



## Aplicación de la Biología Molecular a Inmunohematología

**“Molecular methods in immunohematology are proving to be useful tools to provide the right blood to the right patients”** Denomme G, 2011.

Durante el último siglo la hemaglutinación por sus relativos bajos costos, fácil desempeño, sensibilidad y especificidad ha sido considerada el método estándar para la determinación de antígenos eritrocitarios y el estudio de anticuerpos naturales e irregulares.<sup>1,2,3,4</sup> La técnica se fundamenta en una fase de *sensibilización* que consiste en la unión Antígeno (Ag) –Anticuerpo (Ac) y una fase de *Agglutinación* que permite evidenciar macroscópicamente la aproximación de estos complejos Ag-Ac.<sup>5</sup> Sin embargo la disponibilidad de antiseros para algunos Ag, la fenotipificación y otras pruebas inmunohematológicas en pacientes con Coombs directo positivo, recientemente transfundidos y/o aloinmunizados, así como los resultados falsos negativos o falsos positivos asociados a la expresión débil o parcial de algunos Ag representan sus mayores limitaciones.<sup>1,2,3,4</sup>

Para solventar estas limitaciones, el desarrollo de los conocimientos relativos a los Ag eritrocitarios a través de la biología molecular, han permitido conocer las bases moleculares de los Ag, avanzar en la comprensión de los diferentes polimorfismos que los originan y de una forma indirecta han permitido predecir el fenotipo eritrocitario en aquellos pacientes en los cuales la fenotipificación no es posible,<sup>1,2,3,4,6</sup> por ello *“El impacto de este desarrollo transforma la manera en que es seleccionada la sangre para la transfusión”*.<sup>2</sup>

**Tabla 1. Limitaciones de las pruebas basadas en hemaglutinación**

| Limitaciones de Inmunohematología basada en reacciones hemaglutinación  |
|---|
| <b>Limitaciones Técnicas</b><br><b>Interpretación subjetiva.</b><br><b>Trabajo que implica amplia intervención e ingreso de datos de forma manual.</b><br><b>Muchos de los antiseros empleados no tienen aprobación de la FDA. Los antiseros a menudo son limitados en volumen, poseen baja reactividad o no se encuentran disponibles en el mercado.</b><br><b>Los materiales o reactivos empleados pueden ser potencialmente fuentes de riesgo biológico.</b> |



**Limitaciones Clínicas**

**Tipificación de pacientes que han recibido transfusiones recientes.**

**Tipificación de pacientes con auto-Ac y/o con prueba de antiglobulina directa positiva.**

**No determina la cigosidad en pacientes RhD positivo.**

**Un número reducido de donantes es tipificado para un número reducido de antígenos = limita el registro de fenotipos excepcionales.**

**Los pacientes politransfundidos pueden presentar anticuerpos que enmascaren su propia antigenicidad evitando el serotipaje.**

Fuente/ Adaptado de: Transfusion Medicine Reviews, 22(2): 117-132.<sup>1</sup>

**¿Que es inmunohematología molecular?**

La inmunohematología molecular se refiere a la detección de la base molecular o **Genotipo** de los antígenos eritrocitarios, plaquetarios o de neutrófilos, es decir el conjunto de alelos heredados provenientes de un determinado gen, en lugar de evaluar la presencia/ ausencia del Ag sobre la membrana eritrocitaria, la plaqueta o el neutrófilo, expresión que se denomina **Fenotipo** (producto reconocible de estos alelos dependiendo de la dominancia del gen).<sup>5,6</sup>

**¿Cuáles son los eventos moleculares asociados a la expresión de Ag eritrocitarios?**

Los grupos sanguíneos son polimorfismos, es decir, en una determinada población existen como mínimo dos variantes alélicas de un mismo gen. Los alelos, por tanto, son versiones alternativas de un mismo gen, los cuales difieren entre sí en su secuencia nucleotídica. Los cambios en la secuencia nucleotídica original se producen como consecuencia de mutaciones que puede afectar regiones codificante<sup>1,5,6</sup> (ejem: 676 G>C que determina la expresión de Ag RhE o Rhe), regiones intrónicas (ejem: 109 Ins involucrado en la expresión de Ag Rhc, minúscula) o promotores (-67 T>C en el promotor GATA responsable de la expresión de los Ag Duffy).<sup>6</sup>

Tabla 2. Eventos moleculares asociados a la expresión de los Ags eritrocitarios.

| <b>Eventos moleculares asociados a la expresión de antígenos eritrocitarios</b>                                |
|--|
| Delección de un gen (RhD en población caucásica), exón o un nucleótido (ABO, MNS, Kell, Dombrock entre otros). |
| Conversión de un gen o recombinación de genes (MNS, Rh, Ch/Rg)   |
| Inserción de un nucleótido (Rh, Colton)  |
| Duplicación de un exón (Gerbich)   |
| SNP en regiones codificantes o intrónicas <b>LA MAYORÍA DE LOS SISTEMAS DE GRUPO SANGUINEO.</b>                |

Fuente/ Adaptado de: Transfusion Medicine Reviews, 22(2): 117-132.<sup>1</sup>



Aproximadamente 270 antígenos eritrocitarios serológicamente identificados están relacionados con polimorfismos de un solo nucleótido (SNP del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) que conducen a una **diferencia en un único aminoácido en el Ag del GR**,<sup>1,2,3,4,6</sup> como se ilustra en la siguiente tabla:

**Tabla 3. Diferencia de nucleótidos de Grupos antigénicos**

Common Blood Group Antigens and the Associated Nucleotide Differences.

| ISBT system name (Symbol) number | Target antigen (Target allele)   | ISBT gene name (RefSeqGene)             | Amino acid; Nucleotide change   |
|----------------------------------|--|---|---|
| ABO (ABO) 0 0 1                  | A (ABO*A1)<br>A2 (ABO*A2)<br>B (ABO*B1)  | ABO (NG_006669.1)                       | A (consensus) +21 amino acids (fs); 1061ΔC<br>Arg176Gly; 526C>G Gly235Ser; 703G>A Leu266Met;<br>796C>A Gly268Ala; 803G>C<br>116Stop (fs); 261ΔG   |
| MNS (MNS) 0 0 2                  | O (ABO*O1)<br>M (GYPA*M)<br>N (GYPA*N)<br>S (GPB*S) s (GPB*s)<br>S silenced  | GYPA (NG_007470.2)<br>GPB (NG_007483.1) | Ser20Leu, Gly24Glu ; nt59C>T, 71G>A+72T>G<br>Thr48Met; 143T>C<br>exon 5/6 deletion + fs; 230C>Taa 58-90 deletion; intron 5+5g>t   |
| Rh (RH) 0 0 4                    | D (RHD) D negative (-)<br>C (RHCE*C) C (RHCE*c)<br>E (RHCE*E) e (RHCE*e)<br>V & VS<br>V (VS-)  | RHD (NG_007494)<br>RHCE (NG_009208)     | exon 4 and 7; multiple SNPsno gp; gene deletion (common)<br>no change; intron 2 190 bp insertionSer103Pro; 307T>C<br>Pro226Ala; 676C>G<br>Leu245Val; 733C>G<br>Gly336Cys; 1006G>T<br>His77Arg; 230A>G |
| Lutheran (LU) 0 0 5              | Lu <sup>a</sup> (LU*A)<br>Lu <sup>b</sup> (LU*B)   | LU (NG_007480.1)                        | His77Arg; 230A>G  |
| Kell (KEL) 0 0 6                 | K (KEL*01) k (KEL*02)<br>Kp <sup>a</sup> (KEL*03)<br>Kp <sup>b</sup> (KEL*04)<br>Js <sup>a</sup> (KEL*06)<br>Js <sup>b</sup> (KEL*07)        | KEL (NG_007492.1)                       | Met193Thr; 578T>C<br>Trp281Arg; 841T>C<br>Pro597Leu; 1790C>T  |
| Duffy (FY) 0 0 8                 | Fy <sup>a</sup> (FY*A)<br>Fy <sup>b</sup> (FY*B)<br>Fynull (FY)  | FY (NG_011626.1)                        | Gly42Asp; 125G>A<br>No protein; -67t>c (no transcript)<br>Asp280Asn; 838G>A   |
| Kidd (JK) 0 0 9                  | Jk <sup>a</sup> (JK*A)<br>Jk <sup>b</sup> (JK*B)   | JK (NG_011775.1)                        | Asp280Asn; 838G>A   |
| Diego (DI) 0 1 0                 | Di <sup>a</sup> (DI*A) Di <sup>b</sup> (DI*B)  | DI (NG_007498.1)                        | Leu854Pro; 2561T>C  |
| Yt (YT) 0 1 1                    | Yt <sup>a</sup> (YT*A) Yt <sup>b</sup> (YT*B)  | YT (NG_007474.1)                        | His353Asn; 1057C>A  |
| Scianna (SC) 0 1 3               | Sc1 (SC*01) Sc2 (SC*02)  | SC (NG_008749.1)                        | Gly57Arg; 169G>A  |
| Dombrock (DO) 0 1 4              | Do <sup>a</sup> (DO*A) Do <sup>b</sup> (DO*B)<br>Hy (HY)<br>Jo <sup>a</sup> (JO)   | DO (NG_007477.1)                        | Asp265Asn; 793A>G<br>Gly108Val; 323G>T<br>Thr117Ile; 350C>T   |
| Colton (CO) 0 1 5                | Co <sup>a</sup> (CO*A) Co <sup>b</sup> (CO*B)  | CO (NG_007475.1)                        | Ala45Val; 134C>T  |
| Landsteiner-Wiener (LW) 0 1 6    | LW <sup>a</sup> (LW*A)<br>LW <sup>b</sup> (LW*B)   | LW (NG_007728.1)                        | Gln70Arg; 308A>G  |
| Cromer (CR) 0 2 1                | Cr <sup>a</sup> (CR*A)   | CROM (NG_007465.1)                      | Ala193Pro; 679G>C   |
| Knops (KN) 0 2 2                 | Kn <sup>a</sup> (KN*A) Kn <sup>b</sup> (KN*B)<br>McC <sup>a</sup> (KN*03)<br>McC <sup>b</sup> (KN*06)<br>Sl <sup>a</sup> (KN*04) Vil (KN*07) | KN (NG_007481.1)                        | Val1561Met; 4681G>A<br>Lys1590Glu; 4768A>G<br>Arg1601Gly; 4801A>G   |

**Fuente:** Transfusion and apheresis science 44: 53-63.



## Utilidad de la Inmunohematología Molecular en Bancos de Sangre y Servicios Transfusionales

La genotipificación eritrocitaria ha permitido subsanar limitaciones de la tipificación serológica y su utilidad ha sido demostrada en la experiencia recogida en los últimos años en bancos de sangre de referencia en el ámbito mundial (Banc De Sang I Teixits Barcelona, Hemocentro de Campiñas en Brasil, Banco de Sangre de New York, entre otros) y servicios de transfusión, especialmente en el manejo transfusional de pacientes con anemia de células falciformes y  $\beta$ - Talasemia.

**Tabla 4. Utilidad del uso de técnicas moleculares en inmunohematología**

|  |
|--|
| <p><b>Centros De Donación</b><br/><b>Genotipificación de Glóbulos Rojos:</b><br/>Productos genotipados para población especial de pacientes<br/>Productos para pacientes con múltiples aloanticuerpos.<br/>Genotipo para donantes RHD- Negativos.<br/>Bases de datos y/o componentes con fenotipos excepcionales.<br/><b>Genotipificación de Antígenos Plaquetarios HPA</b><br/><b>Genotipificación de Antígenos Leucocitarios HNA</b></p>   |
| <p><b>Laboratorio de Referencia</b><br/>Elaboración Reactivos celulares para detección de Ac anti eritrocitarios.<br/>Genotipificación para determinar cigocidad de alelos eritrocitarios.<br/>Resolución de discrepancias / reacciones serológica inusuales.<br/>Genotipificación con el fin de predecir la presencia o ausencia de antígeno para los cuales no hay antisueros disponibles.<br/>Determinar si un Ac es Auto-Ac o Alo-Ac.</p>  |
| <p><b>Servicios de Transfusión</b><br/><b>Genotipificación de pacientes</b><br/>Pacientes recién transfundidos.<br/>Pacientes con Auto-Ac<br/>Genotipificación Ag D en pacientes para predecir la necesidad de inmunoprofilaxis (Rhlg) o Productos RhD negativos.<br/><b>Proveer productos genotipificados para pacientes con:</b> Anemia de células faciformes, enfermedades hematológicas, talasemias, anemia hemolítica autoinmune, pacientes que requieren terapia transfusional por su patología de base.<br/><b>Pruebas Prenatales</b><sup>8,9</sup><br/>Determinar el grupo sanguíneo fetal.<br/>Determinar la presencia del Gen RhD, predecir el genotipo y por lo tanto predecir la cigocidad del alelo.<br/>Determinar la cantidad de sangre fetal en circulación materna.<br/>Determinar probabilidad de isoimmunización además de ser soporte en el cálculo de la dosis de inmunoglobulina Anti D.</p> |

**Fuente/ Adaptado de:** Transfusion Medicine Reviews, 22(2): 117-132.<sup>1</sup>



La utilidad de estas pruebas en el contexto transfusional y clínico se puede evidenciar en el estudio de *Wilkinson y colaboradores* en 2012<sup>7</sup>, en el que se demuestra que la información suministrada por las técnicas moleculares tiene un impacto directo en la selección de GR para pacientes con anemia de células falciformes y el manejo del inventario de GR disponibles en el banco de sangre. En el modelo propuesto por el estudio se estratifican 3 niveles de acuerdo a los Ag tenidos en cuenta para la compatibilización, a partir del nivel medio se realiza análisis de la media de unidades disponibles teniendo en cuenta o no la información de la mutación en el promotor GATA (caja GATA), que permite identificar individuos fenotipo Fy(a-b-) que podrían recibir unidades Ag Duffy positivo debido a que la mutación del promotor trunca la expresión de los Ag exclusivamente en los eritrocitos, sin afectar la expresión en otras células como el endotelio de vénulas capilares, epitelio de túbulos renales y células de Purkinje, por lo cual el riesgo de formar Ac dirigidos contra estos Ag es reducida. Adicionalmente en el modelo todo paciente con anemia de células falciformes (SCD, del inglés Sickle cell disease) que curse con auto- anticuerpos de tipo caliente (WAA, del inglés Warm auto- antibody) se compatibiliza con el nivel más alto que contempla los Ag de los sistemas ABO, Rh, Duffy, Kidd y los Ag S y s.

Los algoritmos para realizar la compatibilización se ilustran en la siguiente grafica:

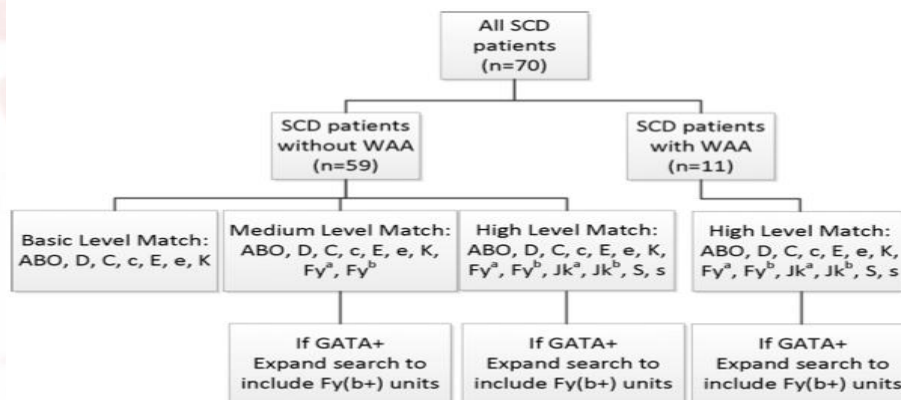


Fig. 1. RBC inventory query matching algorithm for SCD patients. WAA = warm autoantibody.

**Grafica 1. Fuente:** Transfusion 52: 381-388.<sup>7</sup>

A continuación se plasman los resultados obtenidos en cada uno de los niveles de compatibilización, expresados como la media de unidades disponibles para el manejo tranfusional de pacientes SCD teniendo en cuenta o no la información suministrada por la mutación de GATA:



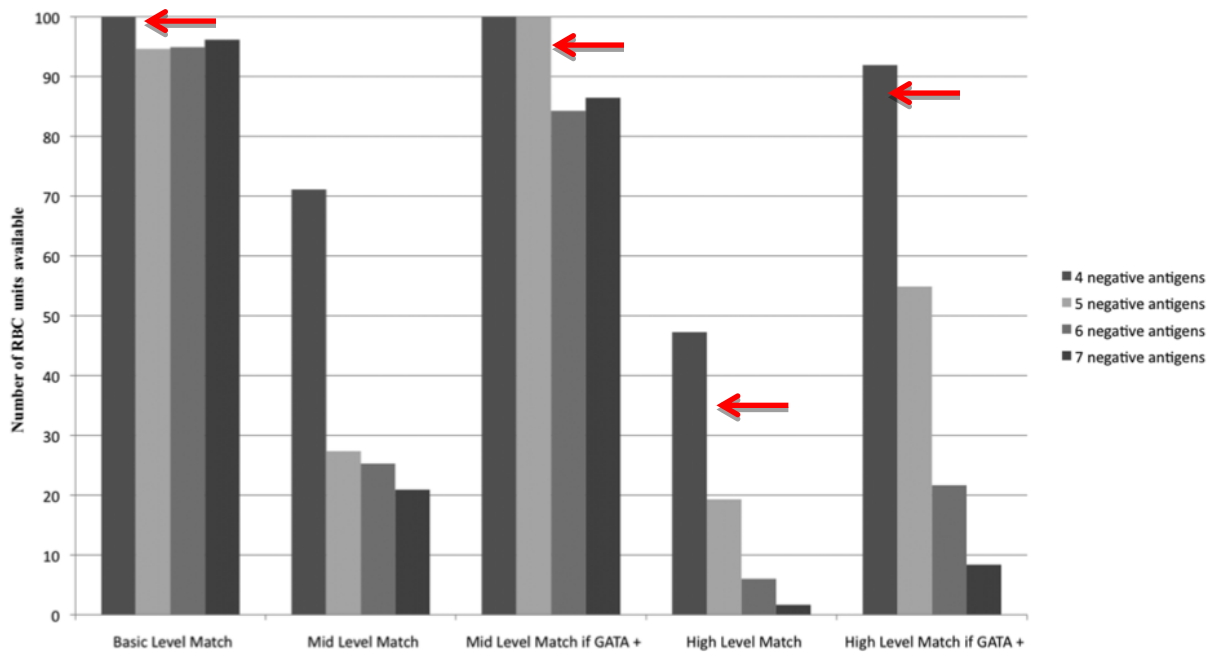
**Tabla 5. Promedio de GR disponibles acorde con el n**

**TABLE 3. Mean number of RBC components available in PSBC's inventory by RBC antigen match level and by SCD patient characteristics**

|  | Basic-level match,<br>ABO, D, C,<br>c, E, e, K | Mid-level match,<br>ABO, D, C, c, E,<br>e, K, Fy <sup>a</sup> , Fy <sup>b</sup> | High-level match,<br>ABO, D, C, c, E, e, K,<br>Fy <sup>a</sup> , Fy <sup>b</sup> , JK <sup>a</sup> , JK <sup>b</sup> , S, s |
|--|--|---|---|
| All patients (n = 70)  | 96.2 (37-100)                                  | 34.0 (1-100)  | 16.3 (0-100)  |
| All patients; if GATA+, then Fy(b+) components allowed                 | N/A  | 90.4 (11-100)   | 37.4 (0-100)  |
| With five negative antigens  | 94.6 (41-100)                                  | 27.4 (11-100)   | 19.3 (5-71)   |
| With five negative antigens; if GATA+, then Fy(b+) components allowed  | N/A  | 100 (100-100)   | 54.9 (29-100)   |
| With six negative antigens   | 94.9 (37-100)                                  | 25.3 (1-82)   | 6.0 (0-16)  |
| With six negative antigens; if GATA+, then Fy(b+) components allowed   | N/A  | 84.3 (11-100)   | 21.7 (0-37)   |
| With negative antigens   | 96.2 (54-100)                                  | 20.9 (10-82)  | 1.6 (0-3)   |
| With seven negative antigens; if GATA+, then Fy(b+) components allowed | N/A  | 86.4 (54-100)   | 8.4 (0-11)  |

Data are reported as mean (range). Inventory size is approximately 4300 with approximately 335 antigen-typed products.

**Fuente:** Transfusion 52: 381-388.<sup>7</sup>



**Fig. 2. Mean number of available RBC components reported by the number of negative antigens per SCD patient. The three match**

**Grafico 2. Fuente:** Transfusion 52: 381-388.<sup>7</sup>



En la tabla 5 y grafico 2 se puede evidenciar que incluyendo la información obtenida por técnicas moleculares se obtienen aproximadamente la misma media de unidades disponibles en el nivel medio que las obtenidas en el nivel básico, denotando que se puede suministrar componentes con un grado mayor de compatibilidad sin afectar la cantidad de GR disponibles. Esta información puede contextualizarse en disminución en la prevalencia de aloinmunización y/o de RHT. Adicionalmente identificar individuos con mutación en la caja GATA permitió incluir en los algoritmos de compatibilización unidades Fy(b+), incrementando la cantidad de unidades disponibles en los niveles medio y alto (incremento de aproximadamente 30 unidades disponibles en el nivel medio comparado con el mismo nivel sin incluir la información suministrada sobre la presencia de la mutación en la caja GATA). Aunque en el estudio no se evalúa dentro de los dentro de los algoritmos de compatibilización, se discute la utilidad de las técnicas moleculares al poder predecir la presencia del alelos híbridos como el *RHD\*DIlla-CE(4-7)-D* del sistema Rh, el cual puede estar ligado a la expresión de Ag C alterado. Los pacientes con este alelo pueden ser fenotipificados como Ag C positivo por las técnicas serológicas tradicionales, pero pueden formar Anti C si son expuestos a un Ag C “convencional”.

De este modo las técnicas moleculares permiten obtener información adicional a la suministrada por las técnicas serológicas convencionales incrementando la cantidad de unidades disponibles para compatibilización en un nivel mayor al tradicional ABO y RhD, a su vez permiten identificar individuos con fenotipos de Ag parciales como los del Rh, que requieren unidades Ag negativo a pesar que su fenotipo puede ser interpretado como positivo, además estas técnicas permiten predecir el fenotipo eritroictario en aquellos pacientes que no pueden ser fenotipificados como es el caso de los pacientes con antecedentes transfusionales recientes y aquellos que tienen una prueba de Coombs directa positiva.

### **Implementación de técnicas moleculares en inmunohematología**

La implementación de las pruebas moleculares puede contextualizarse en dos escenarios: centros de donación y servicios de transfusión.

El modelo de implementación plateado por *Hiller* y colaboradores en 2008<sup>1</sup> incluye el desarrollo de bases de datos y validación del método de genotipificación como etapas iniciales en los dos centros (de donación y servicio de transfusión) y finaliza con la



provisión de productos (genotipados/fenotipados) para pacientes con indicación de transfusión de GR fenotipo compatible.

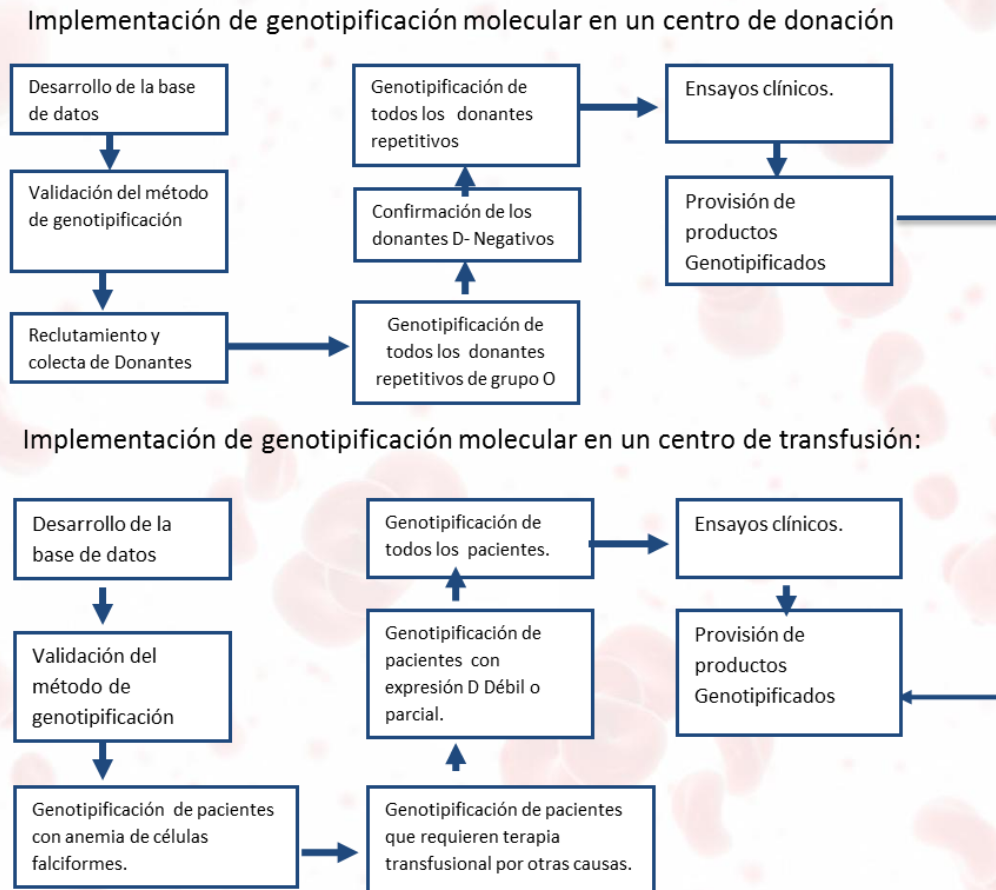
Para los servicios de transfusión la creación de bases de datos ayuda en la tarea de recopilar la información de pacientes aloinmunizados, información detallada de anticuerpos identificados y la suministrada por genotipificación molecular de antígenos.

El primer grupo de pacientes que se incluyen en el modelo son pacientes con anemia de células falciformes (pacientes con mayor prevalencia de aloinmunización, en muchas situaciones no es factible realizar la determinación de fenotipo eritrocitario y la patología tiene indicación absoluta la transfusión de GR rojos fenotipo compatible desde el diagnóstico), luego de estos pacientes se proyecta la genotipificación a otros grupos de pacientes dependientes de transfusión, seguida de la genotipificación Ag RhD en los pacientes con expresión débil del Ag y por último la genotipificación en la población general de pacientes, posterior a ello se plantea la eliminación de las pruebas pre-transfusionales (en el contexto internacional, ya que de acuerdo a la legislación vigente, Resolución 0901 de 1996 estas pruebas son de obligatorio cumplimiento en Colombia) y culmina con la provisión de productos “genotipo compatible”<sup>3,4,5,6</sup>.

En los centros de donación la genotipificación eritrocitaria permite establecer bases de datos de donantes con fenotipos excepcionales e incluso plantea la perspectiva de preservación de estos componentes en inventarios especializados en el banco de sangre, disminuir repeticiones ocasionadas por discrepancias serológicas o expresiones débiles de antígeno además de brindar sangre con mayor cantidad de antígenos comunes para reducir el riesgo de aloinmunización en pacientes. Las fases de implementación constituyen desarrollo de una base de datos de donantes, fase de validación, reclutamiento de donantes, genotipificación de todos los donantes repetitivos Grupo O (por ser el donante universal teniendo en cuenta la compatibilidad mayor), confirmación RhD en donantes, genotipificación de todos los donantes repetitivos, ensayos clínicos y provisión de productos “genotipo compatible”<sup>3,4,5,6</sup>.



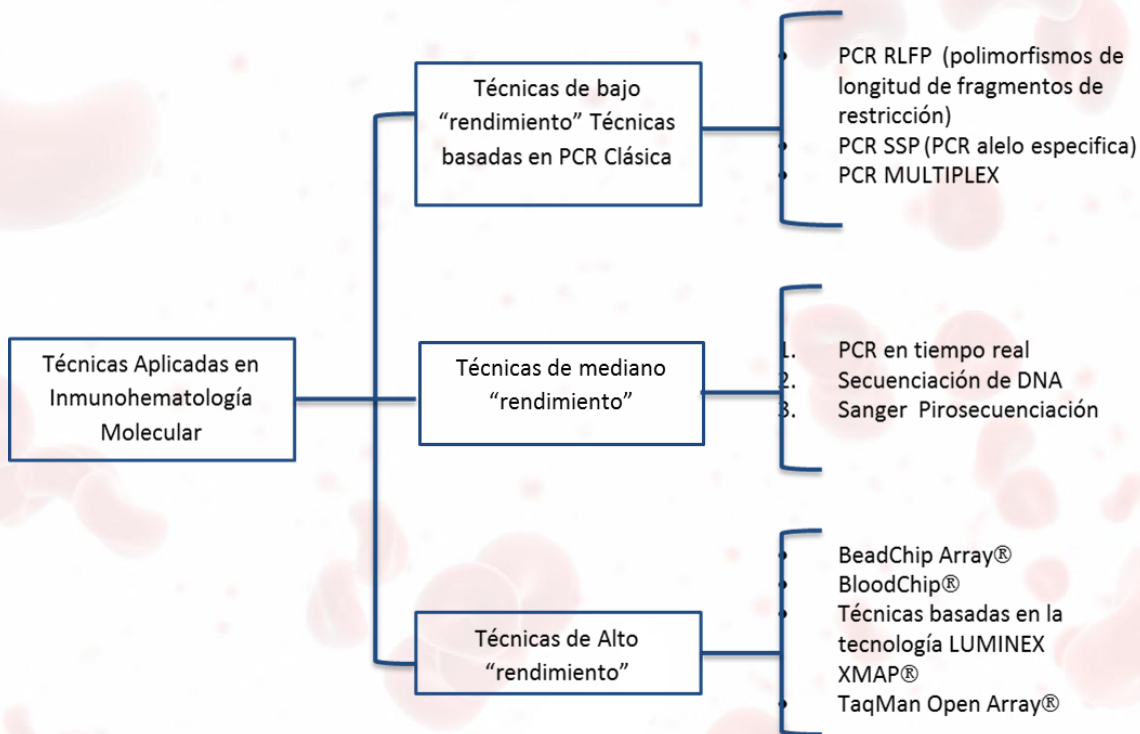
**Grafico 4.** Implementación de genotipificación molecular



**Adaptado de:** Transfusion Medicine Reviews, 22(2): 117-132.<sup>1</sup>

## Técnicas Aplicadas a la Inmunohematología Molecular

Los métodos moleculares disponibles para la genotipificación eritrocitaria han sido categorizados de acuerdo a la cantidad de muestras que se pueden procesar simultáneamente, característica denominada rendimiento. A continuación se enumeran las principales técnicas empleadas que se encuentran disponibles en el mercado:<sup>10</sup>



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hillyer CD, Shaz BH, Winkler AM, Reid M. (2008). Integrating Molecular Technologies For Red Blood Cell Typing And Compatibility Testing Into Blood Center And Transfusion Services. *Transfusion Medicine Reviews*, 22(2): 117-132.
2. Westhoff C, Sloan S (2008). Molecular Genotyping In Transfusion Medicine. *Clinical Chemistry* 54(12): 1948-1950.
3. Anstee DJ. (2009). Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood* 114(2): 248-256.
4. Manfroi S, Pagliaro P. (2014). Patients and donors blood group genotyping for an efficient blood therapy. *Blood Transfusion* 12(1): 305-307.
5. Tyler, V (2001). Manual Técnico AABB 13ª Edición. Buenos Aires Argentina: Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología. American Association of Blood Banks. Technical Manual 25 THE EDITIONS.



6. Denomme GA. (2011). Molecular basis of blood group expression. *Transfusion and apheresis science* 44: 53-63.
7. Wilkinson K, Harris S, Gaur P, Haile A, Armour R, Teramura G, Delaney M (2012). Molecular blood typing augments serologic testing and allows for enhanced matching of red blood cells for transfusion in patients with sickle cell disease. *Transfusion* 52: 381-388.
8. Lo YM. (2012). Fetal nucleic acids in maternal blood: the promises. *Clin Chem Lab Med* 50(6):995–998.
9. Benachi A, Delahaye S, Leticee N, Jouannic JM, Ville Y, Costa JM. (2012) Impact of non-invasive fetal RhD genotyping on management costs of rhesus-D negative patients: results of a French pilot study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 162(1): 28–32.
10. Monteiro F, Tavares G, Ferreira M, Amorim A, Bastos P, Rocha C, Araújo F, Cunha-Ribeir LM (2011). Technologies involved in molecular blood group genotyping. *ISBT Science Series* 6: 1-6.