreno)(8).

Nuestro país posee limitaciones para la utilización de los métodos automáticos y el manual empleando el polibreno, debido a lo costoso que resulta la importación de los reactivos y equipos para su realización.

Con el empleo de la prueba policatiónica de baja fuerza iónica, basada en el uso de la protamina como agente agregante descrita por Rosenfield (1979) como técnica manual (9) y usada por Carbonell y col (1982), en el Autoanalizador, (para la detección en ambos casos de anticuerpos irregulares) (7), se logran resultados satisfactorios en la determinación del fenotipo D débil. Esta técnica, cuenta entre sus ventajas con un período de incubación de un minuto a temperatura ambiente, se efectúa un solo lavado celular, utiliza sulfato de protamina de producción nacional en vez de Suero de Coombs y su tiempo de duración es de 15 minutos (10).

La identificación de los D parciales se realiza por método serológico, con el empleo de un panel de anticuerpos monoclonales y por vía molecular, con la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP). De los diferentes tipos de RCP utilizadas para el diagnóstico molecular de los fenotipos D parciales, la técnica más exitosa ha resultado ser la "PCR múltiplex" (4).

Entre las principales aplicaciones de la " PCR múltiplex" esta el estudio de: los fluidos amnióticos para el diagnóstico prenatal., los receptores de transfusiones de sangre especialmente mujeres embarazadas y premenopáusicas, estudio de anemia hemolítica inmune por alo o auto anticuerpos, sí la serología establecida falla, investigación de los D débil o D parcial si la serología no es conclusiva para decidir la terapia transfusional o la profilaxis con Inmunoglobulina anti-D (11).

El conocimiento de los D débiles y D parciales tiene importancia por 3 razones principalmente: 1) Los portadores de la mayoría de los D parciales están propensos a inmunizaciones anti-D y tenerlos fenotipados seria una ventaja que ayudaría a evitar su exposición a Rh D Positivo; 2) Los alelos D débiles no se inmunizan con anti-D, por lo que deben ser transfundidos con sangre Rh D positiva, para evitar la práctica común del desperdicio de unidades Rh D negativa; 3) las mujeres con fenotipos parciales D VI no pueden recibir sangre Rh D positiva, ya que pueden ser inmunizadas y tener riesgo de enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido en futuros embarazos (12).

En Cuba, según lo establece la Recomendaciones para el Control de Calidad de los diagnosticadores del Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED) (13),, para realizar la evaluación de la especificidad de los antisueros policlonales, es necesario contar con varios fenotipos D débiles. Para los reactivos monoclonales se necesitan células que expresen las variantes antigénicas de los D parciales (D IV, DV y D VI).

En el 4to Simposio Internacional de Anticuerpos Monoclonales contra hematíes humanos (14), se planteó la necesidad de la creación de un panel celular internacional para la evaluación definitiva de los AcM, producida en los diferentes países, lo que sin dudas contribuirá a un gran avance en la identificación de los diferentes D parciales (13).

Teniendo en cuenta los aspectos planteados es imprescindible para los Bancos de Sangre poseer dentro de su panel, fenotipos D débiles y D parciales.

## **Problema**

El Banco de sangre de Santiago de Cuba, no posee dentro del panel celular, fenotipos D débiles y D parciales para la evaluación de la especificidad de los antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales, según lo establece las recomendaciones del CECMED, Sin embargo, el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), desarrolla en la actualidad un proyecto de investigación para la obtención de AcM anti-Rh D, adecuados para el escalado industrial y su formulación, donde la firma CIMAB SA, ya ha comenzado su distribución; y su elaboración a partir de sobrenadantes de cultivo de célula B transformada por el VEB importadas desde el extranjero.

## **Hipótesis**

Con la utilización de sueros policlonales anti-D en la técnica de Policaciones y un panel de AcM anti-D, de referencia internacional, es posible caracterizar fenotípicamente las variantes D, a partir de donantes de sangre de Santiago de Cuba; además de utilizarse como panel celular en el control de calidad de los AcM anti-D que se obtengan en el país.

## **Objetivo General**

Caracterizar las variantes fenotípicas del antígeno D (D débiles y D parciales) en donantes de sangre de Santiago de Cuba con el uso de antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales anti-D.

## **Objetivos Específicos**

1. Determinar la frecuencia del factor Rh D negativo y D positivo en los donantes de sangre pertenecientes a la provincia Santiago de Cuba, a través de la técnica de Hemoaglutinación.
2. Comparar la técnica de Policaciones con respecto a la técnica de Coombs para determinar los donantes D débiles.

3. Validar la técnica de policlones a través de los parámetros de control de calidad establecidos por la OMS.
4. Identificar las variantes fenotípicas de los donantes D parciales, por métodos serológicos, para calcular la frecuencia; así como el fenotipo Rh (C,c,E,e), que permita relacionarlo con su haplotipo Rh.

### **Novedad Científica del Trabajo**

Por primera vez se realiza la caracterización fenotípica de los D débiles y D parcial en la población de donantes de la provincia Santiago de Cuba.

## **1. Sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios**

### **1.1 Generalidades**

El descubrimiento por Landsteiner (1900), del sistema de grupo sanguíneos **ABO**, primero y posteriormente del sistema **Rh**, sirvieron de base a la aparición de otros sistemas y con ello al surgimiento de toda una nueva área de explotación científica, llamada Inmunohematología. En la actualidad ambos sistemas de grupos sanguíneos son los más importantes en este campo, permitiendo, por ejemplo que se logre una compatibilidad sanguínea adecuada entre donantes y receptores en procesos tan importantes como las transfusiones de sangre y los trasplantes de órganos y tejidos.

Landsteiner analizó muestras de sangre de colegas suyos y mezcló los sueros de cada uno de ellos con suspensiones de hematíes de otros, observando aglutinación, lo que permitió la clasificación de la sangre en diferentes grupos sanguíneos A, B y O. De Castello y Sturli (1902), descubrieron el grupo AB. Landsteiner reconoció que la presencia de dos antígenos A y B, solamente podía explicar que el suero de cada persona contenía anticuerpos contra el antígeno ausente en los hematíes de esas personas. Este primer sistema de grupo sanguíneo descubierto, el ABO, sigue siendo el más importante en la práctica de las transfusiones sanguíneas (2).

En la actualidad se ha logrado identificar más de 271 antígenos eritrocitarios agrupados en 27 sistemas de grupos sanguíneos, dentro de los que se destacan por su importancia los siguientes: **ABO, Rh, MNS, P, Lutheran, Kell, Kidd, Diego y Colton**. Cada sistema contiene uno o más especificidades codificadas por uno, dos o más genes homólogos. También hay colecciones denominadas Cost, Ii, ER y Globósido, que designan a antígenos relacionados, genética, bioquímica, o serológicamente, pero no se ha probado que forme parte de un sistema aceptado. Además, existen otros antígenos que aun no se han definido como perteneciente a un determinado sistema, siendo los antígenos de baja frecuencia (< 1%) y de alta frecuencia (> 90%) (16).

La importancia clínica de los diferentes sistemas de grupos sanguíneos eritrocitarios está

dada: porque estos están involucrados en la ocurrencia de reacciones transfusionales hemolíticas y en la enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido. Los Sistemas de grupos sanguíneos cuyos anticuerpos siempre se han identificados como causantes de reacciones postransfusionales hemolíticas y de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido son los sistemas: **ABO, Rh, Kell; Duffy, Kidd, Diego y Colton.**

Desde la aplicación en 1986 de la tecnología del ADN recombinante para el estudio de los grupos sanguíneos se ha podido conocer la estructura de muchos de los antígenos de los sistemas de grupos sanguíneos. Su importancia biológica esta basada en las evidencias acumuladas, de los productos de los genes de los grupos sanguíneos, los cuales podrán tener varias categorías funcionales como: **transportadores de membrana; receptores de ligando; molécula de adhesión; receptores de virus; bacterias y parásitos, con actividad de enzimas y como proteínas estructurales** (16) (17) (18).

El estudio del polimorfismo en los antígenos de los grupos sanguíneos, permitirá comprender la estructura y la función de otros componentes en los hematíes. Resultados que influirán en el conocimiento y la aplicación de nuevas estrategias de tratamiento en el campo de la Hematología y la Medicina Transfusional.

## **1.2 Sistema Rhesus (Rh)**

### **Descubrimiento**

En el siglo XVII comenzaron a describirse los primeros casos que hoy conocemos como incompatibilidad sanguínea. Se reportaron nacimientos de niños hidrópicos que morían a las pocas horas de nacidos, también de otros que nacían bien pero después presentaban íctero intenso y fallecían. Casos similares fueron descritos, hasta que Ballantyne (1882), los reunió en una entidad nosológica denominada *Hidropis fetal*. En la década del 30 del pasado siglo se unificaron todos estos síndromes y fueron llamados *Erythroblastosis fetal* (15) (19).

Levine y Stetson (1939), reportaron una reacción post-transfusional en una mujer después del parto de un niño hidrópico. La madre presentó una hemorragia post-parto y fue

transfundida con sangre de su esposo. Levine demostró que la paciente tenía un anticuerpo que aglutinaba las células del esposo. Postulando que se había inmunizado contra un antígeno fetal heredado del padre (5) (19).

Landsteiner y Wiener (1940), determinaron el antígeno responsable y realizaron experimentos donde reportaron que el suero procedente de conejos previamente inmunizados con células rojas de monos *Macacus rhesus* contenía un anticuerpo que aglutinaba el 85% de los hematíes de sujetos Caucasianos, estos sujetos fueron llamados rhesus positivos. El 15% restante presentaba células que no aglutinaban con este suero y a estas se les llamó rhesus negativos, aunque los anticuerpos obtenidos en conejos por inmunización con hematíes de monos *Rhesus* reconocen en realidad a antígenos de otro sistema de grupo sanguíneo denominado LW en honor a sus descubridores. En este mismo año, Wiener y Peters (1940), demuestran que después de algunas reacciones hemolíticas postransfusionales, el suero de los pacientes afectados evidencia un anticuerpo, cuya especificidad se revela idéntica a la del anticuerpo de conejo anti-Rhesus. El anticuerpo identificado por Levine en la mujer embarazada parece poseer igual especificidad, por lo que es denominado anti-Rhesus

Levine y Col (1941), explicaron que la eritroblastosis fetal es consecuencia de una incompatibilidad de grupo Rhesus entre la madre y el hijo. Wiener (1943), planteó que los antígenos Rh ó aglutinógenos son transportados por una proteína simple que contiene diferentes epítopes Rh a los que denominó “factores” (nomenclatura Rh-Hr). Fisher y Race (1948), desarrollaron la notación CDE/cde, sugiriendo que los antígenos estaban controlados por tres genes alélicos, unidos estrechamente y que codificaban para los antígenos D/d, C/c, E/e. Rosenfield (1962), presentó la terminología numérica; este sistema esencialmente describe la reacción de los hematíes con los antisueros; de esta forma el D es Rh1 y el anti-D se describe como anti-Rh1, de igual forma ocurre con los antígenos restantes (2) (5).

La base molecular de este sistema se elucidó después del aislamiento, purificación y caracterización de los polipéptidos que portan los antígenos Rh. En 1988 se publicó la

secuencia NH-terminal de los polipéptidos Rh como una secuencia aminoacídica (aa). El método de RCP, se utilizó para amplificar el fragmento de ADN que codifica la región NH-terminal. Así los productos purificados por RCP fueron utilizados para pesquisar el repertorio de ADN en la médula ósea humana.

En 1990, se publicó la primera secuencia completa del ADN (ADN *Rhc*) demostrando más tarde que es derivada del alelo cE. En 1992, otra secuencia completa del Adams), fue publicada, esta solo se encuentra en individuos D positivos y es derivada del polipéptido D (20)

## **2. Bases Moleculares del Sistema Rh**

### **2.1 Bioquímica del Sistema Rh**

Los polipéptidos Rh son proteínas altamente específicas que resisten la degradación proteolítica y no se encuentran en forma soluble en el organismo, sino que forman parte integral del esqueleto de la membrana.

El polipéptido Rh atraviesa la membrana eritrocitaria 12 veces, formando seis dominios extracelulares, poseen los extremos amino terminal y carboxilo terminal orientados hacia el citoplasma. Los 417 aminoácidos de los polipéptidos Rh sirven como transportador del antígeno Rh de grupo sanguíneo (21). Fig. 1(Anexo1).

El grupo sanguíneo Rh es el más polimorfo e inmunogénico de los grupos sanguíneos. Es un sistema de grupos sanguíneos altamente complejo con 52 antígenos y numerosos fenotipos. De todo ellos los más importantes son los antígenos (D, C, c, E, e) (20). Los dos genes del locus Rh están estrechamente unidos conteniendo cada uno 10 exones codificados. El gene RHD incluye el polipéptidos D y el gen RHCE codifica los polipéptidos C y c junto con los otros E y e (22).

La expresión de los antígenos del sistema Rh en la membrana eritrocitaria requiere la presencia de una glicoproteína asociada al gen RH, denominada *RHAG*. Las proteínas Rh, la glucoproteína *RHAG* y otras proteínas accesorias como LW, CD47, glicoforina B (GPB)

y la banda 3 se asocian en la membrana del glóbulo rojo formando el complejo Rh. El núcleo central de este complejo está compuesta por un tetrámero formado por dos moléculas de *RHAG* y dos monómeros *RHD* o *RHCE* estabilizado por asociaciones entre los dominios amino terminal y carboxilo terminal, las proteínas accesorias se unen a este tetrámero por uniones no covalentes. Fig. 1. (Anexo 1)

## **2.2 Glicoproteínas asociadas al gen *RH* (*RHAG*)**

Se localiza en el cromosoma 6, en la posición p21.1-p11, se le denomina también como: Rh50, glicoproteína Rh 50A, D<sub>50</sub>, proteína MB-2D10, R6A<sub>45</sub>, GP50, GP50A. Es uno de los dos sitios con potencial N-glican glicosilado. El N-glican porta los antígenos ABH y se puede predecir que la glicoproteína comparte el 39.2% y 38.5 % de secuencia aminoacídica idéntica con la proteína Rh D y Rh CE respectivamente (23) fig 1 (Anexo1).

## **2.3 Proteínas accesorias del sistema Rh**

### **Glicoproteína LW**

La glicoproteína LW designada como ICAM-4 es una sola proteína de membrana, con homología a la molécula de adhesión intercelular (ICAMs), las cuales son ligandos para la  $\beta$ 2-integrina. Esta proteína LW es un ligando de la integrina LFA-1( $\alpha$  L $\beta$ 2, CD11a / CD18). En los individuos con fenotipo LW(a-b-) y Rh nulo, la glicoproteína LW está ausente; sin embargo, la expresión de los antígenos Rh es normal en los eritrocitos LW (a-b-). Los antígenos LW son más abundantes en los hematíes D positivos, que en los D negativos de los adultos, a diferencia de los fetos y recién nacidos donde se expresa bien en los eritrocitos D positivos y D negativos y aún más fuertemente que en los hematíes del adulto

### **Proteínas asociadas a la $\beta$ -3Integrina**

Nombrada también como CD47, glicoproteína BRIC 125, Ag OAB e ID8. Existen dos isoformas de la proteína asociada a integrina (PAI), están presentes en la membrana de los hematíes, donde se infiere que esta pueda pasar alrededor de 5 veces a través de la membrana y la misma cuenta con 6 secuencias motivo con potencial N-glicano. Las PAI aparecen en diferentes isoformas en varios tejidos, donde se enlazan a las  $\beta$ -3 integrinas. Las isoformas de los eritrocitos no se enlazan con las integrinas, pero si con las trombospondinas. Mientras que la cantidad de PAI esta reducida en la membrana de los eritrocitos de los Rh nulos y de las personas D- - ; sin embargo tienen niveles normales en las líneas linfoblastoides de esas mismas personas (23).

### **Glicoforina B (GPB)**

Esta proteína se conoce también como: sialoglicoproteína Ss (SGP),  $\delta$ -SPG, PAS-3. Es una glicoproteína de membrana tipo 1, que tiene varias secuencias O-glicano y no N-glicano. El complejo Rh parece que contribuye, pero no es esencial en la inserción correcta del GPB a la membrana de los eritrocitos. En los hematíes S-s-U- que pierden la GPB, las proteínas Rh se manifiestan aparentemente normal, pero la RHAG tienen incrementada la glicosilación, lo que sugiere que exista una migración lenta a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Para la expresión total de los antígenos U y en menor medida los antígenos S, s, se requiere una interacción entre del GPB y el RHAG. Adicionalmente, se conoce de la habilidad de la GPB para formar heterodimeros con la glicoforina A (GPA), ya que puede unir al complejo Rh con el complejo banda 3/ GPA, formando una gran unidad en la membrana de los hematíes.

### **Glicoproteína Duffy (Fy)**

La posible asociación entre la glicoproteína Duffy o DARC y al complejo Rh se manifiesta a través del antígeno Fy 5, el cual esta ausente en los hematíes Fy(a-b-) y en los eritrocitos Rh nulo. Sin embargo, los eritrocitos Rh nulo, poseen los antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Fy3 y Fy6; así como los eritrocitos Fy (a- b-), que expresan los antígenos Rh de forma normal. Se desconoce la especificidad requerida para la expresión de los antígenos Fy5 (23).

### **Banda 3**

Es una proteína glicosilada que pasa a través de la membrana de 12-14 veces y es el mayor transportador de aniones, también nombrada AE1, intercambio aniónico, soluto portador de la familia 4, miembro intercambiador aniónico 1. El complejo Rh esta asociado con la banda 3 en los eritrocitos sanos. Esta forma el núcleo de un macrocomplejo de proteína de membrana integral y periférica de los hematíes. La presencia de esas proteínas en un único macrocomplejo estructural hace probable que ellos tengan vínculos en el rol regulatorio y funcional. Se cree que este macrocomplejo puede funcionar como una unidad intercambiadora de gases CO<sub>2</sub> / O<sub>2</sub> integrada en los eritrocitos (23) (24).

### **2.4 Funciones de las glicoproteínas y las proteínas accesorias**

En los sistemas de expresión heterólogos, la glicoproteína y su ortólogo renal, funcionan como transportadores de amonio. Está generalmente aceptado que la membrana lipídica es permeable al NH<sub>3</sub> (amoníaco), que penetra por difusión y la glicoproteína facilita el movimiento del complejo CH<sub>3</sub> NH<sub>2</sub> / NH<sub>3</sub> a través de la membrana de los eritrocitos y representa un ejemplo potencial de un canal de gas en las células de mamíferos. En los eritrocitos esta glicoproteína puede transportar NH<sub>3</sub> para desintoxicar los órganos tales como: hígado y los riñones, que junto con los tejidos no eritroides ortólogos puede contribuir a la regulación del balance ácido-base sistémico (24).

La reducción en la expresión de la proteína integral de membrana CD47 en los eritrocitos humanos deficientes en la proteína 4.2, sugiere que esta proteína puede mediar el lincaje del CD47 al esqueleto de la membrana. En las células normales el fenotipo Rh influye en la expresión del CD47, pero no al mismo nivel del esqueleto de la membrana adjunto al CD47. Estos estudios indican que la proteína 4.2 influye fuertemente en los niveles del CD47, y puede llegar su alcance al esqueleto de la membrana anexo al eritrocito, mientras que la proteína 4.2, afecta potencialmente al esqueleto de la membrana, no así a las glicoproteínas adjuntas al Rh y la banda 3, donde tiene menor alcance (25).

## **3. Bases Moleculares de los Genes RH**

### **3.1 Genes del locus RH**

Fisher y Race (1943), propusieron que el sistema Rh estaba compuesto por tres genes, cada uno con dos alelos., donde los productos de esos genes serían D/d, C/c y E/e, estrechamente ligados en cada cromosoma formando los haplotipos positivos (DCe, Dce, DCE y DcE, ) y negativos (dce, dcE, dCe y dCE), siendo transmitido de una generación a otra como una unidad o complejo génico. Wiener (1951) propone que la herencia del sistema Rh podría depender de un solo gen con múltiples alelos, de manera que cada gen produciría un antígeno sobre el cual podría identificarse varios factores, capaces de reaccionar con los anticuerpos específicos (19)

Colin (1991), basado en los resultados obtenidos con enzimas de restricción en el DNA *Rhc* por Southern blot, demostró que el locus del sistema Rh estaba codificado por *dos* genes diferentes. El gen *RHCE* codifica los polipéptidos CcEe y el gen *RHD* codifica al polipéptido D.

Los genes *RHD* y *CE* están localizados en la posición cromosomal 1p 34.1-36. 1 (cromosoma 1 brazo corto, región 3, banda 4, subbanda 1, que atraviesa la banda 6), con menos de 450 000 pares de base ( pb ) de distancia. (4). Entre ambos genes existe un 90% de homología en las secuencias nucleotídicas codificantes que nos indica que surgieron de la duplicación de un gen ancestral común. Los intrones 2, 3 y 4 del gen *RHD* presentan deleciones de 109 pb, 288 pb y 651 pb, respectivamente. La región 3<sup>1</sup>, no codificante del gen *RHD* ocupa más de 1 500 pb y es mucho menor que el gen *RHCE* (20).

Los polipéptidos Rh D y Rh CE difieren solamente en 35 sustituciones de aa. Es notable que 2/3 de estos cambios (23 ó 24 de 35 ) se codifican en 3 exones, denominados exones 4, 5 y 7 de los 2 genes, sugiriendo la existencia de una gran diferencia estructural entre las especificidades D, C, c y E, e.

La base genética para el polimorfismo asociado a los antígenos C,c,E,e, se estableció por análisis del *Rhc* transcrito. El gen *CE* posee cuatro formas alélica más comunes: *RH Ce*,

*RHce*, *RHcE* y *RHCE*, las cuales determinan la expresión combinada de los antígenos Ce, ce, cE, CE, en la proteína Rh C,c,E,e (20)

Existe un espacio intergénico entre los genes *RHD* y *RHCE* ocupado por el gen *SMP1* y una caja Rhesus (26). fig 2 .(Anexo 1).

### **GEN *SMP1***

Es un tercer gen independiente, entre ambos genes *RHCE* y *RHD*. La región 3' no codificante del *SMP1* y el (ADN<sub>c</sub>) solapado del *RHCE*, posiblemente interfieran en la transcripción de ambos genes, si se intenta esta en cualquier tipo de célula. La proteína *SMP1* es un miembro putativo de una proteína pequeña de membrana de 18 kilodalton (Kd). El gen *SMP1* puede ejercer presión selectiva al locus RH, lo cual puede tener una racional implicación en el análisis del polimorfismo potencial del *SMP1*. Fig 2 (Anexo 1).

### **Caja Rhesus**

Son las secuencias de ADN sumamente homóloga (98.6 %), que flanquean al gen *RHD* y contienen "regiones idénticas de 1 463 pb, completamente similares. Posee un largo aproximadamente de 9 000 pb y la delección del gen *RHD* (26). Fig 2 (.Anexo 1).

### **3.2 Evolución de los genes de la familia Rh**

El análisis fenotipos de la raíz hematopoyética y de la célula progenitora ha sido una herramienta de inestimable valor en la definición de la biología de la población celular ancestral. Los antígenos Rhc aparecen antes que los antígenos Rh D. Esto sugiere que puede ocurrir una reorganización en el desarrollo de la membrana celular eritrocitaria que involucran los polipéptidos Rh y otros componentes incluyendo GPA y la banda 3 (23) .

Antes de la evolución del C y E, los haplotipos Rh, se separaron en 3 grandes ramas: el grupo de los D débiles tipo-4; el grupo de D IVa y la principal rama, cuya características distinta del alelo normal *RHD*, prevalecen hasta hoy. Dentro de la rama principal, surgen los haplotipo DCe, del haplotipo Dc (W16C)e por conversión de genes, (donde es

sustituido el exon 2 del *RHCE* por el exon 2 del *RHD*); el **Dce** y el **DcE** ( por mutación puntual secuencial ). El haplotipo **dce**, procede del **Dce**, por una delección del gene *RHD*. Fig. 3 (Anexos 1).

La mayoría de los alelos D débiles y D parciales se originaron partir de los haplotipos **CDe** (D débil tipo1, DVI tipo I, DNB, etc.) y **DcE** (D débil tipo 2, D VI tipo 1, DNU, etc.), por mutación puntual y conversión única de genes que permanecen usualmente restringidas a un haplotipos parenterales específicos. Los haplotipos **DCE**, **dCe** y **dcE** son producto de una recombinación genética (26). Fig. 3 (Anexos 1).

Anteriormente se pensaba que las proteínas Rh estaban confinadas a los vertebrados superiores (gorila, chimpancé, gibón, orangután, etc.), sin embargo, el descubrimiento de una secuencia relacionada con la glicoproteína, homóloga en invertebrados sugirió lo contrario. Esa secuencia representada por *dos* genes diferentes *RHAG*-like, ha sido encontrada en *Caenorhabditis elegans* (nematodo) y *Georgia cydonium* (esponja marina). También se ha localizado la proteína Rh 1(antígeno D) altamente expresada en cultivos de las algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* (27)

#### **4. Antígenos del sistema Rh**

El grupo sanguíneo Rh es el más polimorfo de los grupos sanguíneos. Es altamente complejo con 52 antígenos y numerosos fenotipos. (23). Los *dos* genes del locus Rh están estrechamente unidos conteniendo cada uno 10 exones codificados. El gen *RHD* incluye el polipéptidos D y el gen *RHCE* codifica los polipéptidos C y c junto con los otros E y e (21)(22).

Este se expresa como una colección de 37 epítopes diferentes. Los dominios externos de la proteína Rh se involucran en la presentación de epítopes, lo cual está basado en el análisis de las estructuras proteicas de las variantes Rh D, inferidas de su secuencia *ADNc* y de la expresión de epítopes D. La expresión de los epítopes D, consiste en *seis* agrupaciones de epítopes diferentes localizados en la región externa de la proteína RhD muchos involucran regiones solapadas dentro de los dominios externos 3, 4 y 6 (28).

Debido al gran polimorfismo del sistema Rh, este se involucra en fenómenos de aloinmunización por transfusión o embarazo, es importante tener en cuenta que de todos los antígenos de este sistema, el de mayor inmunogenicidad es el antígeno D, es capaz aproximadamente en 80 % de los receptores D negativos de desarrollar anticuerpos anti-D cuando se les inyecta a los individuos (5).

El antígeno D es un potente inmunógeno, a diferencia del resto de los demás antígenos C, c, E y e; es por eso que desde el punto de vista práctico, solo este es determinado en las pruebas de rutina.

#### **4.1 Caracterización de los fenotipos del antígenos D del sistema Rh**

##### **Fenotipo D positivo**

El antígeno D del sistema Rh (ISBT 004.001; RH1 CD 240D; Rhesus D), es el más importante de los antígenos de grupo sanguíneo determinado por una proteína, de ahí que su presencia o ausencia determine el fenotipo de los individuos en el sistema Rh. En individuos caucasoides la ausencia del gen completo RhD se identifica como el fenotipo D negativo (Rh negativo), mientras que la presencia del mismo indica el fenotipo D positivo (Rh positivo) (22).

##### **Fenotipos D negativos**

En los blancos, la mayoría de los haplotipos D negativos aparecen debido a una delección de los genes *RHD*. Esta delección abarca la totalidad de los genes, ya que el rango de secuencia específica *RHD* desde el exon 1 hasta la región 3<sup>1</sup> no codificada esta ausente (29).

Los individuos con fenotipo D negativos son fácilmente inmunizados con el anti-D. Este tiene gran importancia clínica porque los anticuerpos anti-D son capaces de causar severas afectaciones durante los episodios de la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido (EHRN) y la transfusión sanguínea (30) (31).

A nivel molecular, en raras excepciones, en los D negativos se han detectado algunos de los exones *RHD* presentes. En casi todas esas excepciones las aberraciones Rh le permiten a un haplotipo producir antígeno C. Los ejemplos encontrados en caucasoide muestran el gen *RHD* con una mutación sin sentido, una delección nucleotídica o una fusión genética *RHD-CE-D*, que contiene los exones 1 y 10, con los exones -3 RH -D y los exones 9 y 10 con los residuos de los exones derivados del *RHCE*

En algunos individuos no caucásicos de fenotipo D negativo se han encontrado genes híbridos *RHD*, en los cuales los exones 4, 5, 6, 7 y 8 están reemplazados por exones del gen *RHCE*. En los africanos aparecen *dos* alelos que son frecuentes, el alelo híbrido *RHD-CE-D* (*Cde<sup>s</sup>*) y el “*pseudogen*”, *RHD* (43). En el 70% de estas personas se encuentra el gen *RHD* intacto, pero no es funcional y da origen a un gen silencioso *RHD $\Psi$*  (*pseudogen RHD*), que posee 37 pares de base insertado en el intron 4, que puede introducir un codon de terminación en la posición 210 (25). Además se ha localizado en esta misma población una fusión génica *RHD-CE-D*, en la cual el 3<sup>1</sup> final del exon 3 más los exones del 4-8, son derivados del *RHCE* y están asociados con los fenotipos VS + V- (32)

### **Fenotipos D débiles.**

Stratton (1946), describió la existencia de hematíes que reaccionaban más débilmente con los antisueros anti-Rh (D) que las células D normales y les llamó hematíes D<sup>U</sup> y surgieron los términos alto grado y bajo grado, para la clasificación serológica de los fenotipos D<sup>U</sup>. Argal y col (1953), describieron el primer ejemplo inequívoco de una aloinmunización anti-D en un individuo D positivo, y a partir de este momento, se reconoció que los hematíes de ciertas personas pueden carecer de porciones del mosaico D, y así, estos individuos podrían resultar inmunizados contra epítopes del antígeno D que ellos no poseen. Las células D<sup>U</sup> podrían tener todos los epítopes del antígeno D normal, pero en una densidad más baja denominándose **D débil** o podrían ser tanto cualitativa como cuantitativamente diferentes del D normal, y de ser así, se designan como D parcial.

El fenotipo D débil es definido como un fenotipo que desde el punto de vista cuantitativo pero no cualitativo tiene una menor expresión del antígeno D. Análisis moleculares de los

genes que codifican al fenotipo del antígeno D débil muestran una secuencia normal, pero una reducción severa en la expresión del RNA<sub>m</sub> del gen RhD; sugiriendo la ocurrencia de un defecto a nivel de la transcripción o procesamiento del pre-RNA<sub>m</sub>. (20)

El fenotipo D débil es causado por diferentes alelos *RHD* que codifican proteínas aberrantes, dando como resultado fenotipos serológicos distintos (33).

Los D débiles han mostrado a una mutación en su alelo *RHD* (35). En contraste con el D parcial, esta mutación aparece localizada en la parte intracelular o transmembranosa de la proteína RhD. Cada tipo de D débil definido molecularmente tiene un fenotipo diferente, con una densidad antigénica propia y menor que el antígeno D. Estudios realizados con AcM y antisueros policlonales anti-D, han permitido determinar el número de sitios presentes para el antígeno D en las células rojas. Los eritrocitos D positivos de fenotipo CcDee y ccDEE presentan alrededor de 10000 a 30000 sitios antigénicos D por células. Sin embargo el número de sitios antigénicos del D por célula en los eritrocitos de fenotipos D débiles es de 300 a 9000 (19) (20).

La secuencia aminoacídica de los D débiles está localizada en el segmento proteico transmembranoso e intracelular y están agrupados en 4 regiones de la proteína (posición aminoacídica de 2 a 13, alrededor de 149, 179 a 225 y 267 a 397) (35). Estos cambios de aminoácidos modifican la estructura secundaria y terciaria del polipéptido Rh D o alteran su integración a la membrana celular provocando una disminución en la expresión de los epítopes D (21).

A pesar que la diversidad genética en los D débiles es rara y solo 1 de 90 fenotipos D débiles son verdaderos (1.1%), se han identificado más de 20 tipos específicos de D débiles (D débil tipo1, D débiles tipo2, etc.), que tienen una variación genética en *siete* regiones del gen *RHD*. El caso extremo de los D débiles es el fenotipo D<sub>el</sub>, el cual posee el antígeno D tan débilmente expresado que puede ser solamente demostrado por métodos de adsorción y elusión. Existen alelos de esta variante que deben de ser distinguidos por métodos moleculares (34).

### **Fenotipo RhD<sub>el</sub>**

Es una variante rara del sistema Rh, que porta un gen notablemente intacto *RHD*. Varios estudios indican que los rasgos del D<sub>el</sub>, pueden ser generados por múltiples mecanismos moleculares (35).

En estudios realizados en la población de donantes de sangre taiwaneses, se encontró el alelo 1227A y el exon 9 del gen *RHD* en los personas con fenotipo D<sub>el</sub>. El alelo *RHD 1227A*, puede ser usado como un importante marcador genético de los D<sub>el</sub>. Este fenotipo puede designarse también como un tipo particular de D débil (35) (36).

Los estudios realizados con donantes de sangre japoneses D negativos se encontró que en los fenotipo D<sub>el</sub>, aparecían los exones 4,7 y 10 del gen *RHD* de alguna forma. (37). También aparece este fenotipo con una delección de 1013 pb entre el intron 8 y el 9, incluyendo el exon 9 del gen *RHD* (38).

### **Fenotipo D parcial**

La producción de anti-D en un paciente D positivo se publicó por vez primera por Argall y col (1953). Otros casos se reportaron por Unger y col (1959). Al antígeno D presente en estos individuos se le denominó “Variantes D” ó “D parcial”. Se postuló que los eritrocitos de estos individuos han perdido una parte del mosaico del antígeno D y el anticuerpo anti-D que producen es contra una parte del Ag D que no está presente en sus células. Inicialmente fueron clasificados estos individuos en *cuatro* categorías usando la notación de Wiener Rh<sup>A</sup>, Rh<sup>B</sup>, Rh<sup>C</sup> y Rh<sup>D</sup> ó Rh13, Rh14, Rh15 y Rh16. Luego se reemplazó por el sistema de *siete* categorías de Tippett y Sanger (1962), basadas en la reacción de los eritrocitos con el suero

Posteriormente Lomas y col, (citado en: Bencomo 2001) clasificaron de acuerdo a la reacción producida entre los anticuerpos monoclonales con los antígenos Rh en un mosaico con 9 epitopes (ep D1 hasta ep D 9) , definidos en *seis* 6 categorías del antígeno D parcial D<sup>II</sup> a D<sup>VII</sup> ( D<sup>I</sup> esta obsoleto). En el 3<sup>er</sup> Taller Internacional efectuado en Nantes

(1996) se publicaron los 37 epítopes identificados para el Ag D (14) (Anexo 4). Un epítope fue sensible a la proteólisis por papaína. Muchas variantes se identificaron relacionando la reactividad entre AcM y policlonales. En estos estudios se identificaron subdivisiones en el número de epítopes reportados en el Ag D, por ej: el ep D2, ep D 6/7 y la existencia de epítopes nuevos del Rh D. Recientemente los estudios moleculares efectuados han ayudado a identificar otras variantes del Ag D, y a esclarecer los mecanismos posibles que intervienen en las bases genéticas de estos D parciales (20).

Por más de 45 años es conocida una inmunización que ocurre infrecuentemente en D-positivos, tales individuos tienen baja densidad antigénica. Usualmente esos casos son identificados como D parcial (específicamente categoría DVI) (39)

El D parcial tiene alterada la proteína RhD que difiere suficientemente del D normal, por el anticuerpo que se produce en ellos o al no reaccionar con los AcM anti-D (35)

Actualmente se han descrito los mecanismos genéticos que causan los D parciales, ellos son: Conversión de genes, o sea cambio del gen *RHD* por *RHCE* (Ej. DIII b DIII c, DIVb, DVa, DVI, etc.) y la mutación puntual en el gen *RHD*, producto a una sustitución aminoacídica. (Ej. DII, D IVa, DVII, etc.) (25) (40). fig 2 (Anexos 1).

## **5. Determinación Serológica de los antígenos del sistema Rh**

Los antígenos del sistema Rh son detectados en el laboratorio por técnicas de hemoaglutinación que utilizan antiseros policlonales y anticuerpos monoclonales con alta sensibilidad y especificidad. La determinación del antígeno D se puede realizar de forma rutinaria por diferentes medios como son: láminas, tubos y microplacas (39).

La detección del D débil debe realizarse por un técnica que permita obtener resultados confiables, entre las principales utilizadas están la técnica de Coombs indirecto, enzimáticas y polibreno (2).

Para la identificación de los D parciales es necesario contar con un panel o batería de AcM anti-D de la clase IgM o IgG, que permita su fenotipaje con la aplicación de las técnicas

de Coombs, enzimática, etc. También se aplica el genotipaje, para analizar la presencia del gen *RHD* en el ADN genómico, obtenido de sangre periférica (4).

El hemoclasificador anti-D es uno de los diagnosticadores de grupo sanguíneo utilizados en la tipificación sanguínea en bancos de sangre y servicios de transfusiones (5). Los reactivos anti-D se obtienen también a partir de los individuos con fenotipos parciales D, que se han aloinmunizado con anti-D, o a través de los anticuerpos monoclonales y se emplean en la clasificación de los hematíes en el sistema Rh (D Débil y D parcial).

Pero en la preparación de los AcM contra el antígeno Rh (D), se han observado dificultades adicionales ya que son difíciles de obtener a partir de sistemas en roedores, por la poca inmunogenicidad de este antígeno en dichas especies. Sin embargo, se ha incursionado con éxito en la generación de AcM anti-Rh (D) ratón / humano (4).

### **5.1 Anticuerpos Monoclonales Anti-Rh D**

Los AcM anti-Rh D se producen por la fusión de línea de mieloma celular de ratón no secretora de anticuerpos con una población de linfocitos B humanos, productora de anticuerpos anti-Rh D (heterohibridoma), transformados con el VEB de donantes hiperinmune con anticuerpos anti-D.

El VEB conlleva a la inmortalización de las subpoblaciones celulares, las cuales están formadas por células pequeñas, de alta densidad, en reposo o alternativamente como células de gran clivaje, estas al decursar de algunos meses finalizan la producción del anti Rh(D). Por esta causa se han experimentado otras fusiones empleando los linfocitos B del bazo, ganglios linfáticos o sangre periférica con mieloma de ratón de la línea NSI o SPI. La fusión de linfocitos B de sangre periférica transformados por el VEB con el heterohibridoma compuesto de células de mieloma humano y la de ratón X 63-Ag 8. 6, de donde se obtienen líneas secretoras de AcM anti-Rh (D) de clase IgM o IgG (4)

A pesar de que la calidad de los primeros AcM humanos de la clase IgG, obtenidos a escala mundial no superaban a los antiseros policlonales, por la inestabilidad en la

detección de los fenotipos D débiles y las variantes D; la obtención de los AcM de clones MAD-2 y FOM- 1, provocaron un cambio radical en la serología del sistema Rh.

A finales de la década de los 80s se han desarrollado una gran cantidad de AcM humanos tanto de la clase IgG como IgM, con altos títulos de anticuerpos, utilizados en la clasificación rutinaria de sistema Rh. Una alternativa basada en la ingeniería genética, para la obtención de los AcM anti-D, en sustitución de los que se obtienen a partir de los donantes sensibilizados, son los fragmentos de anticuerpos producidos en microorganismos a partir de bibliotecas de fagos, con aplicación en la Inmunohematología (4).

Los anticuerpos monoclonales tienen como ventajas que se mantiene por un periodo indefinido de tiempo exactamente con la misma especificidad, las líneas celulares pueden ser mantenidas congeladas ya que si ocurre una mutación en la línea en crecimiento, se puede utilizar el clon de células originales almacenado, no se contamina con otros medios, se obtienen a gran escala y por su efectividad reemplazan a los reactivos policlonales (5)

Los aportes de la Biología Molecular al entendimiento de la complejidad antigénica del sistema Rh. (el conocimiento de la secuencia nucleotídica del gen *RHD*), han permitido la rápida aparición de métodos para determinar el genotipo Rh (D). Todos ellos basados en la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (41).

## **6. Genotipificación del sistema Rh**

### **VI.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Actualmente la Biología Molecular ha permitido el desarrollo de técnicas que tienen un amplio alcance como instrumento analítico. Especialmente, existen un gran número de procedimientos que tienen como base la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP): método de amplificación enzimático de una secuencia específica de ADN, restringida por cebadores, que permiten reproducir el ADN *in vitro*. Esta técnica inventada por Kari Mullis (1985), es un instrumento analítico y de diagnóstico con diferentes campos de aplicación tales como: la Biología Molecular, la industria de alimentos, las ciencias forenses, diagnóstico de enfermedades infecciosas y hereditarias, etc.

Este método se lleva a cabo “in vitro” para sintetizar enzimáticamente secuencias definidas de ADN, la reacción utiliza primer de oligonucleótidos (cebadores) que hibridizan las hebras opuestas y flanquean la secuencia de ADN molde (o templado) que va a ser amplificado. La elongación o alargamiento de los cebadores es catalizado por la Taq DNA polimerasa que es una enzima de ADN polimerasa termoestable aislada de la eubacteria termofílica *Thermus aquaticus* (42)

La aplicación de esta técnica en el genotipaje del sistema Rh, requiere de ligeras modificaciones, los procedimientos utilizados se basan en la amplificación de un fragmento de ADN común a los genes *RHD* y *RHCE*, que debe de estar presente en todos los individuos (control interno), y en la amplificación de un fragmento específico del gen *RHD* que sólo está presente en los individuos que portan el antígeno Rh (D) o parte de él (11).

Bennett y col. (41) describieron un protocolo basado en la amplificación de una secuencia del exón 7 común a los genes *RHD* y *RHCE* y en la amplificación de una secuencia específica de la región 3' no codificante del exón 10 del gen *RHD*. En los individuos Rh (D) positivo se obtienen dos productos de 136 pb y 186 pb, respectivamente, y en los Rh (D) negativo sólo se obtiene el producto de 136 pb. Posteriormente, Arce y col.(41) diseñaron un nuevo protocolo basado en la amplificación de un fragmento de ADN perteneciente al intrón 4 de ambos genes RH. Este método aprovecha la delección de 600 pb que el gen *RHD* presenta en la región amplificada para diferenciar a los individuos Rh (D) positivo de los Rh (D) negativo. En el primer caso se obtendrán dos productos de 600 pb y

1200 pb, mientras que en el segundo tan solo aparecerá la banda correspondiente al fragmento de 1200 pb del gen *RHCE*. (43)

Otros autores con el empleo de una combinación de tres métodos de amplificación del ADN, han obtenido resultados excelentes al determinar el genotipo Rh (D) fetal en líquido amniótico y en vellosidades coriales, con una correlación del 100% entre el genotipo fetal determinado en una muestra de líquido amniótico y/o vellosidades coriales y el fenotipo del recién nacido, efectuado en una muestra de sangre después del nacimiento (41).

En muchos de los estudios efectuados, se ha empleado una técnica de RCP muy sensible denominada RCP anidada que consiste en una doble amplificación de una secuencia de ADN del gen *RHD*, a fin de optimizar la cantidad de ADN obtenida a partir del escaso número de células fetales presentes en la sangre periférica materna. Mediante una RCP anidada en la que se amplifica un fragmento de 262 pb de la región no codificante perteneciente al extremo 3' del gen *RHD*, se determinó correctamente el genotipo Rh(D) fetal en 7 fetos de un total de 10 analizados. La sensibilidad del método fue estimada en un 70% y el valor predicativo del resultado positivo (aparece la banda específica del gen *RHD*), en un 100%. La imposibilidad de asegurar que el resultado, aparentemente negativo (no-amplificación del ADN), corresponde al feto, constituye la principal barrera para la aplicación clínica ordinaria del método.

Recientemente, Lo y col (41), publicaron un nuevo protocolo basado en la combinación de un método de extracción de ADN a partir del plasma materno, con el consiguieron una cantidad de ADN hasta *ocho* veces superior a la obtenida con la extracción convencional, y una RCP "en tiempo real" Este método incluye la utilización de cebadores fluorescentes que permiten cuantificar el producto amplificado y que alcanza un nivel de sensibilidad, tal que es posible la detección del gen *RHD* a partir de una sola célula fetal. Huang y col publicaron una variante de esta técnica en la que el análisis de los fragmentos de restricción polimórfica generados por el enzima *SphI* a lo largo de los exones del 4 al 7, de los genes *RHD* y *RHCE* permite definir la cigosidad del antígeno Rh (D), así como los dos haplotipos RH que conforman el genotipo Rh de cada individuo. (41)

Actualmente la aplicación de una técnica de " PCR múltiplex" que permite examinar diversos exones de ambos genes RH en un solo experimento, se ha convertido en la alternativa y, progresivamente, en la estrategia de elección para el examen del genotipo Rh. Esta revela las variantes D que no se ven por la serología del D, dirigidas a la amplificación de seis regiones (exones) específicos del ADN (3, 4, 5, 6,7 y 9). Tiene la característica de poseer gran velocidad de reacción o rapidez, gran exactitud de la técnica y se utilizan pequeños volúmenes de la muestra (11)

El estudio molecular de los D parciales ha permitido identificar las bases genéticas de estas variantes que se detallan en el Tabla G (Anexo I).

## **7. Aspectos clínicos relacionados con los fenotipos D**

El sistema Rh presenta un gran interés clínico en obstetricia y medicina transfusional, debido a la participación de sus alo anticuerpos en la destrucción inmune de los glóbulos rojos. Los antígenos de este sistema son sumamente inmunogénicos y juegan un papel central en la patogénesis de la enfermedad hemolítica prenatal, en algunas anemias autoinmunes y en reacciones hemolíticas transfusionales (39).

### **7.1 Fenotipos D y Transfusión de sangre**

Las transfusiones dentro del sistema Rh debe ser antígeno D compatibles o sea que los individuos tanto D positivos como los D negativos, deben recibir su propia sangre (3)

Las personas quienes tienen sus eritrocitos con un fenotipo D débil (variante cuantitativa) no desarrollan anti-D, mientras que las personas con fenotipo D de parcial (variante cualitativa con o sin debilitamiento de los hematíes), pueden hacer alo anti-D. Estas presentan un problema diferente dependiendo si es donante o paciente. Para los donante, la detección de los antígenos D débiles y D parciales podría eliminar la posibilidad de inmunización, debería tal sangre ser trasfundida a un paciente D negativo verdadero (23).

Para la estrategia de la transfusión algunos D parciales necesitan ser considerados, ya que estos portadores son frecuentemente fácilmente inmunizados con anti-D y si aparejado

reciben sangre D positiva en los casos de transfusión de la categoría DVI, que es el ejemplo clásico. En algunos países los métodos de tipificación son introducidos, que asumen la transfusión D negativo y profilaxis anti-D en las madres DVI para prevenir la inmunización anti-D (44).

En la práctica cotidiana, para la transfusión de receptores y mujeres embarazadas, el procedimiento sería su clasificación como D débil y algunos D parciales como D-negativo. Así, la sangre donada por tales personas debe ser rotulada como D-positivo (Rh positivo), pero algunos individuos deben ser considerados D negativos (variante D VI) como receptores y necesitan una transfusión de sangre de ese mismo Rh. Aunque una mujer embarazada con fenotipo parcial D VI puede hacer un aloanti-D, esto raramente puede causar problema a un feto D-positivo (23).

En la transfusión autóloga (en las cuales las personas actúan como donantes y receptores), la estrategia transfusional puede causar confusión porque los hematíes D parciales pueden ser tipados como D-positivo en el Banco de Sangre pero como D-negativo en el Hospital. (45)

## **7.2 Factor Rh y la Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido**

Los anticuerpos anti-Rh generalmente pertenecen a la clase IgG, son inmunes e incompletos, apareciendo como respuesta inmunitaria a la exposición de sangre incompatible, ya que por inmunización voluntaria, embarazo o transfusión, su temperatura óptima de reacción es a 37 C y son capaces de atravesar la barrera placentaria, provocando la EHRN (45)

La EHRN es causada por los anticuerpos maternos IgG que atraviesan la placenta uniéndose a los hematíes positivos del feto, así inicia su destrucción, y causa una anemia severa, previo al uso profiláctico de la inmunoglobulina Rh anti-D frecuentemente, la EHRN causa daño cerebral fetal debido al incremento de los niveles de bilirrubina (kernicterus). A pesar de lo extendido de la profilaxis de la inmunoglobulina Rh, un significativo número de mujeres todavía se convierten en aloinmizadas durante el

embarazo por una variedad de razones, Entre ellos se incluyen la no administración de la Rh inmunoglobulina Rh, aborto espontáneos, escape de eritrocitos fetales dentro de la circulación reciente materna en la embarazada y exposición a eritrocitos D-positivos maternos en el útero (efecto de la abuela)

Los fetos que son ABO incompatible con los anticuerpos maternos anti-A/B son menos probables a tener EHRN debido al anti-D, presumiblemente debido a la rápida eliminación de los hematíes ABO-incompatible por la natural ocurrencia de anti-A/B. También, porque el número de copias de los antígenos D por hematíes está más alto en los fetos con haplotipos R<sub>2</sub> (14 000-16 000), que en los haplotipos R<sub>1</sub> (9 000-14 600); aquellos fetos con haplotipos R<sub>2</sub> tienen anemia mas severa que sus homólogos R<sub>1</sub> (23).

La EHRN generalmente se asocia a la formación de anticuerpos contra antígenos eritrocitarios D del sistema Rh. Sin embargo, además de estos, existen otros antígenos C, c, E, e; capaces de producir reacciones hemolíticas graves en un recién nacido cuando una mujer que no tiene expresados algunos de estos antígenos en sus eritrocitos, es expuesta a ellos durante el embarazo) (43). El haplotipo -D-, es raro y significa que los eritrocitos sólo tienen expresado el antígeno D sin C, c, E, e. Ibarra (2001) reporta el caso de una recién nacido de este haplotipo con una EHRN, por la presencia de los anticuerpos anti-C, anti-c, anti-E, anti-e y anti-RH17 (45).

Para poder establecer un diagnóstico y un seguimiento oportuno de esta enfermedad, es necesario que a toda gestante Rh D negativo, se le investigue la presencia de anticuerpos anti-D durante el embarazo mediante la prueba de antiglobulina humana o Coombs Indirecto (45).

Los avances en la prevención de la inmunización por Rh, han logrado que actualmente solo un 1% de las mujeres Rh D negativas desarrollen anticuerpos anti-D durante el embarazo, debido a hemorragias feto maternas, pequeñas y silentes, especialmente en el último trimestre del embarazo.

La aplicación de una dosis de forma profiláctica de 300 µg de IgG anti-D o gammaglobulina anti-Rh, en un tiempo no mayor de 72 horas, después del parto, garantiza la eliminación de hasta 15 ml de sangre del feto; brinda una protección temporal a la madre. Actualmente la obtención de esta inmunoglobulina anti-Rh se realiza a partir del plasma de los donantes de sangre inmunizados con el antígeno D, los cuales garantizan la producción de esta vacuna (39).

## **II.1 Características de la Investigación**

En el período comprendido de enero a setiembre del 2004, se realizó el análisis prospectivo de las donaciones de sangre para la caracterización fenotípica del antígeno Rh (D) en donantes del Banco de Sangre Provincial "Renato Guitart Rosell", de Santiago de Cuba. Como universo de trabajo se escogió para su estudio 9 560 donaciones de las 27 439 efectuadas en el período evaluado, procedentes de los diferentes Centros de extracciones de la provincia Santiago de Cuba; lo que permitió hacer una caracterización del antígeno D, en los donantes de sangre de esta provincia, siguiendo una metodología de trabajo. Diagrama A (Anexo 2)

## **II.2 Diseño de la Investigación**

### **II.2.1. Registro de los datos**

Los datos personales de los donantes de sangre seleccionados (nombre, Sexo, Raza y dirección particular), fueron registrados en una base de datos, obtenida del programa BANBAY, creado en el Banco de Sangre de Bayamo. Esta información fue tomada de las historias clínicas de cada uno de los donantes y permitió evitar la duplicidad del grupo poblacional estudiado.

### **II.2.2. Selección de los donantes**

Los donantes de sangre con edades comprendida entre 18-65 años, sanos y que efectuaron su donación de sangre en algunos de los centros de extracciones de la provincia Santiago, en el periodo de enero a setiembre del 2004, fueron registrados una sola vez en la base de datos, aunque tuvieran varias donaciones en esta etapa. Esto fue tomado como criterio de inclusión en este estudio.

### **II.2.3. Extracción de las muestras**

A cada donante se le extrajo 10 ml de sangre periférica, la que fue alicuotada en 2 muestras de 5 ml cada una. A la primera muestra se le añadió 0.5 ml del anticoagulante CPDA-1 (ácido cítrico-fosfato-dextrosa-adenina) al tubo, para efectuar el factor Rh D,

D débil, el grupo sanguíneo ABO, fenotipo Rh y los D parciales. La segunda muestra fue añadida en un tubo sin anticoagulante el que se centrifugó a 400 gravedades (g) durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo se obtuvo el suero, en el sobrenadante, el que se conservó a 4°C hasta su uso para la determinación del grupo serico o inverso y el pesquisaje de anticuerpos antieritrocitarios.

#### **II.2.4. Determinación del factor Rh D**

La determinación del grupo sanguíneo Rh D, se efectuó con el propósito de conocer la presencia o ausencia del antígeno D del sistema Rh, en los hematíes de los donantes. Este proceso se realizó utilizando microplacas de 96 pocillos de fondo en U (greiner), donde se añadieron 25 µl del antiseros anti-D (producción nacional). Luego se adicionó el mismo volumen de la suspensión celular al 2% en solución salina fisiológica (SSF) 0.9% (Quimefa). Posteriormente se centrifugaron en una centrífuga Hitachi, durante 1min a 800 g. Después se dejaron reposar de forma inclinada 5 min., a continuación se colocaron en el visor mecánico de microplaca (producción nacional) y se procedió a efectuar la lectura, interpretando los resultados de la siguiente forma: (3)

- Reacción positiva (+): Presencia de aglutinados grandes o pequeños en cualquiera de los pocillos que contenga los antiseros policlonales
- Reacción negativa (0): Presencia de una suspensión uniforme de hematíes en el fondo de los pocillos.

Para el control positivo se añadieron 25 µl del antisuero policlonal anti-D y 25 µl de la suspensión celular al 2% en SSF 0.9%(Quimefa) de una célula O Rh positivo (registro # 7 del panel de células) y para el control negativo se tomaron 25 µl de la SSF 0.9% y 25 µl de la misma suspensión celular agregada en el control positivo.

Los resultados se expresan como Rh positivo o Rh negativo, según la reacción de la microplaca que se especifica a continuación:

- Si hay aglutinación en la microplaca es Rh positivo.
- Si no hay aglutinación en la<sub>29</sub> microplaca puede ser Rh

negativo siempre que se confirme en la prueba D débil.

## **II.2.5 Determinación del fenotipo D débil**

Todas las muestras que se clasificaron como Rh D negativo se les determinó el fenotipo D débil. Este se realizó de forma comparativa entre las técnicas de antiglobulina humana (método de LISS) (3) y la técnica Policlonal de baja fuerza iónica en tubo (10).

### **II.2.5.1 Prueba de la Antiglobulina indirecta o Coombs indirecto**

La prueba de Coombs Indirecto se fundamenta en la utilización del reactivo antiglobulina humana (AGH), que reacciona cuando las globulinas o anticuerpos están unidos a los hematíes y no reacciona cuando quedan libres. Esta técnica se ejecutó adicionando 1 gota del reactivo anti-D, en un tubo y 1 gota de la suspensión de los hematíes al 3% en solución LISS (Solución de Baja Fuerza Iónica). Diagrama B (Anexo 2). Luego se incubó 15 minutos a 37°C. Después de lavados 4 veces con solución LISS, por centrifugación a 400 g durante 3 minutos en centrífuga (Hitachi), se le añadió 2 gotas del Suero Coombs o antiglobulina humana (producción nacional). Seguidamente se centrifugó a 400 g durante 30 s y a continuación se procedió a realizar la lectura con la ayuda del aglutinoscopio (Adams). Para el desarrollo de esta técnica se utilizaron dos controles (positivo y negativo), preparados de la siguiente forma:

**positivo:** 1 gota del antisuero policlonal anti-D y 1 gota de la suspensión celular al 3% en LISS de una célula grupo O Rh positivo (registro # 7 del panel de células

**negativo:** 1 gota de la solución LISS y 1 gota de la suspensión celular al 2% en solución LISS de la célula con registro # 7 del panel de células del grupo O Rh positivo.

Los resultados se interpretaron de la siguiente forma:

- .Si no hay aglutinación en el tubo es Rh D negativo.
  
- Si hay aglutinación en el tubo es Rh D débil

### **II.2.5.2 Prueba Policationica de baja fuerza iónica o de Policaciones**

La técnica de Policaciones (10), se basa en la adición de un policación (protamina) a una suspensión de eritrocitos de solución de baja fuerza iónica (Dextrosa -EDTA) provoca la aglutinación inespecífica de los mismos, lo que favorece la unión de los anticuerpos a su antígeno específico. La adición posterior de un inhibidor del policación la Dextrosa-Citrato, revela la aglutinación verdadera por la unión Ag-Ac o la carencia del antígeno específico por la desaparición de la aglutinación.

El procedimiento efectuado consistió en añadir en un tubo rotulado 50  $\mu$ l del antisuero anti D (producción nacional) y 50  $\mu$ l de la suspensión celular al 5% en SSF 0.9%. Diagrama B.(Anexo 2) Más tarde se agregó 100  $\mu$ l de la solución de Dextrosa (imefa)-EDTA (Reachin), Diagrama B.(Anexo 2). Se incubó 1 minuto a temperatura ambiente, luego se adicionó 50  $\mu$ l de sulfato de Protamina (imefa) al 8% en SSF 0.9%. Se procedió a centrifugar a 400 g durante 30 s y después de decantado el sobrenadante totalmente, se añadió 50  $\mu$ l de la solución de Citrato-Dextrosa (imefa) Diagrama B.(Anexo 2); inmediatamente se efectuó la lectura en el aglutinoscopio (Adams) (10). Diagrama B (Anexo 2) Los controles se prepararon como sigue:

- **Control positivo**

- Se toma 50  $\mu$ l del reactivo anti-D y se le añade 50  $\mu$ l de la suspensión celular al 5% de hematíes # 7 del panel de grupo O Rh D positivo y se continúa como se describe en esta técnica.

- **Control negativo**

- A 50  $\mu$ l de solución salina fisiológica 0.9%, se le adiciona 50  $\mu$ l de la suspensión celular al 5% de hematíes # 7 del panel de grupo O Rh D positivo y se sigue con el resto de los reactivos descritos anteriormente en esta técnica.

Los resultados se expresaron como Rh D positivo o Rh D débil, de la misma forma que en II.2.5.1.

Para lograr la evaluación del método de Policaciones como sustituto de la técnica de Coombs Indirecto, en la determinación de los fenotipos D débiles por las ventajas que posee respecto a su análoga; fue necesario diseñar diferentes ensayos de validación, basados en la Regulación 20/2000, del CECMED (47), los criterios de validación de técnicas analíticas de la OMS (47), la Guía de validación (48) y los protocolos de validación (49).

## **II.2.6 Ensayos de Validación de la técnica de Policaciones**

### **II.2.6 1 Evaluación de la Precisión Interlaboratorio del método**

Se llevo a cabo mediante la evaluación de los parámetros de Repetibilidad, Reproducibilidad y Precisión Interlaboratorio.

#### **II.2.6 1.2 Ensayo de Repetibilidad**

El ensayo de repetibilidad (47)(48)(49), se utiliza para medir la precisión entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones experimentales (un analista, un equipo, etc. ). Para la evaluación de la repetibilidad se realizaron *cinco* ensayos por un mismo analista, que utilizó la técnica Policacionica para procesar *tres* tipos de muestras de fenotipo conocido (D débil de baja densidad antigénica, D débil de alta densidad antigénica y un Rh D negativo), cada una con *dos* replicas. Los resultados se deben cuantifican de acuerdo a los patrones de aglutinación siguientes. Tabla B

**Tabla B. Patrones del grado de aglutinación.**

<b>Patrones</b>	<b>Interpretación</b>
4+	Aglutinación total en un solo cúmulo grande en fondo claro
3+	Dos o tres aglutinados grandes en un fondo claro.
2+	Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo claro.
1+	Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo claro.
±	Pequeños aglutinados no definidos.
0	Ausencia de aglutinación.

**II.2.6.1.3 Ensayo de<sub>32</sub>Reproducibilidad:**

En el ensayo de reproducibilidad, se valora la precisión entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones experimentales (diferentes analista, reactivos, etc.). Este ensayo se desarrolló por dos analistas durante *siete* días, que realizaron de manera independiente *siete* ensayos, utilizando la técnica de Policaciones para el análisis de dos tipos de células de fenotipo conocido (D débil de baja densidad antigénica y Rh D negativo), cada una con tres replicas. Los resultados se miden según el patrón de aglutinación Tabla B (II.2.6.1.2) (46)(48)(49).

#### **II.2.6.1.4 Ensayo de la Precisión Interlaboratorio**

Mediante este ensayo se logra comprobar la repetibilidad de los resultados bajo diferentes medios y condiciones experimentales. Para efectuar este ensayo fue necesario la distribución de las mismas muestras (Rh D negativo y D débiles), escogidos al azar, conjuntamente con la técnica, a los diferentes laboratorios; estas fueron procesadas por diferentes analistas de los Bancos de Sangre de Santiago de Cuba, Palma y Contramaestre, aplicando la técnica de Policaciones,(49).

#### **II.2.6.2 Ensayo de Exactitud**

El ensayo de exactitud (47)(48).(49), sirvió para apreciar la capacidad del método analítico para dar una respuesta, lo más cercana al verdadero valor. Este ensayo se realizó por medio de la comparación entre la técnica de Coombs indirecto ( método de LISS), como método de referencia y la técnica de Policaciones, se ejecutó teniendo en cuenta el número de muestras registradas como Rh D negativo y Rh D débil. (Ver epígrafe II.2.5)

#### **II.2.6.3 Ensayo de Especificidad**

La evaluación de la especificidad permite conocer la capacidad del método analítico de medir exacta y específicamente el analito sin interferencia de impurezas, productos de degradación o compuestos relacionados que puedan estar presentes en la muestras(47)(48)(49). Se llevó a cabo por un analista al enfrentar tres antisueros anti-D de diferentes títulos (256, 128 y 16) contra diferentes células con fenotipos específicos Rh D (CcD ee , ccDee ), fenotipos inespecíficos para este mismo antígeno (Ccdee , ccdee) y para los fenotipos ABO (A<sub>1</sub> , B , O ), por la técnica de Policaciones

El título de los reactivos anti-D se expresa como el inverso de la mayor dilución, hasta la que se observó reacción positiva

**II.2.6.4. Ensayo de Robustez**

Los ensayos de Robustez tienen como propósito saber la influencia de pequeños cambios en las condiciones analíticas sobre la fiabilidad del método analítico y localizar los factores que originan frustraciones menores y significativas(47)(48)(49);. Estos ensayos se ejecutaron por un analista en *ocho* ensayos, donde se utilizaron dos tipos de muestras (Rh Negativas y D débil), cada una con tres réplicas y mediante la técnica de Policaciones se efectuó el ensayo. Cada análisis es una combinación de 4 factores modificados indistintamente (cantidad de la suspensión celular, concentración de la suspensión celular, temperatura de incubación, tiempo de incubación.), como se muestra en la tabla C.

**Tabla C . Protocolo del ensayo de Robustez**

Ensayo	Volumen de la suspensión	Concentración de la suspensión	temperatura de incubación	tiempo de incubación
1(normal)	50µl	5%	Temp. Amb.	1min.
2	50µl	5%	37°C	1min.
3	50µl	10%	Temp. Amb.	5min.
4	50µl	10 %	37°C	5min.
5	100µl	5%	Temp. Amb.	5min.
6	100µl	5%	37°C	5min.
7	100µl	10%	Temp. Amb.	1min.
8	100µl	10%	37°C	1min.

I

**I.2.6.5 Criterio de aceptación de los ensayos**

Para el establecimiento de estos criterios de aceptación se tuvo en cuenta fundamentalmente, que la técnica de Policaciones al igual que la técnica de

Coombs, manifiestan resultados cualitativos que se evidencian a través de la reacción de aglutinación y en la clasificación del método empleado dentro de los métodos analíticos, que en este caso es de identificación y apoyados en la literatura (47)(48)(49).

- **Precisión:** En las ensayos de Repetibilidad, Reproducibilidad y Precisión interlaboratorio, las determinaciones realizadas por el mismo analista, entre los analistas y entre los laboratorios, no debe exceder de dos cruces (2+) de aglutinación de diferencia entre las replicas, en el caso de las células D débiles. Los negativos deben tener similar resultado para todos los casos.
- **Exactitud:** El % de coincidencia entre ambas técnicas no debe ser menor al 98%.
- **Especificidad:** Debe reaccionar con todos los fenotipos específicos y no reaccionar con los fenotipos inespecíficos RhD, para todo los tipos de anti-D.
- **Robustez:** Se tienen en cuenta los mismos criterios del ensayos de precisión donde no debe exceder de 2+ de aglutinación como diferencia entre las replicas de las células D débiles y los D negativos deben tener el mismo resultado en todos los ensayos.

## **II.2.7 Serología con Anticuerpos Monoclonales Anti-D**

### **II.2.7.1 Pesquisaje de las muestras con el AcM anti-D (RUM-1)**

Todas las muestras se enfrentaron al AcM anti-D (clon RUM- 1), de tipo IgM (reactivo de referencia internacional), en la técnica en salina por microplaca de 96 pocillos de fondo en U (greiner), seleccionando aquellas que cumplieron la condición especificada en la Tabla D, para su clasificación en D débil o D parcial. La ejecución de este

procedimiento de determinación del factor Rh D, se realizó con la sustitución del antisuero policlonal anti-D, por el anti-D RUM-1, según el epígrafe II.2.4.

#### **Tabla D. Requisitos para la selección de las muestras**

Muestra	Anti-D policlonal	Prueba D débil	anti-D RUM-1
1	—	+	+
2	+	—	0
3	0	+	0

Simbología + — reacción positiva  
 0 — reacción negativa  
 — — no se tiene en cuenta

**-II.2.7.2 Determinación de los fenotipos D débiles y D parciales con el empleo del Panel de AcM**

Las muestras que cumplieron las condiciones que se especifican en la Tabla D, fueron trasladadas al Instituto de Hematología e Inmunología de la Habana, donde se enfrentaron primeramente a una batería de 70 AcM de diferentes clones, que identifican diferentes epítopes del antígeno D, que conforman el panel de esta institución, obtenidos del 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> Taller Internacional de Anticuerpos Monoclonales contra hematíes humanos y antígenos relacionados de la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea; con la utilización de las técnicas de aglutinación en salina, Coombs indirecto y papaína.

**II.2.7.2.1 Determinación de los anticuerpos IgM en solución salina**

La técnica en salina (3), permite que los AcM, de la clase IgM reaccionen directamente con los hematíes en suspensión salina, sin necesidad de agregarle algún aditivo. Este ensayo se realizó en una placa de fondo en U, similar a la utilizada en las técnicas anteriores, donde se adicionó 30 µl del AcM anti-D y 30 µl de una suspensión de hematíes al 2% en Solución LISS- albúmina-Tween 20 (0.05%), diagrama B. (Anexo 2). Luego se incubó 15 minutos en incubadora (Sakura) a temperatura ambiente y se centrifugó a 400 g en centrífuga (Hitachi), durante 1 minuto. Posteriormente se

colocaron las placas inclinadas 5 minutos y se procedió a realizar la lectura en el visor de microplaca (producción nacional). Los resultados se interpretan de acuerdo al

patrón del epígrafe II.2.6.1.2. En esta técnica se prepararon controles positivos y negativos de la siguiente forma:

**Control positivo:** 30 µl del AcM anti-D y 30 µl de la suspensión celular al 3% en LISS de una célula grupo O Rh positivo (registro # 7 del panel de células) y control **Negativo:** 30 µl de la solución LISS y 30 µl de la suspensión celular al 3%, con registro # 7 del panel de células del grupo O Rh positivo.

### **II.2.7.2 .2 Técnica de Coombs para anticuerpos IgG**

La prueba de Coombs (3)(6), se realizó utilizando una microplaca de 96 pocillo, de fondo en V, donde se depositó 30 µl del AcM y 30 µl de una suspensión de hematíes en Solucion LISS- albúmina -Tween 20, diagrama B (Anexo 2), después de incubar la microplaca en incubadora (Sakura) 15 minutos a 37°C, se continuó con tres lavados con PBS-Tween 20 (0.05%), diagrama B (Anexo 2), a 900 g durante 40 segundo, luego se procedió a añadir 30 µl del reactivo suero Coombs–albúmina (Vol / Vol). Posteriormente se centrifugó a 900 g durante 10 s, a continuación se colocó de forma inclinada 5 minutos y finalmente se efectuó la lectura con el mismo visor de las técnicas anteriores. Los controles se realizaron de la misma forma que en el epígrafe anterior (II.2.7.2.1); al igual que la interpretación de los resultados se realizó según el acápite II.2.6.1.2.

### **II.2.7.2 .3 Técnica enzimática (papaína)**

La técnicas enzimáticas que emplean enzimas proteolíticas (papaína) (3) (6), las cuales modifican los antígenos eritrocitarios de manera que potencian la reactividad de algunos sistemas antígenos –anticuerpos (especialmente Rh y Kidd), traen que disminuya el potencial zeta; lo que facilita el proceso de aglutinación. Esta técnica enzimática se ejecutó en 2 fases procediendo de la siguiente forma.

En la primera fase se procedió a tratar todas las muestras seleccionadas con papaína, para lo cual se preparó una proporción de 1/ 4 ( 1 gota de célula por 4 gotas de papaína ), después de incubar 15 minutos en incubadora (Sakura ) a 37 °C, se

procedió a lavar 3 veces con SSF 0.9% a 400 g durante 30 segundos. Se preparó una suspensión al 5 %, (añadiendo 0.5 ml de SSF 0.9%). Para realizar la segunda fase de la técnica se adicionaron 2 gotas de cada AcM en microplacas de fondo en U y 1 gota de la suspensión al 5 % de las células tratadas con enzima, luego se incubó 30 minutos a 37°C. Después de centrifugar a 400 g en centrífuga (Hitachi) durante 30 segundos, se procede colocar las microplacas de forma inclinada 5 minutos y seguidamente se ejecuta la lectura con el auxilio del mismo visor de microplaca, utilizado con anterioridad. Los controles de esta técnica y la interpretación de los resultados se realizaron de forma análoga a II.2.7.2.1 y II.2.6.1.2.respectivamente.

## **II.2.8 Determinación del grupo sanguíneo ABO**

La tipificación de los grupos sanguíneos dentro del sistema ABO, se realizó por las técnicas de grupo hemático y la técnica del grupo sérico o inverso (3), a todas las muestras clasificadas como D débiles y D parcial. Los resultados de ambos métodos deben coincidir para lograr la clasificación correcta de los grupos en: O, A, B, y AB

### **II.2.8.1 Técnica del grupo hemático en microplaca.**

La determinación del grupo hemático dentro del sistema ABO, se basa en la detección de los antígenos A y B, mediante la prueba de aglutinación directa con los reactivos anti-A, Anti-B y anti-AB. Para la realización de la técnica se procedió a añadir 25 µl de los antisueros anti-A, anti-B y Anti-AB en pocillo por separado de la microplacas de 96 pocillos en fondo en U (greiner). Luego se adicionó en cada pocillo el mismo volumen de la suspensión celular al 2% en solución salina fisiológica (SSF) 0.9% (Quimefa). Posteriormente se centrifugó 1 minutos a 800 g (Hitachi). Después se dejaron reposar de forma inclinada 5 minutos, a continuación se colocaron en el visor mecánico de microplaca (producción nacional) y se procedió a efectuar la lectura. Esta se realizó teniendo en cuenta la reacción en la microplaca que se especifica a continuación y según el patrón de aglutinación (Tabla E).

Reacción positiva (+): Presencia de aglutinados grandes o pequeños en cualquiera de los pocillos con antisueros.

- Reacción negativa (0): Presencia de una suspensión uniforme de hematíes en el fondo de los pocillos.

**Tabla E: Patrón de aglutinación de la técnica de grupo hemático**

muestra	Suero anti-A	Suero anti-B	Suero anti-AB	Grupo
1	+	0	+	A
2	0	+	+	B
3	+	+	+	AB
4	0	0	0	O

### II.2.8. 2 Técnica del grupo sérico o reverso en microplaca.

La técnica de grupo sérico (3), posee como objetivo la búsqueda de los anticuerpos o aglutininas de grupo sanguíneo anti-A y anti-B. Este procedimiento se ejecutó con la adición en pocillos por separados de microplacas de 96 pocillos de fondo en U (greiner), de 25 µl de los suero de los donantes para determinar las aglutininas. Después se agregó en cada pocillo el mismo volumen de la suspensión celular al 2% en SSF 0.9% (Quimefa) de los grupos A y B. Luego se centrifugaron 1 minutos a 800 g (Hitachi). Posteriormente las microplacas se colocaron de forma inclinada 5 minutos Finalmente se realizó la lectura de las muestras en el visor mecánico de microplaca (producción nacional), según la reacción en microplaca (II.2.4.1) y el patrón de aglutinación .de la Tabla F.

**Tabla F. Patrón de aglutinación de la técnica de grupo sérico**

muestra	hematíes A	hematíes B	Grupo
---------	------------	------------	-------

1	+	0	A
2		+	B
3	+	+	AB
4	0	0	O

### **II.2.9 Identificación de los D parciales**

Las muestras cuyos resultados sugieren un fenotipo D débil o D parcial, se enfrentan a un panel específico propuesto por la firma Diagast, donde se utilizan AcM que identifican los epítopes (3.1, 4.1, 5.1, 6.1 y 6.5). Tabla H (Anexo 2). Posteriormente con los resultados obtenidos y el auxilio del patrón de reacción de los epítopes del antígeno D con los diferentes AcM elaborados internacionalmente, Tabla I (Anexo 2) y tomado como referencia, se logró identificar serológicamente los tipos de D parciales

### **II.2.10 Determinación del fenotipo Rh C c E e**

A todas las muestras seleccionadas para el panel (posibles D débil o D parcial), se les determinó su fenotipo Rh (C, c, E y e) (3), en microplaca de 96 pocillos de fondo en U (greiner), con los antisueros policlonales anti-C, anti-c, anti-E, anti-e (Menarini).

La determinación de los fenotipos Rh, se efectuó según II.2.4, empleando volúmenes de 35 µl para los antisueros anti-C, anti-c, anti-E y anti-e, diluidos 1/40 en una solución de PBS-albúmina y una suspensión celular al 5% en PBS- bromelina, anexo B (Anexo 2)

Se prepararon los controles para cada tipo de antisuero utilizado, como se describe en el epígrafe II.2.7.2.1, realizando la sustitución respectiva del antisuero anti-D por cada uno de los reactivos empleados en esta técnica y de la suspensión celular. La interpretación de los resultados se realizó teniendo en cuenta la presencia o no de aglutinación en los pocillos como se expresa a continuación:

- Si no hay aglutinación en el pocillo el resultado es negativo (esta ausente el antígeno)

- Si hay aglutinación en el pocillo el resultado es positivo (esta presente el antígeno)

A partir de los fenotipos obtenidos, se determinó los posibles haplotipos presentes en los donantes D parciales. .

### **II.2.11 Pesquisaje de anticuerpos en el suero**

A partir del suero de los donantes se procedió a investigar la presencia de alo anticuerpos antieritrocitarios mediante las técnicas ya descritas de: Coombs Indirecto ( III.2.7.2 .2), y medio salino ( III.2.7.2 .3), así como de albúmina.(3)(6)(50) Se seleccionaron del panel celular del centro 2 células (con registro # 7 y # 47), que poseen la dotación antigénica de forma complementaria en los diferentes sistemas de grupos sanguíneo clínicamente significativo (Rh, Kell, Duffy, etc.)

#### **II.2.11.1 Técnica de albúmina**

La técnica de albúmina (3)(6)(51), se basa en el aumento en la constante dieléctrica del medio en el que están suspendidos los eritrocitos y una disminución de potencial zeta por la albúmina bovina Este método se llevo a efecto, utilizando las microplacas de fondo en U( greiner ), la que se le añadió 2 gotas del suero del donante y una gota de albúmina bovina al 30% (Roche), luego de incubó a 37°C en incubadora (Sakura) durante 30 minutos, seguidamente se centrifugó 400g en centrífuga (Hitachi) durante 30 segundo, después se colocaron de forma inclinada 5 minutos y se procedió a realizar la lectura con un visor de microplaca. Los controles y la interpretación de los resultados se realizaron como se expone en el epígrafe II.2.7.2.1 y II.26.1.2 respectivamente.

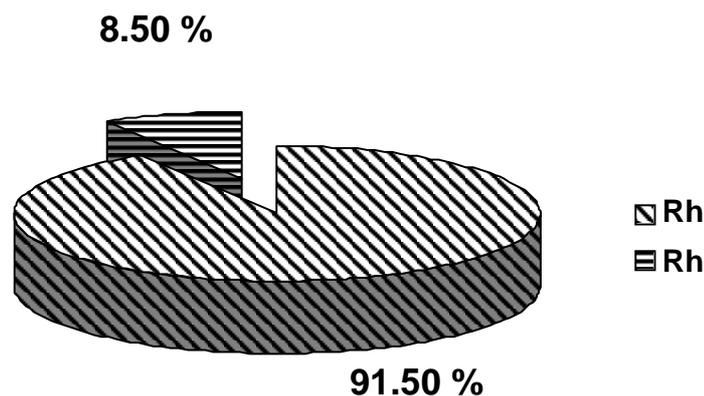
### **II.2.12 Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de esta investigación estuvo basado en el cálculo de la frecuencia de los diferentes fenotipos (D negativo, D positivo, D débiles y D parciales); las cuales fueron expresados en porcentos (%)

En el Banco de Sangre Provincial de Santiago de Cuba y en el Instituto de Hematología e Inmunología, se investigaron un total de 9560 donantes de sangre, en el periodo comprendido entre Enero –Septiembre /2004. A los casos se les realizó la determinación del factor Rh D, entre ellos los D débil, el pesquisaje de anticuerpos antieritrocitarios, la identificación de D parciales y el fenotipo Rh.

### **III.1 Factor Rh D**

Para muchos propósitos clínicos es suficiente dividir los individuos en dos categorías: Rh D negativo y Rh D positivo. Los resultados obtenidos en la frecuencia de los fenotipos Rh D positivo y Rh D negativos se exponen en el Grafico 1.



**Grafico 1 Frecuencia de los fenotipos Rh D positivo y Rh D negativo en donantes de sangre de Santiago de Cuba.**

Como se observa el mayor valor se registra para el fenotipo Rh D positivo. Estas cifras mantienen correspondencia con las obtenidas por González Corona (1980), quien estudió 68 265 donantes de la provincia Santiago de Cuba y obtuvo frecuencias de 91.45% para el Rh D positivo y 8.55% para el Rh D negativo (52); sin embargo difieren ligeramente de los datos reportados en otras regiones del país. En Baracoa, donde hubo un aumento en la frecuencia de los Rh D positivo y una disminución de los Rh D negativos, desde el estudio realizado por Del Castillo (1978), con valores de 92.30% (Rh D positivos) y 7.70% (Rh D

negativos) (53) al efectuado por Matos (2002), donde el Rh D positivo tuvo 94.44% y el Rh negativo 5.55%(54 ).Bencomo (1997), reporta un valor de 87%, para los Rh D positivo y 13%, para los Rh D negativos, en su caracterización de la población cubana (55). Este comportamiento de la frecuencia de los fenotipos Rh D positivos como negativos en Cuba esta aparejado a la variabilidad étnica existente en las diferentes regiones del país.

Los estudios de fenotipos D en poblaciones de la raza blanca; manifiestaron incremento de los Rh D negativos, lo que se evidencia en los valores de frecuencia reportados en Inglaterra de 17%y 15,64%; mientras que en New York, Estados Unidos, fue de 14.2%, en Levy , Francia de 15.92%. Sin embargo en las poblaciones de raza negra existe una disminución de este tipo de Rh, como los obtenidos en el Congo con 4.07% y en Nigeria de 5.3%(56). Berlinda (2000), en el estudio de la población negra de África de Sur, encontró una frecuencia de 3-7 % (57). Peng (2003), registró también valores de baja frecuencia para el Rh D negativo de 0.3-0.5%, pero en la población taiwanesa (58). Mollison (1997), planteó que la frecuencia de los fenotipos Rh D, varían ampliamente en diferentes partes del mundo y que esta depende de la herencia de los genes en las diferentes poblaciones (5).

### **III.2 Fenotipo D débil**

Fue posible la determinación de la expresión del antígeno D débil por diferentes técnicas En la Tabla 1, se expone los resultados de la determinación del D débil, de forma comparativa entre la técnica de Coombs Indirecto o de antiglobulina (método de referencia) y la técnica policatiónica de baja fuerza iónica, (método evaluado), utilizada por primera vez en este tipo de prueba. Como se observa todas las muestras Rh D negativas y D débiles, tipificadas por el método de Coombs, coincidieron en un 100%, también por la técnica Policationica.

De esta forma observamos que la técnica evaluada cumple con el criterio de aceptación establecido por lo que presenta buena exactitud. Aún cuando el volumen de muestra valorada comparativamente podría ser insuficiente para dar una evaluación completa de la calidad de la técnica utilizada para realizar este tipo de determinación. Es importante destacar que la misma posee ventajas técnicas con respecto al método de referencia como:

tiempo de incubación menor, el número de lavados celulares y tiempo de duración de la técnica. Su elección como método alternativo sería muy útil en la detección de este fenotipo D débil.

**Tabla 1. Resultados obtenidos en la comparación de la técnica de Policaciones y al técnica de Coombs.**

Método						
Tipo de Rh	Nº	Policaciones		Coombs		%
		D negativa	D débil	D negativa	D débil	
D negativo	808	808	0	808	0	100
D débil	51	0	51	0	51	100
Total	851	808	51	808	51	100

### III.3 Validación de la técnica de Policaciones

#### III.3.1 Ensayo de Repetibilidad de la técnica de Policaciones

Los cinco ensayos efectuados con *dos* replicas de la muestra D débil de baja densidad antigénica, D débil de alta densidad antigénica y D negativo, se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Resultados del ensayo de Repetibilidad**

Nº de Ensayos	Tipo de Rh					
	D débil( BDA)		D débil ( ADA)		D negativo	
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
1	1+	1+	3+	3+	neg	neg
2	1+	1+	3+	2+	neg	neg
3	1+	1+	3+	3+	neg	neg
4	1+	1+	3+	3+	neg	neg
5	1+	1+	3+	2+	neg	neg

Durante los *cinco* ensayos, se obtuvo el mismo resultado para las *dos* replicas de la muestra D débil de baja densidad antigénica y D negativo. Sin embargo, en el caso de la segunda replica de la muestra D débil de alta densidad hubo variación en los resultados del 2<sup>do</sup> y 5<sup>to</sup> ensayo. Este resultado puede ser atribuido a múltiples causas y según la literatura la más común es el error aleatorio, dado por el error visual o de medición del analista, que puede afectar específicamente la repetibilidad de los ensayos (59). La desviación ocurrida en esta segunda replica es de 1+ solamente, a pesar de que cumple con el criterio de aceptación fijado para este ensayo de una diferencia de 2+ (cruces). También posee analogía con los resultados obtenidos en la técnica de Coombs Tabla J (Anexo 3).

**, III.3.2 Ensayo de Reproducibilidad**

La Tabla 3 refiere los resultados obtenidos en los siete ensayos realizados por diferentes analistas sobre tres replicas de dos tipos de muestras (Rh D negativos y D débil de baja densidad antigénica). En este caso se aprecia que en todos los ensayos efectuados por los dos analistas para las muestras antes mencionadas los resultados coincidieron en las *tres* replicas analizadas.

**Tabla 3. Resultado del ensayo de Reproducibilidad en la técnica de Policationes.**

Ensayo	Día	Analista 1						Analista 2					
		Muestra E Rh D negativo			Muestra A D débil (BDA)			Muestra E Rh negativo			Muestra A D débil (BDA)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
2	2	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
3	3	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
4	4	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
5	5	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
6	6	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
7	7	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+

La ausencia de diferencias en los resultados alcanzados por los analistas en los ensayos realizados indica que esta cumple con el mismo criterio de aceptación declarado en el ensayo anterior; por lo que no existe influencia del tiempo (días, meses, etc.) y del analista en los resultados obtenidos por la técnica evaluada. Del análisis de esto se puede afirmar que la aplicación de esta nueva técnica no va a sufrir variabilidad máxima en sus resultados (49). Además, existe una correspondencia total entre estos resultados y los alcanzados en la prueba de antiglobulina indirecta. Tabla K (Anexo 3).

### **III.3.3 Ensayo sobre la Precisión Interlaboratorio mediante la técnica de Policaciones**

Se evaluó la precisión de los ensayos efectuados para determinar los fenotipos Rh D negativos y D débiles en los laboratorios de diferentes Bancos de Sangre de la provincia Santiago de Cuba, con la técnica de Policaciones; resultados que se exponen en la Tabla 4

**Tabla 4. Resultados de los ensayos para determinar la Precisión Interlaboratorio.**

Muestra	No de HC	BS Santiago	BS de Palma	Contramaestre
Negativa	7188	neg	neg	neg
	HP-647	neg	neg	neg
	149-panel	neg	neg	neg
	Z-2414	neg	neg	neg
	y-2212	neg	neg	neg
D débil	Y-2163	1+	1+	1+
	HP-577	1+	1+	1+
	7251	1+	1+	1+
	IIF-1292	1+	1+	1+
	Y-2241	1+	1+	1+

Los resultados obtenidos indican la total correspondencia entre las *cinco* replicas escogidas al azar de las muestras Rh D negativo y D débil, en los diferentes laboratorios. Todo esto revela que la técnica valorada no sufre modificaciones en sus resultados por el cambio en las condiciones laborales donde se realice, o sea que se mantiene el nivel de reproducibilidad de la técnica Policatiónica; lo que demuestra que puede ser ejecutada por otros técnicos de diferentes laboratorios. Esto refleja que la misma cumple con el criterio

de aceptación fijado en el epígrafe II. 2.5.6 (Materiales y Métodos), y al mismo tiempo mantiene similitud con los datos obtenidos por la prueba de Coombs indirecto. Tabla L (Anexo 3.)

Los *tres* experimentos efectuados anteriormente muestran que el método evaluado, posee una buena repetibilidad, reproducibilidad y precisión interlaboratorio; por lo que es un método preciso.

### III.3.4 Ensayo de Especificidad

En la Tabla 5, se muestra los resultados del ensayo de *tres* antisueros policlonales anti-D, de diferentes títulos, contra células de fenotipos Rh D específicos e inespecíficos.

**Tabla 5 Evaluación de la Especificidad o Selectividad del método de Policlones.**

Anti-D	Células de diferentes fenotipos													
	Fenotipos Rh D específicos				Fenotipos Rh D inespecíficos									
	CcDee		ccDee		ccdee		Ccdee		A <sub>1</sub>		B		O	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	4+	4+	4+	4+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	4+	4+	3+	3+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	4+	4+	2+	2+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Simbología: Anti-D      1 Título: 256; L- 045-18-1  
                                   Anti-D      2 Título: 128; L- 045-18-2  
                                   Anti-D      3 Título: 64; L- 045-18-3

Como se observa, en los fenotipos específicos para el antígeno D (CcDee y ccDee), ocurrió una reacción positiva y específicamente en el segundo fenotipo con diferentes grados de aglutinación. Sin embargo, las células de fenotipo Rh D inespecíficos como: D negativo (ccdee y Ccdee), tuvieron en todos los casos reacción negativa y las de fenotipo ABO, reaccionaron en ningunas de las replicas empleadas.

Los 2 fenotipos D positivos reaccionaron con los tres antisueros anti-D, sin embargo, en el caso del segundo fenotipo (ccDee), hubo una variación proporcional en el grado de

intensidad de la reacción de aglutinación, a medida que el título fue disminuyendo. Esta diferencias en la actividad entre los hematíes en presencia del reactivo anti-D, se le atribuye al efecto de dosis, que se manifiesta cuando una célula aparece con una dosis simple del antígeno D (heterocigótica) (3).

Los resultados negativos obtenidos en las células con fenotipo (A<sub>1</sub>, B y O), dentro del sistema ABO permiten afirmar que no existe reactividad cruzada o interferencia con otros antígenos de algún sistema de grupo sanguíneo presente en la membrana de sus hematíes.

Estos resultados demuestran que la técnica de Policaciones, identifica en este caso solamente los fenotipos específicos Rh D y no reacciona con los otros fenotipos inespecíficos para este antígeno D. De forma análoga a la técnica de Coombs indirecto Tabla M (Anexo 3), por lo que se ajusta al criterio de aceptación acordado.

### **III.3.5 Ensayo de Robustez de la técnica de Policaciones**

En la Tabla 6, se exponen los resultados de los ensayos realizados con las células de fenotipo D negativo y D débil, en la técnica de Policaciones, con algunas variaciones en las condiciones experimentales de cada ensayo.

**Tabla 6. Resultados del ensayo de Robustez**

Ensayo	Muestras					
	Rh D Negativo			D débil		
	Z-5745	102	9 (DCC)	202	10	3-21 (ECT)
1	neg	neg	neg	2+	2+	2+
2	neg	neg	neg	2+	2+	2+
3	neg	neg	neg	2+	2+	2+
4	neg	neg	neg	2+	2+	2+
5	neg	neg	neg	2+	2+	2+
6	neg	neg	neg	2+	2+	2+
7	neg	neg	neg	2+	2+	2+
8	neg	neg	neg	2+	2+	2+

Como se muestra, se obtuvieron resultados similares en todas las replicas del fenotipo D negativo. En el caso del fenotipo D débil se mantuvo el mismo grado de intensidad de la reacción de aglutinación en las *tres* replicas utilizadas durante los *ocho* ensayos efectuados.

Las variaciones realizadas al volumen y concentración de las suspensiones y a la temperatura y el tiempo de incubación, no conducen a cambios en la especificidad del método evaluado. Estos resultados nos indican que esta técnica mantiene buena robustez en el tiempo, similar a la técnica de Coombs. Tabla N (Anexo 3), a pesar de que este sometida a cambios en su condiciones experimentales cumple con el criterio de validación.

### III.3.6 Ensayo de terreno de la técnica de Policaciones

En la Tabla 7, aparecen los resultados de la aplicación de la técnica de Policaciones en diferentes municipios y provincias del país. Como se muestra, en todos los Bancos de Sangre, donde fue realizada la tipificación mediante la técnica de Policaciones hubo plena coincidencia entre esta y la de Coombs indirecta.

Estos resultados revelan que la técnica evaluada mantiene un desempeño adecuado en todo los laboratorios con la calidad requerida; lo que corrobora los resultados obtenidos en el control de calidad efectuado

**Tabla 7 .Ensayo de terreno de la técnica de Policaciones en diferentes Bancos de Sangre de la provincia Santiago de Cuba.**

Banco de Sangre	Número muestras	Técnica de Coombs		Técnica de Policaciones		%
		Rh negativo	Rh D débil	Rh negativo	Rh D débil	
Santiago	10 587	9828	759	9828	759	100
Palma	415	400	15	400	15	100
Contramaestre	292	283	9	283	9	100
Bayamo	592	560	32	560	32	100
Guantánamo	320	285	35	285	35	100
Tunas	283	270	13	270	13	100
Camaguey	196	185	11	185	11	100
Total	12685	11 811	876	11811	876	100

De acuerdo a los resultados observados en el comportamiento de la técnica de Policaciones con respecto a la técnica de Coombs indirecto, podemos afirmar que la misma cumple con todos los parámetros evaluados de precisión, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, especificidad y robustez, al existir una plena concordancia con la técnica de Coombs. Teniendo en cuenta las evidencias presentadas es posible definir que la técnica de Policaciones, reúne los requisitos establecidos para ser aceptada como una técnica alternativa para la determinación de los D débiles.

La aplicación de esta técnica proporcionaría una racionalización del tiempo, al procesar más cantidad de muestras en menos tiempo y una mejoría en el sistema de diagnóstico de los D débiles, al garantizar su determinación más rápida y de forma convincente

### **III.4. Frecuencias de D débiles y D parciales**

A todas las muestras analizadas en este estudio se le realizó el pesquisaje con el anti-D RUM-1 y de ellas fueron seleccionadas 51 muestras que cumplieron la condición establecidas en la Tabla D (acápite II.7.1 de Materiales y Métodos), las cuales se enfrentaron a un panel de anticuerpos monoclonales.

Con el uso del panel de anticuerpo monoclonales fue posible determinar la frecuencia de los fenotipos D débiles y D parciales (Tabla 8)

**Tabla 8. Frecuencia de los D débiles y D parciales**

Tipos de Rh	Cantidad n=9650	Frecuencia (%)
D débiles	37	0.39
D parciales	14	0.15

Como se muestra, la frecuencia de los D débiles fue mayor, como era de esperar que los D parciales. Los valores obtenidos para los D débiles son más bajo que los obtenidos por Martínez (1997) en donantes no blancos de Guanabacoa (La Habana), que encontró frecuencias de 0.43 % y 0.16 %, D débiles y D parciales respectivamente (55). Bencomo (2001), reportó una frecuencia de 0.94%, en donantes negros y 0.17%, en donantes blancos (60) Sin embargo dicha frecuencia está en el rango de valores reportados en la población de donantes de Europa que presenta una frecuencia de 0.23-0.5%, (incluyendo la región suroeste de Inglaterra que reporta un 0.4 % y Estados Unidos que registra un 0.3 % (55). A pesar de que estas poblaciones son de origen caucasoide con diferencias notables respecto a nuestra población, existe una correspondencia con los resultados obtenidos.

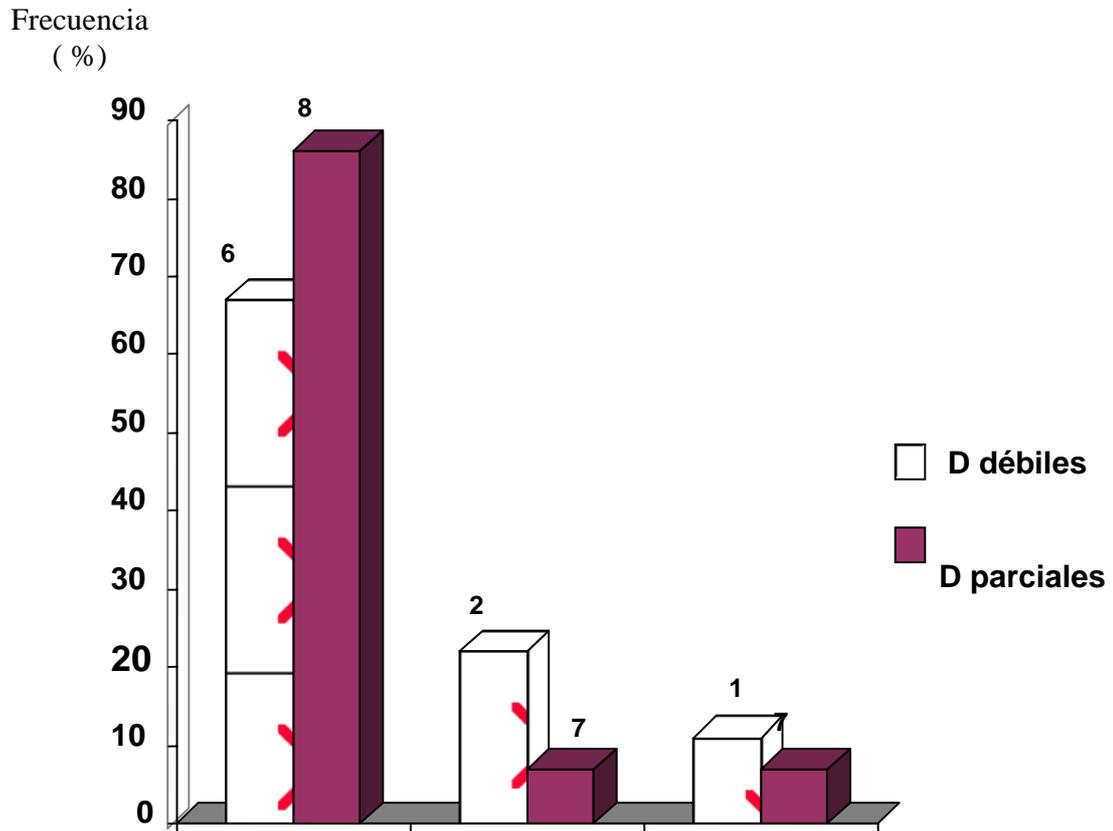
Al comparar los valores obtenidos en Santiago de Cuba con los hallados en Guanabacoa se aprecia que son muy cercanos, lo que manifiesta una correspondencia para ambos fenotipos, D débiles y D parciales. En el caso de población de ciudad de la Habana, estudiada por Bencomo tiene mayor frecuencia que la nuestra, respecto a los donantes negros D débiles, no así en el caso de los donantes blancos. Esto pudiera ser atribuido a que la población de la Habana es muy heterogénea compuesta por individuos de todas las regiones del país.

### **III.5 Distribución de los fenotipos D débiles y D parciales por grupos sanguíneos del Sistema ABO**

La distribución de los donantes de sangre D débiles y D parciales por grupos sanguíneos ABO, se exponen en el Grafico 2. Como se puede observar al grupo sanguíneo O, le correspondió el mayor valor de frecuencia para ambos fenotipos D, en orden decreciente le continuó el Grupo A y por ultimo el grupo B Del grupo sanguíneo AB no hubo representante en los dos fenotipos del antígeno D investigados.

González Corona (1980) (52), quien estudió 68 265 donantes de Santiago de Cuba, obtuvo una frecuencia de: 52.10 %, (grupo O), 31.48% (grupo A), 13.40% (grupo B) y 3.32% (AB). Estos resultados referidos no tienen homología respecto a los valores de frecuencia

con los nuestros, pero si mantiene correspondencia con la frecuencia de aparición de cada grupo sanguíneo del sistema ABO, en igual población de donantes de sangre estudiada



**Grafico 2. Distribución de los fenotipos D débiles y D parciales por grupos sanguíneos del sistema ABO**

### III.6.Frecuencia de los fenotipos Rh D parciales en donantes de sangre de la provincia Santiago de Cuba

En la Tabla 9, se indican los diferentes D parciales identificados mediante el Panel de AcM, con su correspondiente frecuencia. Como se aprecia, se identificaron 6 tipos diferentes de D parciales, el de mayor predominio en los donantes de sangre fue del DFR. Esta variante se identificó por la falta de reactividad con el epítotope 6.5 y la reacción con el resto de los epítotope de este panel. Lomas (1994) identifica esta variante por 1ra vez, por el

comportamiento en la serología con los AcM y la presencia del antígeno Rh de baja incidencia FPTT, en todos los casos con la variante DFR, definiendo que es portadora de los epítopes epD3, epD4 y epD9 y no posee el epD8; además de presentar reacciones ambiguas con el resto de los epítopes (61) Scott (2002) deja establecido en el patrón de reacción de lo AcM contra los epítopes del antígeno D, que están ausente algunos de los epítopes (epD 1.2, 2.2, 5.3, 5.4, 5.5 ,6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8 y 8, 10, 11 y 12 ) (14).

**Tabla 9. Frecuencia de los Rh D parciales en donantes de Santiago de Cuba**

<b>D parciales</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
D II	1	0.01
D IVa	1	0.01
D VI tipo I	3	0.03
D VI tipo III	1	0.01
D VII	1	0.01
DFR	7	0.07
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>0.041</b>

Otra variante identificada fue el DVI tipo I que alcanzó una frecuencia de 0.03%, esta es similar a la registrada en Australia (0.03%), pero ligeramente superior a la encontrada en la región suroeste de Inglaterra y en los Estados Unidos con 0.02%. Sin embargo, resulta inferior a la reportada en Holanda de 0.05%. Esta variante presentó reacción con los epítopes 3.1 y 4.1 solamente. En el patrón de reacción de los AcM, se establece la presencia de los epítopes 3.1, 4.1, 9.1, 15.1 y 16.1 (14).

Wagner (1998), descubre la presencia de esta variante en un estudio realizado a tres poblaciones de Europa Central y plantea que es la variante más importante clínicamente por su muy baja densidad antigénica (62)

Igualmente se manifestó en un donante la variante DVI tipo III, con una frecuencia de 0.01% , su clasificación se realizó en base a la reacción con monoclonales que identifican el epD 4.1 y la ausencia de reacción con los AcM que caracterizan el epD 3 y epD 6 fundamentalmente.

En Alemania desde 1994 la tipificación del antígeno D, se realiza con AcM anti-D que no reaccionan con los D VI, que son deliberadamente tipificados como D negativo para evitar su exposición a sangre Rh positivo y prevenir la inmunización anti-D.(23 )

La variante parcial D II, al igual que la anterior apareció en un solo donante, con 0.01% de frecuencia. Este tipo de D parcial se categorizó teniendo en cuenta la falta de reactividad con los anticuerpos que definen el epD 4.1. Esto se corresponde con el patrón de reacción que describe la ausencia de los epD 4.1 y el epD 9.1(26). Avent (2000) ratifica la pérdida de los epítopes epD 4 y epD 9 y describe las bases moleculares de esta variante, (63)

También se obtuvo la variante D IVa con frecuencia igual a 0.01% Esta variante tiene ausente el epítope epD 3.1, es por ello que se ubicó dentro de este grupo. Como se establece en el patrón de reacción con los AcM, la misma no presenta los epítopes del epD1 al epD4, pero tampoco el epD 9.1, 10.1 y del epD 13 al epD15 (14) . Martínez (1997) reporta una frecuencia 0.16 %, en donantes no blancos de la Habana (55). Podemos observar que esta variante posee mayor frecuencia en la región occidental, sin embargo en esta zona oriental es más baja, lo cual puede ser atribuible al gran mestizaje que existe en esta región oriental, considerado uno de los mayores mestizaje del país.

El D parcial D VII es otro de los identificados mediante la serología con los AcM , este mostró una frecuencia análoga a las últimas 3 variantes D analizadas. Se reconoció por su reactividad primero con todos los AcM del panel de la Diagast y luego por la falta de reacción con los AcM que caracterizan el epítope 8 . En el patrón se expresa que esta variante D tiene ausente los epítopes ep D 8, 10 y 11. Rouillac (1997), realizó un estudio de 3 variantes D VII, aportando que esta variante se caracteriza serológicamente por la pérdida del epD 8 y la expresión del antígeno de baja incidencia Rh 40 ( 64).

### III.7 Distribución de los tipos D parciales con su posible haplotipo

En la Tabla 10, se relacionan los tipos de D parciales con su posible haplotipo Rh . Como se muestra, el haplotipo Rh de mayor incidencia fue el ce, que aparece en 10 individuos, le sigue el haplotipo Ce, presente en 2 donantes y por ultimo representado en un donante se presenta el haplotipo CE.

**Tabla 10. Distribución de los tipos D parciales con su fenotipo Rh**

D parciales	Cantidad	Haplotipo Rh
D II	1	ce
D Va	1	ce
D VI tipo I	3	ce
		ce
DVI tipo III	1	Ce
		ce
D VII	1	ce
DFR	7	CE
		ce

Del análisis individual por cada tipo de D parcial podemos plantear que la variantes D II,, presentó el haplotipo ce, esta variante se relaciona con el haplotipo Ce en poblaciones caucasoides (62 ). En el caso de la variante parcial D IVa su haplotipo se expresó de forma análoga al anterior, lo cual coincide con el reportado por Martínez (1997) en su estudio con donantes de la Habana, para este tipo de D parcial ( ce)(55).

El fenotipo parcial D VI tipo I, tuvo *dos* haplotipos iguales ce y uno diferente Ce. Este tipo de D parcial, en Alemania, se asocia al haplotipo cE,(62), lo cual no se corresponde con la

población cubana. La otra variante dentro del DVI es el tipo III que se manifestó con el haplotipo ce, sin embargo en la población de alemana resalta el haplotipo Ce (61).

También en el caso del D parcial DVII reveló el mismo haplotipo ce, parece que este es mayoritario en la población estudiada.

Dentro de la variante DFR, hubo variabilidad en la expresión de los haplotipos en los siete donantes procesados en *cuatro*, de ellos su haplotipo fue idéntico al analizado con anterioridad (ce), aparecieron *dos* con haplotipo Ce y uno mostró el haplotipo CE. Estudios realizados en Inglaterra muestran que esta variante se caracteriza por presentar variabilidad que va desde el haplotipo Ce, con mayor frecuencia al cE (60).

### **III.8 Investigación de anticuerpos**

El pesquizaje de anticuerpos antieritrocitarios realizado a todos los donantes, a partir de la suero obtenido de la muestra sin anticoagulante, por las diferentes técnicas empleadas en el laboratorio, arrojó resultado negativo para todas las muestras. Sin embargo, Wagner (1998), plantea que los individuos D VI, son detectados por la presencia de anticuerpos anti-D, en su suero (61). Hasta el momento en Cuba no se han detectado anticuerpos en el sueros de los individuos con esta variante D VI, según reporta Martínez (1997), quien en su estudio de *seis* donantes D VI, no encontró anti-D circulantes (54); estos resultado son análogos a los nuestros, donde aparecieron *cuatro* individuos D VI (3 tipo I y 1 Tipo III), sin anticuerpos en su suero. Estos resultados varían según el tipo de población que sea estudiada.

### **III.4. 12 Modificaciones en el Genotipo de los D parciales estudiados**

Aún cuando el estudio del genotipo *RHD*, no esta dentro de los objetivos de este trabajo, a modo de referencia se presenta en la Tabla 12, las modificaciones que ocurren en el genotipo de los D parciales determinados. Esta se elaboró sobre la base de su caracterización fenotípica y los datos aportados por los investigadores sobre su Biología Molecular (64).

**Tabla 12. Modificaciones en el Genotipo de los D parciales estudiados**

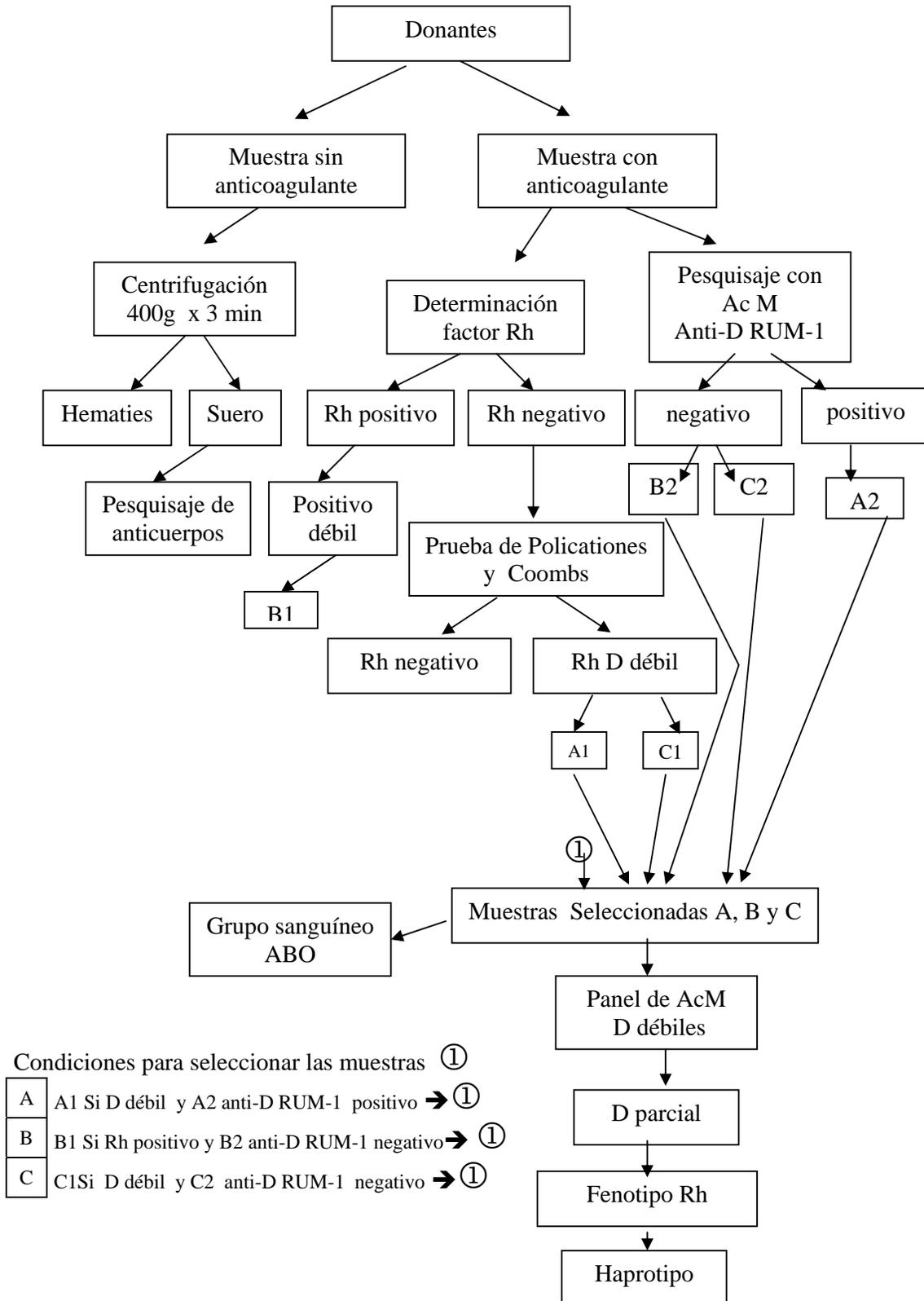
Nombre	Exones con rearrreglo	Alelos presente	Cambio de Nucleótido
Categoría D II	7	RhD(A354D)	C.>A en 1061
Categoría D IVa	2, 3 y 7	RHD(L62F,N152T, D350H)	G>T en 186 A>C en 455 G>C en 1048
Categoría D VI Tipo I	4 y 5	RH-CE(4-5)-D [P226]	Múltiples
Categoría D VI Tipo III	3, 4, 5, 6	RH-CE(3-6)-D	Múltiples
Categoría D VII	2	RH(L110P)	T>C en 329
Categoría DFR	4	RHD-CE(4:M169L- I172F)-D	A>C en 505 A.>Ten 514

Estos resultados deben ser corroborados aplicando el análisis molecular mediante la técnica de “PCR múltiple” y al secuenciación del ADN, lo cual podría determinar con exactitud su expresión genotípica(11).

- 1.** Se determinó la frecuencia fenotípica de los donantes Rh D positivos, Rh D negativos, en Santiago de Cuba; apareciendo con mayor frecuencia los Rh D positivos.
- 2.** La técnica de Policationes permitió determinar los donantes D débiles y confirmar los Rh negativos con resultados coincidentes con la técnica de Coombs indirecta.
- 3.** La técnica de Policationes cumplió con todos los parámetros de calidad establecidos en los procedimientos analíticos, para su validación, según las regulaciones de la OMS, lo que demostró su utilidad para la determinación de donantes D débiles.
- 4.** Con el uso del Panel de AcM referencia internacional fue posible la identificación de los donantes D parciales con los fenotipos DII, D IVa, D VI tipo I, D VI tipo III, D VII y DFR, siendo este último, el de mayor frecuencia de aparición en la población de donantes estudiada.
- 5.** La determinación del fenotipo Rh (C, c, E, e), a los donantes D parciales permitió relacionar estas con su haplotipo Rh. De todos ellos apareció con mayor frecuencia el haplotipo recesivo ce.
- 6.** Se realizó por primera vez la caracterización fenotípica y la cuantificación de la frecuencia de aparición de las variantes D débiles y D parciales en donantes de sangre de Santiago de Cuba.

- Continuar la investigación de los D parciales, con otros donantes de sangre, que permita obtener otras variantes fenotípicas, para completar el panel de células requerido; según las regulaciones del CECMED para poder caracterizar los AcM, que se obtienen en el país
- Aplicarle la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, a todas las muestras estudiadas para identificar su genotipo y corroborar la certeza del tipaje serológico efectuado.

**ANEXOS**  
**Diagrama A. METODOLOGÍA DE TRABAJO**



- Condiciones para seleccionar las muestras ①
- |   |  |
|---|--|
| A | A1 Si D débil y A2 anti-D RUM-1 positivo → ①     |
| B | B1 Si Rh positivo y B2 anti-D RUM-1 negativo → ① |
| C | C1 Si D débil y C2 anti-D RUM-1 negativo → ①     |

### Anexo7. Reacción de las muestras D parciales frente al Panel de AcM de la Diagast

		Muestras D parciales													
Epitopes	AcM	5	6a	6b	9	12a	12b	20	22	24	25	27	28	33	35
<b>3.1</b>	<b>49</b>	+	+	±	±	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>4.1</b>	<b>45</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	<b>0</b>	+	+	+	+	+
<b>5.1</b>	<b>42</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	+	<b>0</b>	+	+	+	<b>0</b>	+	<b>0</b>	+	<b>0</b>	±	+
<b>6.1</b>	<b>35</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>6.5</b>	<b>86</b>	+	<b>0</b>	<b>0</b>	+	+	<b>0</b>	<b>0</b>	±	+	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

## Anexo 8. Resultados de la Validación con la prueba de Coombs indirecta

**Tabla 1. Resultado del Ensayo de Repetibilidad por la técnica de Coombs**

N° de Ensayos	Tipo de Rh					
	D débil( BDA)		D débil ( ADA)		D negativo	
	A	B	C	D	E	F
1	1+	1+	3+	3+	neg	neg
2	1+	1+	3+	3+	neg	neg
3	1+	1+	3+	3+	neg	neg
4	1+	1+	3+	3+	neg	neg
5	1+	1+	3+	3+	neg	neg

**Tabla 2. Resultado del ensayo de Reproducibilidad por técnica de Coombs**

Ensayo	Día	Analista 1						Analista 2					
		Muestra E Rh D negativo			Muestra A D débil (BDA)			Muestra E Rh negativo			Muestra A D débil (BDA)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
2	2	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
3	3	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
4	4	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
5	5	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
6	6	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+
7	7	neg	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	neg	1+	1+	1+

## **Anexo 8.1 Resultados de la Validación con la prueba de Coombs indirecta**

**.Tabla3 Resultados de los Ensayos para determinar la Precisión Interlaboratorio por la técnica de Coombs indirecta..**

Muestra	No de HC	BS Santiago	BS de Palma	Contramaestre
Negativa	7188	neg	neg	neg
	HP-647	neg	neg	neg
	149-panel	neg	neg	neg
	Z-2414	neg	neg	neg
	y-2212	neg	neg	neg
D débil	Y-2163	1+	1+	1+
	HP-577	1+	1+	1+
	7251	1+	1+	1+
	IIF-1292	1+	1+	1+
	Y-2241	1+	1+	1+

## Anexo 8.2 Resultados de la Validación con la prueba de Coombs indirecta

**Tabla 4. Evaluación de la Especificidad del método de Coombs.**

	Células de diferentes fenotipos													
	Fenotipos Rh D específicos				Fenotipos Rh D inespecíficos									
Anti-D	CcDee		ccDee		ccdee		Ccdee		A <sub>1</sub>		B		O	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	4+	4+	4+	4+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	4+	4+	3+	3+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	4+	4+	2+	2+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

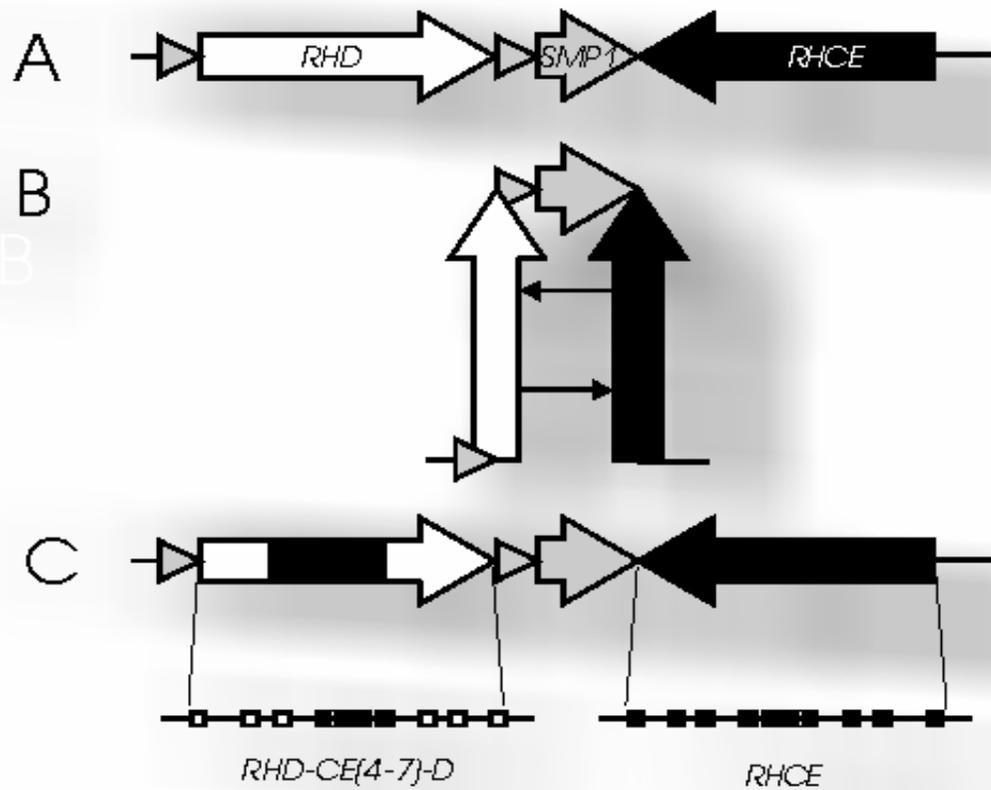
Simbología: Anti-D 1 Título: 256; L- 045-18-1

Anti-D 2 Título: 128; L- 045-18-2

Anti-D 3 Título: 64 ; L- 045-18-3

**Tabla 5. Resultado del ensayo de Robustez por la técnica de Coombs indirecta**

	Muestras					
	Rh D Negativo			D débil		
Ensayo	Z-5745	102	9 (DCC)	202	10	3-21 (ECT)
1	neg	neg	neg	2+	2+	2+
2	neg	neg	neg	2+	2+	2+
3	neg	neg	neg	2+	2+	2+
4	neg	neg	neg	2+	2+	2+
5	neg	neg	neg	2+	2+	2+
6	neg	neg	neg	2+	2+	2+
7	neg	neg	neg	2+	2+	2+
8	neg	neg	neg	2+	2+	2+



**Fig.2 Genes del Sistema Rh:(*RHD- RHCE*-,*SPM1*).y el Mecanismo de Conversión de genes**

**Gene conversion *in cis*.** Proposed mechanism of gene conversion *in cis*. (i) The *RHD* and *RHCE* genes are inversely orientated as typical for clustered genes. (ii) A putative hairpin formation of the chromosome allows the close proximity of homologous segments in identical orientation. This structural feature is instrumental for gene conversion events *in cis*. (iii) Resolving the hairpin yields an *RHD-CE-D* hybrid gene structure, many of which have been observed to date at the *RH* gene locus. As an example, the *RHD-CE(4-7)-D* hybrid exon structure is shown. Symbols are according to [Fig.](#)

**Tabla H. Reacción de las muestras D parciales frente al Panel de AcM de la Diagast**

		<b>Muestras D parciales</b>													
<b>Epitopes</b>	<b>AcM</b>	<b>5</b>	<b>6a</b>	<b>6b</b>	<b>9</b>	<b>12a</b>	<b>12b</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>33</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>49</b>	+	+	±	±	+	±	±	+	+	+	+	+	+	+
<b>4.1</b>	<b>45</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	<b>0</b>	+	+	+	+	+
<b>5.1</b>	<b>42</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	+	<b>0</b>	+	+	+	<b>0</b>	+	<b>0</b>	+	<b>0</b>	±	+
<b>6.1</b>	<b>35</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>6.5</b>	<b>86</b>	+	<b>0</b>	<b>0</b>	+	+	<b>0</b>	<b>0</b>	±	+	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>