



INMUNOHEMATOLOGÍA PLAQUETARIA

La transfusión de plaquetas ha sido parte del enfoque terapéutico vital en el manejo de pacientes con trastornos hematológicos durante casi medio siglo, sin embargo, en nuestro medio aún desconocemos los desenlaces clínicos relacionados con la aloinmunización plaquetaria. Para abordar este tema describiremos los fundamentos de la inmunohematología plaquetaria, su importancia clínica y las estrategias que han permitido el reporte de nuevos antígenos (Ags) y el diagnóstico de los anticuerpos (Acs) dirigidos contra sus Ags.

Antígenos Plaquetarios

Al igual que en la inmunología eritrocitaria los Ags presentes en las plaquetas pueden causar aloinmunización durante el embarazo, la transfusión sanguínea o el trasplante. Los Ags presentes en las plaquetas también están en otras células y tejidos, y son conocidos como Ags plaquetarios no específicos, tal es el caso de los Ags ABO, Lewis, P, I y HLA (clase I); o pueden ser expresados exclusivamente en su membrana, los cuales se denominan Ags plaquetarios específicos o HPA (del inglés Human Platelet Antigens).^{1,2}

Antígenos ABO

Los Ags ABO pueden ser absorbidos desde el plasma o ser constitutivos de la membrana plaquetaria y estar presentes en las moléculas de adhesión endotelial PECAM-1 y CD109 o en las glicoproteínas (GP) intrínsecas plaquetarias GPIb, GPIIa, GPIIb, GpIV GPV. Estas glicoproteínas a su vez desempeñan un rol crítico en su fisiología y funcionalidad ya que actúan como receptores y participan en los procesos de adhesión y agregación plaquetaria.^{1,2}

Se ha asumido que el grado de expresión de los Ags ABO es bajo, por lo cual generalmente la transfusión de plaquetas ABO incompatibles no implica una disminución significativa en la supervivencia de las plaquetas, por ello rutinariamente son transfundidas superando las barreras ABO. No obstante, este tema es muy controvertido ya que la incompatibilidad ABO se asocia con refractariedad plaquetaria como veremos más adelante.^{1,2,3}



Antígenos Lewis, I y P

Estos Ags son absorbidos desde el plasma y están presentes en pequeñas cantidades, por lo cual se considera que su importancia clínica es nula.^{1,2}

Antígenos HLA

Las plaquetas expresan Ags HLA Clase I y carecen de los Ags HLA clase II. Los Ags HLA Clase I con mayor expresión en la membrana plaquetaria son los HLA-A y HLA-B, seguidos de los HLA-C, cuya expresión es reducida, estos últimos generalmente no son tenidos en cuenta en la compatibilidad de plaquetas.^{1,2,3}

Los Ags y Acs Anti HLA tienen gran significancia clínica transfusional ya que están asociados con refractariedad plaquetaria, reacciones febriles post-transfusionales y lesión pulmonar aguda asociada a la transfusión conocida como TRALI (del inglés transfusion related acute lung injury).

Antígenos Plaquetarios Específicos

A pesar de su nombre, muchos de estos Ags son encontrados en otras células y tejidos como las células endoteliales, fibroblastos, células de músculo liso, linfocitos T activados, entre otros, sin embargo, su mayor importancia clínica está relacionada con la Inmunohematología plaquetaria.^{1,2,3}

En la actualidad hay 29 Ags plaquetarios descritos, los cuales están organizados cronológicamente de acuerdo a la fecha de su descubrimiento, 12 de ellos están agrupados en seis sistemas, HPA1 a HPA5 y HPA15. La mayoría de estos sistemas son bialélicos, es decir, están conformados por un par antitético (a y b). Esta designación alfabética determina su frecuencia en la población, donde la letra "a" representa los Ags de alta frecuencia y la letra "b" los de baja frecuencia. También se pueden designar otros Ags como "w", aquellos en los cuales aún no se ha encontrado Alo-Ac dirigido contra el Ag antitético. Al igual que los Ags ABO los Ags HPA están presentes en las GP, las cuales suelen integrar compuestos formados por dos moléculas, distintas (α y β), que además de ser constituyentes de la membrana plaquetaria contribuyen a los procesos de adhesión y agregación plaquetaria, debido a que operan como receptores de ligandos como el fibrinógeno, factor Von Willebrand, colágeno y fibronectina^{1,2,3,4}.



		Br ^a , Zav ^a , Hc ^a				
	HPA-6bw	Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa	CD61	17	1544G>A
	HPA-7bw	Mo ^a	GPIIIa	CD61	17	1297C>G
	HPA-8bw	Sr ^a	GPIIIa	CD61	17	1984C>T
	HPA-9bw	Max ^a	GPIIb	CD41	17	2602G>A
	HPA10bw	La ^a	GPIIIa	CD61	17	263G>A
	HPA11bw	Gro ^a	GPIIIa	CD61	17	1976G>A
	HPA12bw	ly ^a	GP I bbeta	CD42c	22	119G>A
	HPA13bw	Sit ^a	GP I a	CD49b	5	2483C>T
	HPA14bw	Oe ^a	GPIIIa	CD61	17	1909_1911delAAG
HPA-15	HPA-15a	Gov ^b	CD109	CD109	6	2108C>A
	HPA-15b	Gov ^a				
	HPA-16bw	Duv ^a	GPIIIa	CD61	17	497C>T
	HPA-17bw	Va ^a	GP I IIb/IIIa	CD61	17	662C>T
	HPA-18bw	Cab ^a	GP I a	CD49b	5	2235G>T
	HPA-19bw	Sta	GPIIIa	CD61	17	487A>C
	HPA-20bw	Kno	GP I IIb	CD41	17	1949C>T
	HPA-21bw	Nos	GPIIIa	CD61	17	1960G>A
	HPA-22bw	Sey	GP I IIb	CD41	17	584A>C
	HPA-23bw	Hug	GPIIIa	CD61	17	1942C>T
	HPA-24bw	Cab2 ^{a+}	GP I IIb	CD41	17	1508G>A
	HPA-25bw	Swi ^a	GP I a	CD49b	5	3347C>T
	HPA-26bw	Sec ^a	GPIIIa	CD61	17	1818G>T
	HPA-27bw	Cab ^{3a+}	GP I IIb	CD41	17	2614C>A
	HPA-28bw	War	GP I IIb	CD41	17	2311G>T

Fuente/ Adaptado de: Immuno Polymorphism Database- HPA. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/> ⁵

Bases Moleculares de los Antígenos HPA

Como se ilustra en la tabla 1, la mayoría de los Ags HPA son producto de polimorfismos de un solo nucleótido, SNP, (del Inglés Single Nucleotide Polymorphism), en el cual se produce un cambio de base/nucleótido que se traduce en un cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína. La única excepción de este mecanismo corresponde al Ag HPA-14w el cual es producto



de la delección de tres nucleótidos que se traduce en la pérdida de Lisina en el residuo 611 de la GPIIb. Esta característica de mecanismos moleculares comunes para la expresión de los HPA hace de las técnicas de genotipificación herramientas útiles para la tipificación de donantes y pacientes.²

A continuación, se describen las frecuencias de estos Ags, los cuales pueden variar de acuerdo al componente étnico de las poblaciones objeto de estudio:

Frecuencias HPA En Diferentes Poblaciones (%)											
País	n	HPA-1a	HPA-1b	HPA-2a	HPA-2b	HPA-3a	HPA-3b	HPA-5a	HPA-5b	HPA-15a	HPA-15b
Argentina	192	87.8	12.2	87.5	12.5	61.2	38.8	92.7	7.3	51.1	48.9
Brasil	150 ¹	90.3	9.7	81.0	19.0	66.6	33.4	87.6	12.4	NR	NR
	400 ²	78.0	22.0	90.0	10.0	63.0	37.0	91.0	9	NR	NR
España	900	81.0	19.0	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	500	NR	NR	90.0	10.0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	800	NR	NR	NR	NR	65.0	35.0	NR	NR	NR	NR
	600	NR	NR	NR	NR	NR	NR	88.0	12.0	NR	NR
	385	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	47.4	52.6
China	1000	99.4	0.6	95.2	4.85	59.4	40.6	98.6	1.4	53.2	46.8
Suiza	500	80.9	1.91	91.8	10.9	59.3	40.7	93.4	6.6	NR	NR
Italia	144	85.0	15.0	89.0	11.0	61.0	39.0	90.0	10.0	NR	NR

NR: No Reportado Brasil¹: Población Afrodescendientes Brasil²: Donantes caucásicos

Tabla 2. Frecuencias de HPA en diferentes poblaciones
NR: No Reportado Brasil¹: Población Afrodescendientes Brasil²: Donantes caucásicos
Fuente/ Adaptado de: Immuno Polymorphism Database- HPA. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/>⁵

Importancia Clínica de los Antígenos y Anticuerpos Plaquetarios

Trombocitopenia Aloinmune Fetal/ Neonatal (TFNA)

La TFNA es una patología similar a la enfermedad hemolítica del feto y el recién nacido (EHFRN), pero en este caso se produce destrucción de las plaquetas fetales o del neonato por un anticuerpo materno dirigido contra un Ag plaquetario HPA heredado del padre. Puede suceder desde la primera gestación y puede ser recurrente en las futuras gestaciones en un 90%. Aproximadamente en un 80% de los casos de TFNA los Acs involucrados corresponden a especificidades Anti HPA-1a y en un 15% a HPA-15b. De acuerdo a las frecuencias de los Ags HPA en la población, existe la posibilidad de que la aloinmunización ocurra en 1 de cada 50 embarazos, sin embargo, la incidencia real estimada de TFNA en recién nacidos es de aproximadamente 1 en 1000.^{3,6,7,8,9,10}



La TFNA es la principal causa de trombocitopenia grave en fetos y recién nacidos, además es la principal causa de hemorragia intracraneal en lactantes a término. En pacientes gravemente afectados se pueden presentar hemorragias, petequias, púrpura y recuento de plaquetas muy bajo ($<50 \times 10^9/L$). El diagnóstico de TFNA se contempla cuando se han descartado otras causas de trombocitopenia en el neonato como coagulación intravascular diseminada, infecciones virales o bacterianas y sobre todo cuando nace de una madre sana sin complicaciones durante el embarazo, sin patologías autoinmunes tipo lupus eritematoso sistémico, púrpura trombocitopenia idiopática, entre otras.^{3,6,7,8,9,10}

Para confirmar que la causa de la trombocitopenia neonatal es de origen aloinmune se deben realizar estudios que permitan investigar la presencia de Alo-Acs en el suero materno o evidenciar la incompatibilidad materno-fetal relacionada a Ags HPA. Adicionalmente, cuando se han descartado los Acs más frecuentes y se quiere descartar la presencia de un Alo-Ac dirigido contra un Ag privado es necesario realizar prueba cruzada del suero materno con plaquetas del padre. Para el diagnóstico inmunohematológico de TFNA, se utilizan técnicas serológicas que permiten determinar la especificidad de los Alo-Acs, además de técnicas de fenotipificación o genotipificación como la reacción en cadena de la polimerasa que discutiremos más adelante. Sin embargo, es importante mencionar que el diagnóstico de la TFNA es un reto, ya que los Acs pueden ser indetectables en muchos casos, incluso en los casos que se evidencia incompatibilidad materno-fetal por técnicas de genotipificación, por ello si la presentación clínica es sugestiva de TFNA la presencia de esta incompatibilidad antigénica es la base para el diagnóstico.^{3,6,7,8,9,10}

De acuerdo a la Sociedad Española de Transfusión (SETS) el tratamiento consiste en la administración de Inmunoglobulina endovenosa a dosis altas (1gr/Kg/día, 2 días) y en los casos más graves, transfusión de plaquetas. Cuando no ha sido posible determinar la especificidad de los Acs responsables de la trombocitopenia, si es posible, se seleccionarán plaquetas ABO y RHD compatibles, Ag HPA-1a negativo que resultarían compatibles con el suero materno en aproximadamente el 75% de los casos; otra estrategia es la transfusión de plaquetas HPA-1a y HPA-5b negativo, en las cuales se estima compatibilidad en el 95% de los casos. Adicionalmente contemplan la transfusión de plaquetas maternas irradiadas a las cuales se les extrae la mayor cantidad de plasma o son sometidas a procesos de lavado y re-suspensión en solución salina, sin embargo, estos procedimientos no son realizados en la rutina de los bancos de sangre o servicios de transfusión y pueden representar peligro de contaminación reduciendo la vida útil del componente a 8 horas.^{4,6}

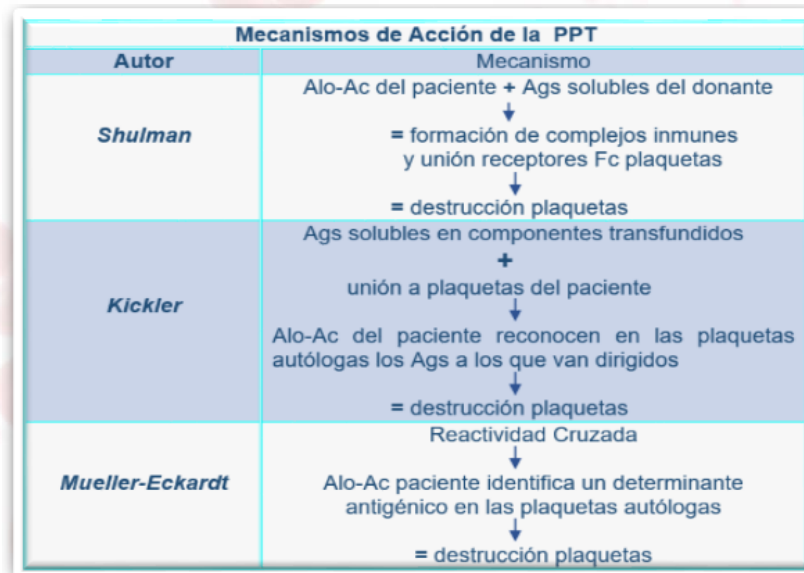
Debido a que la patología puede ser recurrente en próximas gestaciones, las estrategias terapéuticas son la administración de inmunoglobulina endovenosa y corticoesteroides a la materna. Con el fin de determinar trombocitopenia la fetal, es necesario realizar cordocentesis y



de ser necesario realizar transfusiones intrauterinas con plaquetas HPA compatibles, sin embargo, posturas más conservadoras plantean que debido al riesgo del procedimiento, este debe ser realizado exclusivamente en maternas con antecedentes de neonatos con trombocitopenia severa ($20 \times 10^9/L$) y/o con hemorragia intracraneal.^{4,6,3,6,7,8,9,10}

Purpura Post –transfusional (PPT)

La PPT es una reacción adversa de la transfusión (RAT) de tipo tardío, de las RAT es la más inusual, con una ocurrencia estimada de 1-2: 100.000 ingresos hospitalarios, siendo más frecuente en pacientes con antecedentes transfusionales y gestacionales. Se puede desencadenar de 3 a 15 días post transfusión de cualquier componente sanguíneo, cursa con destrucción de las plaquetas autólogas resultando en trombocitopenia y hemorragia severa que puede desencadenar hemorragia intracraneal. De acuerdo al manual técnico de la AABB, el 68% de los casos reportados de PPT carecían del Ag HPA-1a y tenían el Alo-Ac respectivo (Anti HPA-1a), razón por la que se han postulado varios mecanismos de acción por los cuales un Alo-Ac puede inducir la destrucción de las plaquetas autólogas:^{1,4,11}



El tratamiento para la PPT es inmunoglobulina endovenosa y en los casos más severos se realiza recambio plasmático.



Refractariedad inmunológica a la transfusión de plaquetas

La refractariedad a la transfusión de plaquetas es definida como el fallo en el incremento esperado en la cifra de plaquetas tras dos transfusiones consecutivas. Al igual que en la TNFA, para hablar de refractariedad inmunológica es necesario descartar factores clínicos que pueden ocasionar la reducción de los recuentos post- transfusión y la supervivencia de las plaquetas, como infección, fiebre, coagulación intravascular diseminada, esplenomegalia, hemorragia y medicamentos.^{4,11,12,13}

Se ha demostrado que sólo los Acs de especificidad ABO, HLA-A, HLA-B y HPA pueden afectar la supervivencia de las plaquetas transfundidas, siendo los Acs HLA Clase I los más frecuentes. Estos Acs pueden producirse por transfusión, embarazo, aborto o trasplante. El estímulo antigénico de la transfusión se da por exposición a Ags expresados en plaquetas o linfocitos del donante, por esta vía de inmunización los Ac suelen ser poliespecíficos, lo cual dificulta la búsqueda de unidades compatibles. Como mecanismo de mitigación de aloinmunización HLA se ha implementado la leucorreducción e irradiación de componentes sanguíneos, así como disminuir la cantidad de donantes a los que son expuestos los receptores.^{4,11,12,13}

Los Acs HPA se encuentran involucrados en aproximadamente en el 3,8 y 8% de los casos de refractariedad a la transfusión de plaquetas. Generalmente pueden estar presentes en mezclas con Acs Anti HLA, las especificidades más comunes son anti-HPA-1b y anti-HPA-5b.^{4,11,12,13}

Respecto a la importancia de los Ags y Acs ABO en la refractariedad a la transfusión de plaquetas es importante tener en cuenta, que las plaquetas expresan antígenos ABO en su superficie, además cuando realizamos transfusión de plaquetas, estas contienen Acs dirigidos contra los antígenos que están ausentes en el donante. De ahí que introduzcamos dos términos esenciales para hablar de la compatibilidad ABO de plaquetas¹⁴:

Incompatibilidad ABO		
Incompatibilidad	Definición	Ejemplo
Mayor	Las plaquetas a transfundir, contienen Ags incompatibles con las isoaglutininas (Ac) ABO presentes en el plasma del receptor	Donante: Grupo A Receptor: Grupo O
Menor	El plasma del donante, contiene isoaglutininas incompatibles con los Ags ABO del receptor. Los Ac adquiridos pasivamente (del componente sanguíneo) se unen a las plaquetas y eritrocitos del receptor y pueden causar reacción hemolítica.	Donante: Grupo O Receptor: Grupo A



Es por lo mencionado que la importancia de la compatibilidad del sistema ABO en la transfusión de plaquetas es un tema de debate. En 1993 *Ogasawara K*¹⁵ y colaboradores demostraron que un caso de refractariedad a la transfusión de plaquetas HLA compatibles, ABO incompatibles estaba relacionado con alto título de Anti A y Anti B del receptor y con la alta expresión de Ags ABO en donantes de sangre, permitiendo diferenciar dos fenotipos de acuerdo a la cantidad de antígenos A o B expresados en la membrana plaquetaria, fenotipos de baja y de alta expresión; estos últimos con aproximadamente 20 veces más de Ag, lo cual podría estar relacionado con baja respuesta a la transfusión de plaquetas ABO incompatibles. Con relación a esto Carr R¹⁶ y colaboradores, concluyeron que las plaquetas ABO incompatibles son tan efectivas como las plaquetas compatibles en pacientes con bajo título de isoaglutininas que requieren pocas transfusiones. Sin embargo, la mayor incidencia de refractariedad temprana inducida en pacientes transfundidos con incompatibilidad mayor, indica que las plaquetas ABO incompatibles no deben administrarse a pacientes que requieren transfusión a largo plazo.

Respecto a la incompatibilidad menor, la cual es más frecuente en la transfusión de plaquetas grupo O con altos títulos de Anti A, o con la transfusión de plaquetas grupo A con altos títulos de Anti B, hay recomendaciones que sugieren que las plaquetas procedentes de donantes con títulos peligrosos de isoaglutininas deben ser transfundidas en receptores del mismo grupo, a fin de prevenir la aparición de reacciones hemolíticas transfusionales. Pese a esto, aun no existe consenso de los títulos críticos que podrían estar asociados con reacciones transfusionales, adicionalmente, la titulación de isoaglutininas no es una práctica universal en los bancos de sangre ni el servicio de transfusión. Otras alternativas para mitigar este efecto, es restringir el volumen de plasma incompatible con soluciones aditivas o eliminando la mayor cantidad de plasma del componente,^{14.17} adicionalmente en determinadas poblaciones de pacientes se debe seguir una política de transfusión de plaquetas isogrupo, tal es el caso de pacientes pediátricos o pacientes con bajo peso y pacientes dependientes de transfusión.¹²

Reconociendo los posibles efectos adversos de la transfusión de plaquetas ABO incompatible, la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB, del inglés American Association of Blood Banks), el colegio americano de patología (CAP) entre otros, recomiendan que existan procedimientos documentados para la transfusión de plaquetas ABO incompatibles y que, las decisiones de compatibilidad deben ser basadas en el contexto clínico del paciente, la seguridad de la transfusión, la eficacia, la disponibilidad y utilización de recursos. Esto teniendo en cuenta que las plaquetas ABO idénticas no siempre están disponibles en el inventario de componentes sanguíneos, en situaciones de emergencia la hemoclasificación ABO del paciente puede ser desconocida, además, debido a su corta vida útil (5 días), muchas veces la gestión del inventario se da en función de la fecha de vencimiento y no en función de la concordancia ABO.¹⁴



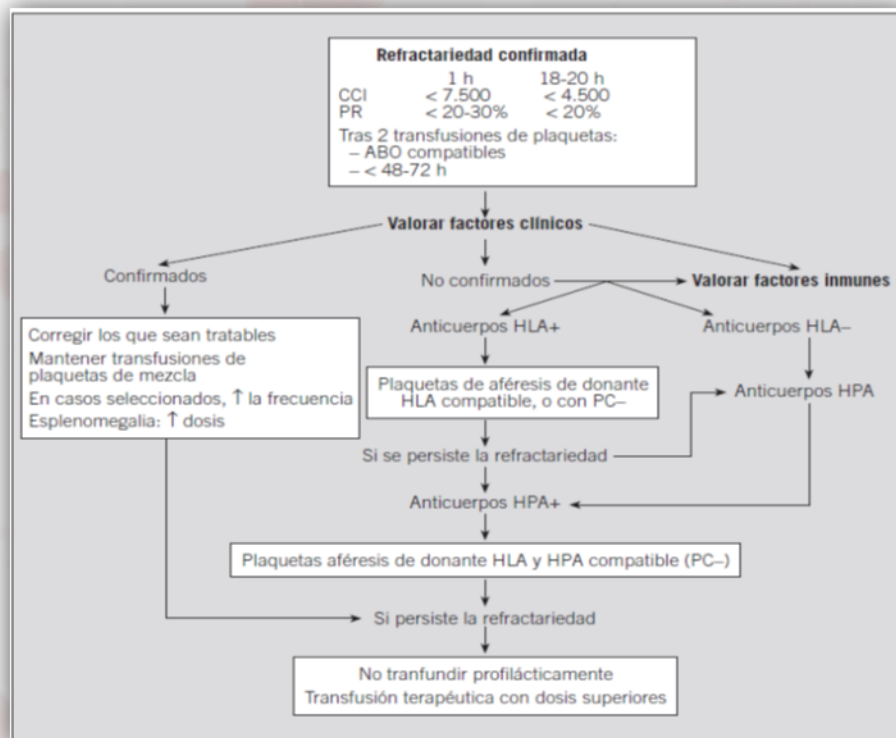
A continuación, se ilustran las fórmulas para evaluar el rendimiento de la transfusión de plaquetas, así como el modelo planteado por Muñiz E¹² para el diagnóstico y tratamiento de la refractariedad a la transfusión de plaquetas:

Porcentaje de Recuperación (PR)

$$PR = \frac{100 \times \text{Volemia (ml)} \times 1000 \times \text{incremento observado (Plaquetas/ ul)}}{\text{Número de plaquetas transfundidas}}$$

Incremento corregido (CCI) (del inglés corrected count increment)

$$CCI = \frac{\text{Superficie corporal (m}^2\text{)} \times \text{incremento observado (Plaquetas/ ul)} \times 10^{11}}{\text{Número de plaquetas transfundidas}}$$



Fuente: Med Clin 2003; 120(14):544-9¹²



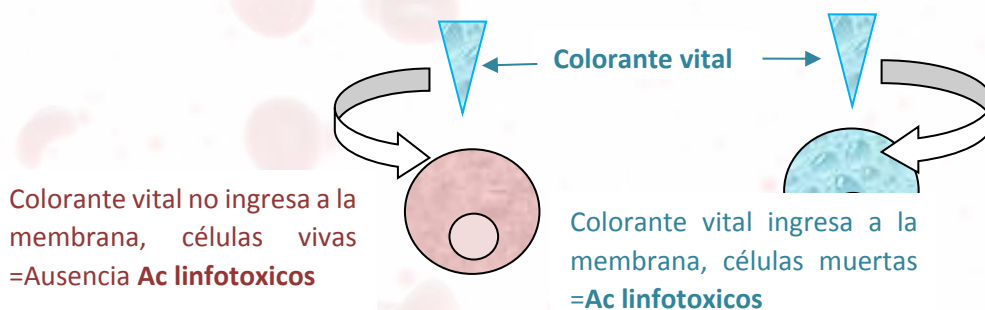
Técnicas para investigar Anticuerpos y Antígenos Plaquetarios

Para la investigación de Acs dirigidos contra las plaquetas se pueden utilizar diferentes métodos como ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA, (del inglés EnzymeLinked ImmunoSorbent Assay), técnica de Inmunofluorescencia, técnica de MAIPA (del inglés Monoclonal Antibody Immobilization Platelet Antigens), entre otros. Sin embargo, en determinados casos no existe un método único para la investigación de anticuerpos, por ello la combinación de varios de ellos permiten incrementar la probabilidad de detectar Ac y determinar su especificidad, sobre todo en presencia simultánea de Ac ABO, HLA y HPA, que puede enmascarar especificidades y dificultar su investigación.¹

Pruebas de Microlinfocitotoxicidad

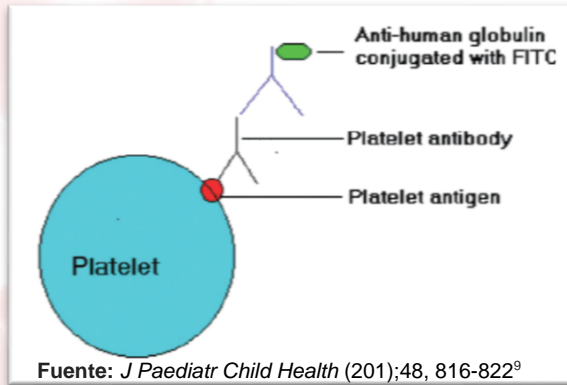
Estas pruebas son el método clásico de tamizaje de Ac HLA dependientes del complemento. En esta prueba el suero del paciente es enfrentado con un panel de linfocitos con diferentes fenotipos HLA representativos de la población, generalmente de 30- 60 fenotipos por panel. Si en el suero del paciente existen Ac dirigidos contra las Ag presentes en el linfocito, posterior a la adición de complemento, se producirá lisis celular la cual es evidenciada con la adición de un colorante vital que penetra al interior de las células en las cuales se ha producido alteración en la permeabilidad de la membrana. El porcentaje de células reactivas frente a las cuales un paciente presenta anticuerpos citotóxicos se conoce como PRA (del inglés panel reactive antibody)¹.

Esta prueba también puede ser utilizada para pruebas cruzadas donante- receptor. La prueba consiste en la incubación del suero del receptor y linfocitos del donante, si se evidencia lisis de los linfocitos se interpreta como la presencia de Acs del receptor dirigidos contra los Ags presentes en el donante, lo cual significa incompatibilidad HLA.





Pruebas de inmunofluorescencia

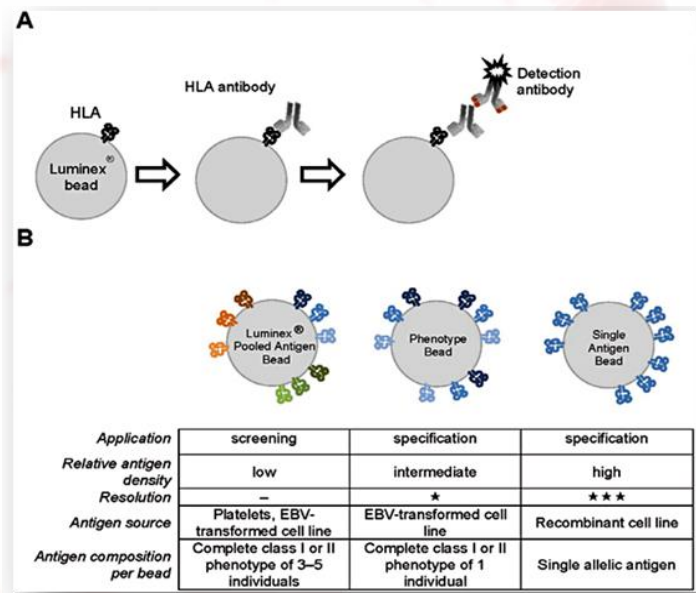


Las plaquetas del paciente se incuban con sueros para identificación de antígenos plaquetarios, se produce la fase de sensibilización en la cual se forman complejos inmunes. Posteriormente se adiciona un Ac de anti-globulina humana marcado con un fluorocromo (ejemplo: isotiocianato de fluoresceína, FITC) que puede detectarse por citometría de flujo. En el caso de investigación de TFNA la fenotipificación materna del antígeno HPA-1a se realiza mediante esta prueba, utilizando un suero conocido con alto título anti-HPA-1a. Esta

prueba también puede ser utilizada para el rastreo de anticuerpos con paneles de plaquetas intactas con fenotipos conocidos, las cuales son incubadas con el suero problema. Además, se pueden realizar pruebas de compatibilidad de plaquetas en las que se enfrentaría el suero del receptor con las plaquetas del donante o en la investigación de TFNA para evidenciar la incompatibilidad entre el suero materno y plaquetas del padre⁹.

A pesar de la versatilidad de la técnica, una de sus limitaciones es que, al utilizar plaquetas intactas, en determinados casos no se puede diferenciar entre la presencia de Ac HPA o HLA o ABO. Para diferenciar Ac HLA se requiere tratamiento previo con difosfato de cloroquina, el cual elimina los Ags HLA de la superficie de la plaqueta.

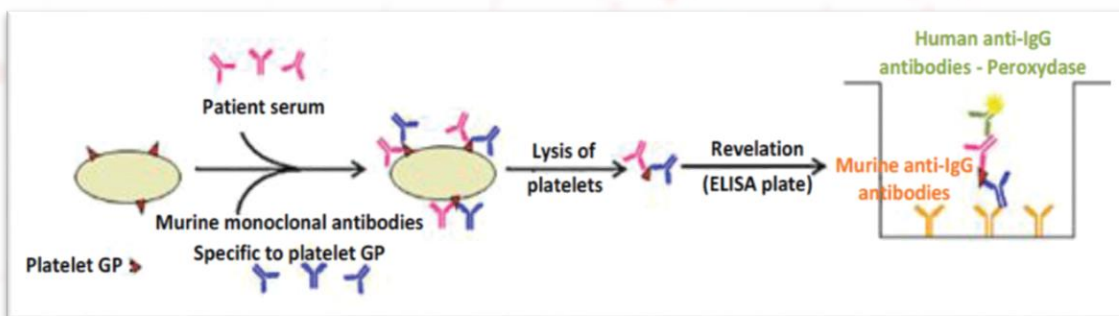
Como estrategia para mitigar esta limitación, o para evitar depender de la utilización de linfocitos como en las pruebas de microlinfocitotoxicidad, en las cuales solo se pueden detectar anticuerpos dependientes del complemento, se han creado otras estrategias fundamentadas en la citometría de flujo. Tal es el caso de Luminex[®] para tipificación HLA o para rastreo e identificación de Ac, para estas últimas pruebas se utiliza una suspensión perlas con un patrón de color conocido, que portan en su superficie moléculas HLA. Los Ac HLA del paciente se fijan a la molécula HLA correspondiente y se evidencian mediante una Anti-IgG, marcada con un fluorocromo. Cuando la solución de perlas pasa por el citómetro (Luminex[®]), se produce lectura del fluorocromo y del color de la perla al que está asociado. El software interpreta estas dos señales y realiza la emisión del resultado. Existen configuraciones de reactivos que permiten diferentes utilidades, tanto para el rastreo de anticuerpos en la determinación cualitativa, como la identificación del tipo específico.¹⁹



Fuente: Transfus Med Hemother 2013;40:182–9¹⁹

Inmovilización por anticuerpos monoclonales específicos de antígenos de plaquetas (MAIPA)

Técnica en fase sólida, basada en la captura de las diferentes glicoproteínas de la membrana plaquetaria con anticuerpos monoclonales específicos (AcMo) los cuales forman complejos con los Ac presentes en el suero del paciente. Esta reacción se somete a una fase de lavado y solubilización con un detergente lo cual produce lisis de la plaqueta, elimina el exceso de AcMo así como los anticuerpos no unidos. Posteriormente una alícuota de este sobrenadante que contiene los complejos inmunes es trasferida a un pozo, en el que la fase solida contiene anticuerpos murinos que inmovilizan el complejo trimétrico de AcMo-Ac paciente-glicoproteína plaquetaria y al cual se agrega un anticuerpo marcado enzimáticamente que revela la reacción.^{1,10,12}

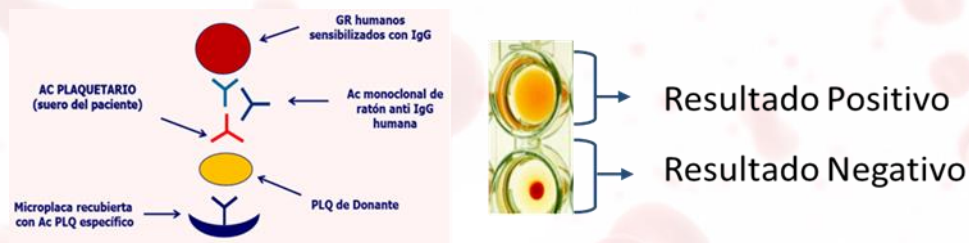


Fuente: Int J Blood Res Disord 2015, 2:1



Prueba de Aglutinación Eritrocitaria en Fase Solida (MASPAT)

La prueba de aglutinación en fase eritrocitaria (MASPAT) permite la detección de Ac HLA y HPA. Es una técnica en fase sólida en la cual una monocapa de plaquetas de donante es inmobilizada en pozos, cuya superficie se encuentra recubierta con AcMo plaquetarios específicos. A estos pozos se agrega el suero del paciente favoreciendo que los anticuerpos del suero se unan a la monocapa de plaquetas. Después de la incubación, se realizan lavados que eliminan los anticuerpos no unidos. Los anticuerpos unidos a las plaquetas son detectados añadiendo un AcMo de ratón anti- IgG humana y eritrocitos sensibilizados con IgG. En caso de una reacción positiva, el anti IgG -humano y las células indicadoras se unen a los anticuerpos IgG en la monocapa de plaquetas. Los resultados negativos se caracterizan por la sedimentación de las células indicadoras en el fondo del pozo, lo cual se interpreta como ausencia de Ac HLA y/o HPA.



Pruebas de Biología Molecular

Debido a la limitación de antisueros HPA y a las muestras insuficientes para fenotipificación en los casos de trombocitopenia, las técnicas de biología molecular se posicionan como una alternativa útil para la tipificación de donantes, pacientes y para evidenciar la incompatibilidad madre/padre en la investigación de TNAF. Para estos análisis se realiza extracción de ADN de células mononucleares de sangre periférica o de epitelio bucal, para posteriormente ser amplificado y analizado en técnicas basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*). Estas técnicas también pueden ser utilizadas para la tipificación HLA^{1,2,4}.

PCR

La tipificación HLA y HPA puede realizarse empleando ensayos de PCR, en los cuales se reproducen *in vitro* los procesos de replicación del ADN. El proceso es llevado a cabo en un termociclador, donde se produce:

Denaturación ADN: Se produce separación las dos hebras de ADN por acción de la temperatura (94-95 °C).



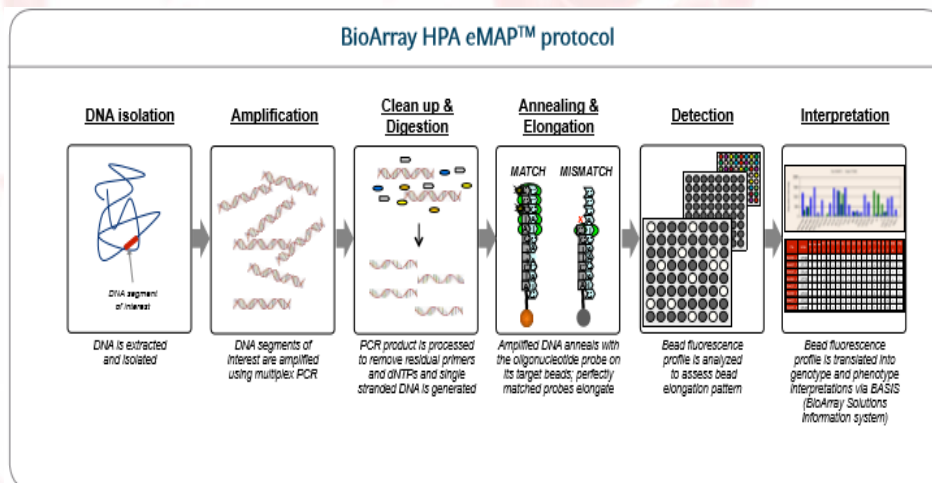
Alineamiento: Unión de primers o Cebadores a una secuencia específica de ADN. Esta unión se da por complementariedad, los primers delimitan la secuencia a ser amplificada, Temperatura 40- 68°C.

Extensión: Una polimerasa sintetiza una cadena complementaria añadiendo desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs).

Las variantes de la PCR utilizadas para la genotipificación plaquetaria HLA o HPA son PCR Alelo-específica, PCR RFLP o de fragmentos de restricción, PCR multiplex y PCR en tiempo real.¹

Microarrays

Dentro de las técnicas de biología molecular para tipificación HPA se encuentra BeadChip®, que detecta alelos responsables de la expresión de 22 antígenos HPA en una sola reacción. El proceso inicia con la extracción de ADN, seguida de la amplificación y biotilación del ADN en una PCR Multiplex. Posteriormente se realiza una digestión enzimática con el fin de eliminar primers y dNTPs libres, además de convertir los productos de ADN en cadena sencilla. Este producto se hibrida a un Array o chip, el cual contiene sondas específicas marcadas fluorescentemente, que permiten detectar los SNPs de interés. Cuando por complementariedad se produce unión del ADN con la sonda, se produce elongación de la cadena y producción de fluorescencia, la cual emite una señal patrón que es interpretada en un software y se convierte en una asignación de genotipo y predicción de fenotipo HPA²⁰.

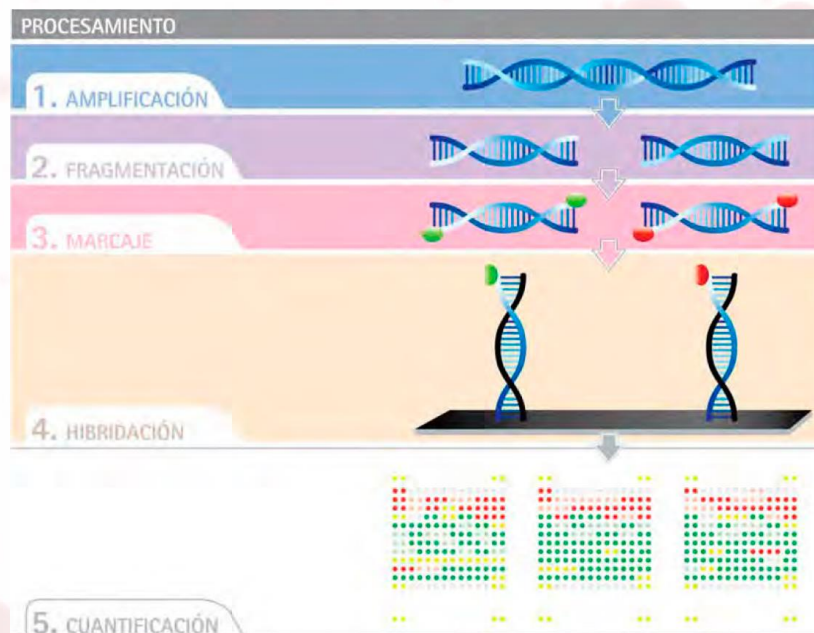


Fuente: BioArray HPA BeadChip. Extended Platelet Antigen Typing by DNA Analysis. Brochure²⁰

Luminex para Genotipificación



BloodChip[®], otro estuche para genotipificación HPA, utiliza la tecnología Luminex[®]. El ADN genómico es extraído de sangre total anticoagulada, se amplifica y se marca con biotina en una PCR multiplex. Los productos de PCR se desnaturalizan y se hibridan a sondas de oligonucleótidos acopladas a perlas con códigos de color. El ADN hibridado se marca con un conjugado fluorescente y el resultado se detecta en sistema Luminex[®]. Los datos se procesan en el software para obtener resultado de genotipo y predecir el fenotipo para cada uno de los antígenos HPA evaluados en el ensayo.²¹



Fuente: Progenika. PI_ID-HPA RUO_EN_EU_04.Package Insert²¹



Bibliografía

- Funk MK, V, Technical Manual AABB 18Th edition. American Association of Blood Banks (2014).
- E. Muñiz, C. Canals, N. Nogués, Los grupos sanguíneos plaquetarios y su importancia clínica. In: A. Cortes, G. Leon de González, M. Muñoz, S. Jaramillo, Aplicaciones y práctica de la medicina transfusional, 1st ed. Santiago de Cali: GCIAMT, 255-276 (2012).
- J. A. Peterson, J. G. McFarland, B. R. Curtis, R. H. Aster, Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. *Br J Haematol* 161, 3-14 (2013).
- E. Muñiz, importancia clínica de los grupos sanguíneos plaquetarios. *Sociedad Española de transfusión Sanguínea* 23(1), 6-11 (2011).
- IPD - HPA Sequence Database | EBI. Ebi.ac.uk. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa>
- C. Canals, *et al.*, Trombopenia neonatal aloimmune: la importancia de un correcto diagnóstico para futuras gestaciones. *Sociedad Española de transfusión Sanguínea* 23(1), 3-5 (2011)
- S. Chakravorty, I. Roberts, How I manage neonatal thrombocytopenia. *Br J Haematol* 156, 155-162 (2012).
- J. A. Peterson, J. G. McFarland, B. R. Curtis, R. H. Aster, Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. *Br J Haematol* 161, 3-14 (2013).
10. D. C. Risson, M. W. Davies, B. A. Williams, Review of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J Paediatr Child Health* 48, 816-822 (2012).
- Brouk, H. Ouelaa, Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: Advances in Laboratory Diagnosis and Management. *Int J Blood Res Disord* 2, 1-6 (2015).
- A. Brand, Immunological complications of blood transfusions. *Presse Med* 45, e313-324 (2016).
- E. Muñiz, Refratariedad a las transfusiones de plaquetas. *Med Clin (Barc)* 120 (14), 544-549 (2003)
- S. K. Forest, E. A. Hod, Management of the Platelet Refractory Patient. *Hematol Oncol Clin North Am* 30, 665-677 (2016).
- C. D. Josephson, M. I. Castillejo, K. Grima, C. D. Hillyer, ABO-mismatched platelet transfusions: strategies to mitigate patient exposure to naturally occurring hemolytic antibodies. *Transfus Apher Sci* 42, 83-88 (2010).
- K. Ogasawara, J. Ueki, M. Takenaka, K. Furihata, Study on the expression of ABH antigens on platelets. *Blood* 82, 993-999 (1993).
- R. Carr, J. L. Hutton, J. A. Jenkins, G. F. Lucas, N. W. Amphlett, Transfusion of ABO-mismatched platelets leads to early platelet refractoriness. *Br J Haematol* 75, 408-413 (1990).
- M. M. Godin *et al.*, Dangerous universal donors: the reality of the Hemocentro in Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev Bras Hematol Hemoter* 38, 193-198 (2016).
- K. Pavenski, T. E. Warkentin, H. Shen, Y. Liu, N. M. Heddle, Posttransfusion platelet count increments after ABO-compatible versus ABO-incompatible platelet transfusions in noncancer patients: an observational study. *Transfusion* 50, 1552-1560 (2010).
- N. Lachmann, K. Todorova, H. Schulze, C. Schönemann, Luminex(®) and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfus Med Hemother* 40, 182-189 (2013).
- Immucor Gsmms/ BioArray Solutions. BioArray HPA BeadChip. Extended Platelet Antigen Typing by DNA Analysis. Brochure
- Progenika. PI_ID-HPA RUO_EN_EU_04. Package Insert. Revision Date: 03/15/ 2013