

## Conferencia Plenaria en el XIV Congreso Argentino de Medicina Transfusional 2013 La reacción Antígeno – Anticuerpo en Inmunohematología

Dr. Alisson dos Santos, José\*

### Introducción

La inmunohematología define la compatibilidad transfusional en base estructural, es decir, la compatibilidad depende de componentes estructurales de la membrana de los glóbulos rojos, de los anticuerpos y sus interacciones.

Las técnicas serológicas, actualmente disponibles, permiten determinar en alto grado de resolución las interacciones entre células y anticuerpos.

En casos particulares, donde el fenotipaje se queda difícil, se pueden utilizar herramientas de biología molecular para determinación de los genes responsables por la producción de los antígenos de grupos sanguíneos, o sea, deducir el fenotipo a partir del genotipo.

Discutiremos aquí, las reacciones "in vitro" entre antígenos de grupos sanguíneos contra anticuerpos y el fenómeno de hemaglutinación que constituye la base de casi todas las técnicas aplicadas en la serología de los grupos sanguíneos.

### Estructura y origen de los anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas producidas por linfocitos B, presentes en el plasma y en los fluidos extracelulares de todos los mamíferos y en las membranas de los linfocitos B, donde actúan como receptores para antígenos.

Hay cinco clases de inmunoglobulinas definidas por el tipo de cadena pesada presente en su estructura y son denominadas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

La unidad básica de los anticuerpos humanos está abajo representada por una molécula de inmunoglobulina de clase IgG y es constituida por dos secuencias largas denominadas cadenas pesadas y dos secuencias denominadas cadenas ligeras. Puentes disulfuro al largo de las cadenas peptídicas mantienen la estructura espacial de la inmunoglobulina y promueven la unión entre estas cadenas (Gráfico 1).

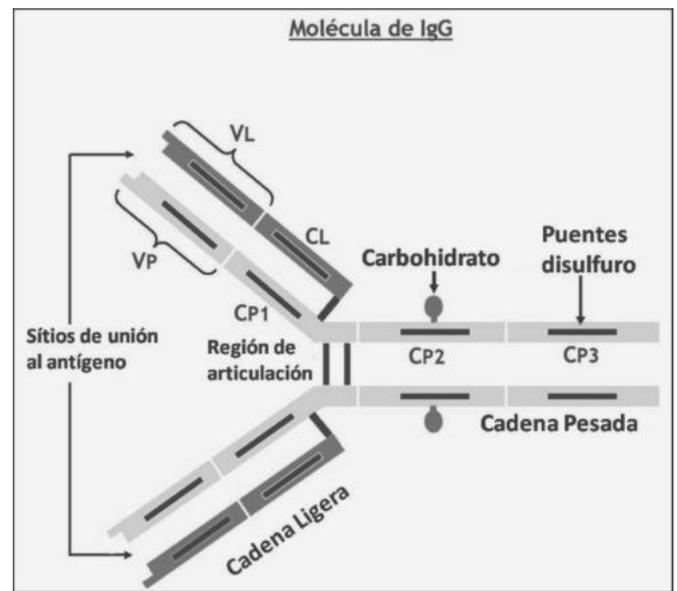


Gráfico 1. Inmunoglobulina G – Monómero.

Las secuencias peptídicas de las regiones constantes de las cadenas ligeras y pesadas (CL, CP1-CP2-CP3) constituyen la fracción "Fc" común a todos los anticuerpos humanos y que pueden ser reconocidas por los macrófagos con receptores de "Fc". Las secuencias peptídicas de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas (VL, VP) forman los sitios de unión a los antígenos y son por lo tanto responsables por la especificidad del anticuerpo.

La diversidad de anticuerpos con diferentes especificidades, que constituye el repertorio de respuestas inmunes de un individuo, es heredada genéticamente. Las regiones variables (VP, VL) de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos son productos de una serie de reordenamientos genéticos en el DNA de precursores de los linfocitos B, lo que permite una gran variedad de inmunoglobulinas específicas. Así, la producción de clones de linfocitos B autorreactivos, o sea, productores

\*Asesor del Programa de Desarrollo de Recursos Humanos de la División Nacional de Sangre y Hemoderivados, Ministerio de Salud del Brasil.

de auto-anticuerpos, se vuelve inevitable. Sin embargo, después de la expresión de las inmunoglobulinas de superficie (slg) en los linfocitos B maduros, clones autorreactivos empiezan a ser eliminados por un mecanismo llamado auto-tolerancia.

### Especificidad y Reversibilidad de la Reacción Antígeno-Anticuerpo

La primera característica básica de la reacción antígeno-anticuerpo es la especificidad, representada por una estrecha relación de complementariedad entre las estructuras tridimensionales de las dos moléculas. Esta complementariedad permite la máxima aproximación entre los sitios de unión de las moléculas de antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac). Las fuerzas de interacción molecular en el complejo "Ag-Ac" no son covalentes y, aunque individualmente débiles, en conjunto producen una fuerte energía de cohesión.

Las uniones no covalentes entre el anticuerpo y el antígeno pueden disociarse, demostrando la segunda característica básica de la reacción "Ag-Ac", la reversibilidad. Esta disociación (elución) puede ser hecha por varios procesos: calor, cambio del pH, la fuerza iónica, disolventes orgánicos, etc.

Como se trata de una reacción bimolecular reversible, se puede aplicar la ley de acción de masas y determinar la constante de equilibrio o afinidad en la reacción.



Si (Ag) representa la concentración del antígeno y (Ac) la concentración de anticuerpos, la aplicación de la ley de acción de masas, en equilibrio, nos permite considerar:

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

"K" representa la "constante de equilibrio del sistema" y mide la afinidad del anticuerpo por el antígeno correspondiente. Cuanto mayor es la constante K, mayor es la afinidad del anticuerpo.

### La Reacción Antígeno-Anticuerpo es Exotérmica

La reacción antígeno-anticuerpo es exotérmica, o sea, siempre produce una liberación de calor, que es más negativa cuanto más exotérmica es la reacción. Un anticuerpo que llamamos frío en inmunohematología, tal como el anti-I, libera una gran cantidad de calor en la reacción con su antígeno específico y tiene un rango térmico corto. En este caso, la constante de equilibrio del sistema (K) varía fuertemente en temperaturas de 4 a 37°C y la afinidad del anticuerpo por el antígeno es máxima en baja temperatura (4°C), más débil a 25°C y hasta nula a 37°C. La aglutinación de los glóbulos rojos producida por anticuerpos fríos es mejor visible a 4°C.

Un anticuerpo típicamente caliente, como el anti-RhD, libera una pequeña cantidad de calor en la reacción con su antígeno específico y tiene un rango térmico amplio. En este caso, la variación de la constante de equilibrio del sistema (K) es muy baja y la afinidad del anticuerpo por el antígeno varía poco en reacciones de 4°C a 37°C y la aglutinación de los glóbulos rojos es mejor visible a 37°C.

### La Aglutinación de los Glóbulos Rojos

Si producimos ciertos cambios físico-químicos en suspensiones de partículas de coloides o de células como bacterias o glóbulos rojos, estas suspensiones pierden la estabilidad y los coloides o células se aglutinan, formando grumos a los cuales llamamos "aglutinatos".

La aglutinación de glóbulos rojos en suspensiones fisiológicas puede ocurrir por dos mecanismos básicos: específico e inespecífico.

#### • Aglutinación específica

Sabemos que los glóbulos rojos permanecen en suspensión en solución salina fisiológica (NaCl 0,85%). Esta estabilidad puede ser cambiada por la introducción de anticuerpos específicos que se fijan en antígenos de la membrana eritrocitaria, produciendo la aglutinación de estas células.

Por un modelo conocido como "teoría de los puentes", las moléculas de anticuerpos son capaces de fijarse sobre sitios antigénicos de células adyacentes formando puentes entre ellas. La aglutinación se produce cuando un número grande de células haya sido atrapado en la red creada. Por este modelo, la mejor actividad aglutinante de los anticuerpos de clase IgM está ligada a su estructura pentamérica que es capaz de hacer puentes entre más de dos células. Veremos que esta concepción es incompleta y que resulta de una simple analogía con los fenómenos de precipitación de antígenos solubles. La "teoría de los puentes" es un modelo simplista del fenómeno de aglutinación de glóbulos rojos en suspensión y no permite comprender los ejemplos de aglutinaciones inespecíficas, o sea, en la ausencia de anticuerpos.

#### • Aglutinación inespecífica

Este fenómeno es conocido como "panaglutinación" y corresponde a la aglutinación de glóbulos rojos producida por otras sustancias, que no son anticuerpos, cuando son añadidas al medio de la suspensión, como: detergentes, sílice coloidal, iones metálicos y macromoléculas (albúmina, polibreno, ficol, dextran). Algunas fito-aglutininas o lecitinas pueden reconocer antígenos de grupos sanguíneos y producir la aglutinación de los glóbulos rojos como los anticuerpos anti-eritrocitarios.

**Procesos físico-químicos de la aglutinación (Potencial Zeta)**

Para la comprensión de los fenómenos de hemaglutinación específica y no específica, necesitamos de un modelo más complejo, con base en procesos físico-químicos, donde el factor más importante a ser considerado es la distancia media que separa los glóbulos rojos en suspensión. Por la adición de anticuerpos u otras sustancias al medio, esta distancia puede ser disminuida hasta un punto crítico en que la aglutinación ocurre.

Los glóbulos rojos se comportan como partículas electronegativas en estudios de migración electroforética. Los grupos carboxílicos de las sialoglicoproteínas de la membrana globular son los mayores responsables por esta electronegatividad.

En medio salino (NaCl 0,85%), iones positivos de sodio (Na<sup>+</sup>) son atraídos cerca de los glóbulos rojos, creando una doble capa de cargas positivas, que genera una fuerte repulsión interglobular.

La nube de iones positivos que involucra cada glóbulo, se vuelve menos densa mientras se aleja del glóbulo. La diferencia de potencial eléctrico creada entre la doble capa de iones positivos (Na<sup>+</sup>) cerca del glóbulo y el medio con iones de sodio y cloruro en equilibrio (neutro), se llama "Potencial Zeta". La fuerza de repulsión entre los glóbulos rojos, en medio salino, depende del valor del potencial zeta (Gráfico 2).

Considerando la carga eléctrica del glóbulo rojo ( $\gamma$ ), la fuerza iónica del medio de la suspensión ( $\mu$ ) y la constante dieléctrica del medio (D), Pollack desarrolló la siguiente expresión del potencial zeta (Z): " $Z = f \{ \gamma, 1/D, 1/\sqrt{\mu} \}$ ", o sea, la diferencia del potencial zeta es una función que varía directamente con la electronegatividad de la membrana eritrocitaria ( $\gamma$ ) e, inversamente con la constante dieléctrica del medio de suspensión (D) y con la raíz cuadrada de fuerza iónica del medio ( $\sqrt{\mu}$ ).

Desde el punto de vista físico-químico, la aglutinación ocurre por la agregación de los glóbulos rojos (aglutinatos), cuando la distancia media entre ellos se reduce hasta un valor mínimo. Esta distancia depende de los valores de dos fuerzas antagónicas: la "tensión interfacial" (fuerza de cohesión), que tiende a agregar los glóbulos rojos y la "fuerza de repulsión", debida a los escudos de cargas positivas creados alrededor de los glóbulos (cargas iguales se repelen). En la ausencia de agentes aglutinantes, la fuerza de repulsión predomina y mantiene la suspensión globular estable en medio salino (Gráfico 3).

La noción de "Potencial Zeta Crítico (Zc)" definida por Abramson, muestra que para valores muy elevados del potencial zeta (en valores absolutos), los glóbulos rojos no se aglutinan, incluso en la presencia de anticuerpos específicos. Disminuyéndose lentamente el potencial zeta del sistema, se constata que la aglutinación ocurre en un valor determinado, que decimos el "Potencial Zeta Crítico" (Gráfico 4).

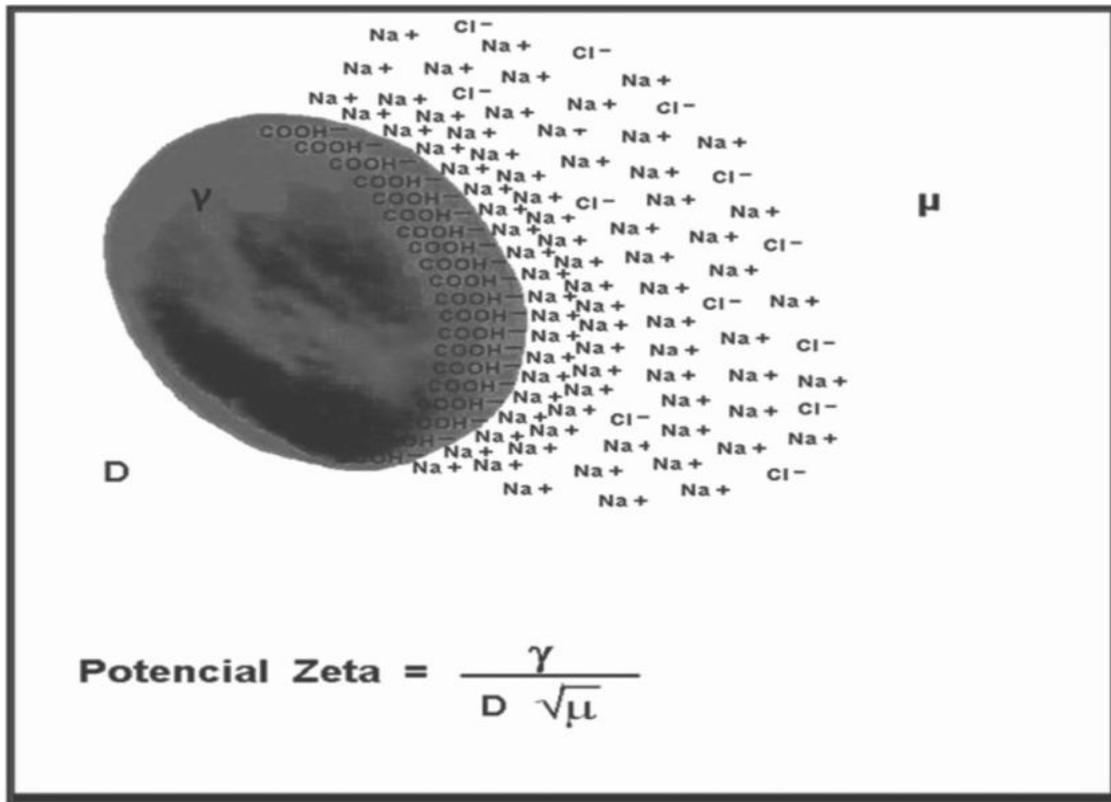
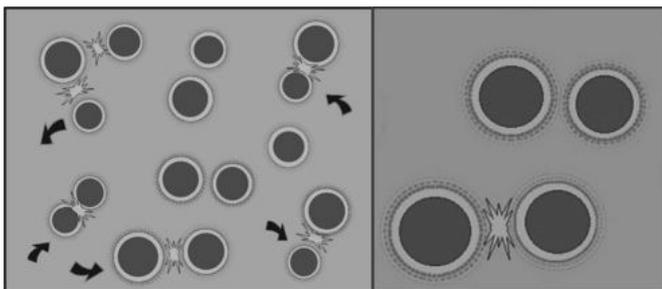


Gráfico 2. Potencial zeta



**Gráfico 3. Suspensión estable de glóbulos rojos. Repulsión > Cohesión.**



**Gráfico 4. Potencial zeta crítico. Cohesión > Repulsión.**

El potencial zeta de un sistema puede ser cambiado de dos maneras:

- Por la reducción de la carga eléctrica de la membrana globular:

Incluimos en esta categoría, los efectos debidos al tratamiento de los glóbulos rojos con enzimas proteolíticas, que sacan fragmentos de glicoproteínas de la membrana, reduciendo su electronegatividad y al efecto de la fijación de anticuerpos sobre la membrana eritrocitaria.

- Cambios en la composición del medio:

Son los efectos debidos a los cambios de la fuerza iónica y de la constante dieléctrica del sistema.

La aglutinabilidad de un sistema es más alta mientras más bajo sea el valor del potencial Zeta. Pollack así relacionó los términos de su ecuación:

$$Z = \frac{\gamma}{D \sqrt{\mu}}$$

Esta ecuación nos muestra que el potencial Zeta puede bajar y aumentar la aglutinabilidad del sistema, o hasta promover la aglutinación de los glóbulos rojos en suspensión, si el potencial zeta crítico ( $Z_c$ ) es alcanzado, en tres condiciones:

- si la carga eléctrica del glóbulo rojo ( $\gamma$ ) disminuye.
- si la constante dieléctrica ( $D$ ) del sistema aumenta.
- si la fuerza iónica del medio ( $\mu$ ) aumenta.

Las condiciones mencionadas son los principales parámetros utilizados para la comprensión de las reacciones de aglutinación y de los métodos de producción de aglutinaciones utilizados en los laboratorios de inmunohematología.

## El potencial zeta crítico ( $Z_c$ ) y las clases de anticuerpos

Pollack explicó en bases físico-químicas las diferencias de comportamiento de los anticuerpos de clase IgG y de clase IgM en la aglutinación de los glóbulos rojos, cuando reaccionan con antígenos de grupos sanguíneos.

Se estima en -15 mV (mV= mili-volts), el potencial zeta de una suspensión de glóbulos rojos RhD positivos en NaCl 0,85%.

Por el ajuste de la fuerza iónica ( $\mu$ ) y/o de la constante dieléctrica ( $D$ ) del medio de la suspensión, se puede hacer variar el valor del potencial Zeta del sistema y, mismo en la ausencia de anticuerpos anti-RhD, se observa que los glóbulos rojos tienden a aglutinarse, espontáneamente, cuando se alcanza el potencial Zeta crítico ( $Z_c$ ) alrededor de -7 mV. Este valor para el potencial zeta crítico, donde una aglutinación inespecífica de los glóbulos rojos ocurre, no varía con diferentes suspensiones celulares y, debido a esto, permite evaluar el valor de la "tensión interfacial" (fuerza de cohesión) entre glóbulos rojos en suspensión salina (NaCl 0,85%).

Podemos rehacer los mismos ajustes anteriores, en la presencia de anticuerpos anti-RhD de las clases IgG e IgM.

Suspensiones de glóbulos rojos RhD positivos fueron tratadas con anticuerpos anti-RhD de las clases IgG e IgM y después los valores del potencial zeta de cada suspensión fueron cambiados, para la determinación del potencial Zeta crítico ( $Z_c$ ) de cada sistema. El valor del zeta crítico ( $Z_c$ ) para las suspensiones tratadas con anti-RhD de clase IgM, es alrededor de -18 hasta -23 mV, mientras que aquellas tratadas con anti-RhD de clase IgG, es alrededor de -8 hasta -10 mV.

Como el potencial Zeta crítico ( $Z_c$ ) de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados por anticuerpos anti-RhD (IgM) es superior, en valor absoluto, al de la propia suspensión en NaCl al 0,85%, estos anticuerpos producen aglutinación en medio salino y son dichos "aglutinantes".

Al contrario, el potencial Zeta crítico ( $Z_c$ ) en la presencia de anticuerpos anti-RhD de clase IgG, siendo inferior al de la suspensión en NaCl 0,85%, la aglutinación de los glóbulos rojos no ocurre en medio salino y estos anticuerpos son dichos "no aglutinantes".

La ventaja de las moléculas de IgM sobre las de IgG está ligada a su peso molecular y a su estructura pentamérica, mejor adaptada a la función aglutinante.

## Influencia de los antígenos en la aglutinación de los glóbulos rojos

La aglutinación de los glóbulos rojos, en una suspensión, no está relacionada simplemente con las clases de los anticuerpos, sino también, con el número y ubicación de los sitios antigénicos.

Anticuerpos anti-A de clase IgM, por ejemplo, aglutinan glóbulos rojos  $A_1$  o  $A_2$  en suspensión de NaCl 0,85%, pero no aglutinan glóbulos  $A_m$ . De la misma manera, anticuerpos anti-RhD, de clase IgG, no aglutinan glóbulos RhD positivos en suspensión de NaCl 0,85%,

pero aglutinan glóbulos del fenotipo D—/D—, una variante rara del sistema Rh que presenta un número más alto de sitios antigénicos en la membrana.

El número de antígenos es responsable por las diferencias de comportamientos de los anticuerpos anti-A y anti-RhD en presencia de glóbulos rojos  $A_m$  y D—/D—, respectivamente. Los glóbulos  $A_m$  poseen un número de sitios antigénicos "A" alrededor de 1.000 receptores por membrana, mientras que los glóbulos  $A_1$  poseen alrededor de 1.000.000. Los fenotipos RhD más comunes poseen entre 10.000 hasta 30.000 sitios por membrana, mientras que el fenotipo D—/D— posee alrededor de 100.000.

Existe una relación clara entre aglutinabilidad de los glóbulos rojos y el número de sitios antigénicos presentes en la membrana. Existe un número crítico de antígenos para la producción de aglutinación, cuyo valor depende del sistema de grupo sanguíneo estudiado y de las condiciones experimentales.

En el sistema ABO, el número crítico de antígenos "A" es alrededor de 2.000 hasta 3.000 receptores por célula, lo que explica el hecho de que no se produzcan aglutinaciones directas con los glóbulos " $A_m$ ".

La ubicación de los antígenos en la membrana del glóbulo rojo es otro factor importante en la reacción de aglutinación. Los antígenos pueden estar total o parcialmente involucrados (cripto-antígenos) e inaccesibles a los anticuerpos. El ejemplo más conocido es el antígeno "T" que normalmente no es reactivo en glóbulos íntegros, pero que después de la acción de enzimas proteolíticas bacterianas (pacientes con septicemia), quedan accesibles y poliaglutinables, toda vez que los sueros humanos contienen auto-anticuerpos anti-T.

### Técnicas de producción de la aglutinación de glóbulos rojos

Los anticuerpos considerados "no aglutinantes" se fijan sobre las membranas de los glóbulos rojos sin producir aglutinación. Por esto, la visualización de las reacciones de estos anticuerpos con sus respectivos antígenos, depende de artificios técnicos para producción de aglutinación.

En inmunohematología, estas técnicas son esenciales en la detección e identificación de alo-anticuerpos anti-eritrocitarios, en el fenotipaje del glóbulo rojo, en el diagnóstico de las anemias hemolíticas auto-inmunes (AHAI) y en el diagnóstico de las enfermedades hemolíticas del recién-nacido (EHRN).

Discutiremos las técnicas más importantes bajo la ecuación de Pollack para el potencial zeta:

#### • Tratamiento de los glóbulos rojos por enzimas proteolíticas

La tripsina, la papaína, la bromelina y la ficina son las principales enzimas proteolíticas utilizadas en las técnicas enzimáticas de aglutinación artificial.

Estas enzimas sacan de la membrana eritrocitaria,

fragmentos peptídicos de glicoproteínas membranares conteniendo moléculas de ácido siálico (electronegativas), disminuyendo la carga negativa de los glóbulos rojos.

Como consecuencia de la disminución de la electronegatividad de los glóbulos, los escudos de iones positivos ( $Na^+$ ), atraídos cerca de las membranas globulares, disminuyen y el valor de la diferencia de potencial eléctrico (potencial zeta) entre estos escudos y el medio de suspensión en equilibrio (neutro), también disminuye. Para valores más bajos del potencial zeta, las suspensiones de glóbulos se quedan más aglutinables.

Como ejemplo, glóbulos rojos RhD positivos tratados por las enzimas proteolíticas citadas pueden ser aglutinados, en medio salino, por anticuerpos anti-RhD de clase IgG (no aglutinantes).

#### • Adición de macromoléculas

Pollack fue el primero en ofrecer un modelo físico-químico de la aglutinación en medio macromolecular, o sea, el rol de la constante dieléctrica (D) del medio de suspensión.

Macromoléculas hidrosolubles como albúmina, PVP, dextran, ficol, PEG, etc, añadidas al medio de suspensión de los glóbulos rojos, aumentan su constante dieléctrica (D). Estas moléculas poseen una extremidad positiva (amínica) y otra negativa (carboxílica) y se polarizan en el campo eléctrico de los glóbulos rojos en suspensión. Una vez que son pesadas, son atraídas cerca de los glóbulos neutralizando sus cargas negativas y promoviendo la dispersión de iones positivos ( $Na^+$ ) cerca de ellos. La disminución de este escudo de cargas positivas, baja el valor del potencial zeta y disminuye la fuerza de repulsión interglobular. Esto está de acuerdo con la ecuación de Pollack, donde el potencial Zeta (Z) es inversamente proporcional a la constante dieléctrica (D) del medio de suspensión.

La albúmina (al 20 – 30%) y el polietilenoglicol (PEG) son los medios macromoleculares más utilizados y su eficacia depende del contenido de polímeros.

Reacciones falso-positivas pueden ser producidas por el propio medio macromolecular, cuando un exceso de polímeros aumenta la constante dieléctrica (D) hasta un punto donde el potencial Zeta crítico (Zc) es alcanzado y el fenómeno de la aglutinación ocurre espontáneamente, aún en la ausencia de anticuerpos (panaglutinación).

Las reacciones falso-positivas pueden ser evidenciadas por la utilización de sueros-control producidos por el mismo fabricante y conteniendo el mismo medio macromolecular de los sueros de clasificación sanguínea. El uso de estos controles es obligatorio por las normas técnicas vigentes.

#### • Cambio de la fuerza iónica del medio

Una concentración muy elevada de ciertos cationes ( $Cr^{3+}$ ,  $Si^{3+}$ ) puede producir una "panaglutinación" de una suspensión de glóbulos rojos no sensibilizados.

Los cationes introducidos en el medio cambia poco

la nube iónica alrededor de los glóbulos, toda vez que la densidad de esta nube de cationes depende de la carga negativa de los glóbulos. Sin embargo, la diferencia de potencial (potencial zeta) disminuye entre los escudos de cargas positivas alrededor de los glóbulos rojos y el medio de suspensión que se queda más iónico por el exceso de cationes, resultando en una disminución de la fuerza de repulsión interglobular.

Esto está en acuerdo con la ecuación de Pollack, donde un aumento de la fuerza iónica ( $\mu$ ) lleva a una disminución del potencial Zeta de la suspensión de glóbulos rojos en NaCl 0,85%, lo que favorece la aparición del fenómeno de aglutinación.

La fuerza iónica desempeña un rol importante en el equilibrio primario de la reacción antígeno-anticuerpo, siendo su efecto manifestado bajo dos aspectos antagónicos. Si un aumento de " $\mu$ " lleva a un aumento de la aglutinabilidad, en la práctica concentraciones iónicas elevadas compiten con los anticuerpos e inhiben su fijación inicial sobre los antígenos, llevando a un efecto inverso al deseado.

Técnicamente, en las reacciones llamadas de dos tiempos (LISS/Coombs), la etapa de sensibilización ocurre en medio isotónico de baja fuerza iónica (LISS), aumentando la fijación inicial de los anticuerpos sobre los antígenos membranares correspondientes (más alta sensibilidad de la reacción), además de reducir el tiempo de incubación. La etapa de revelación de los anticuerpos fijados sobre la membrana eritrocitaria, por la adición de la antiglobulina humana (suero de Coombs), es ejecutada después de una serie de lavados de los glóbulos rojos con salina (NaCl 0,85%) que es un medio de fuerza iónica normal.

En la técnica de "Gel-centrifugación", las reacciones de LISS/Coombs no presentan la etapa de lavados de los glóbulos rojos después de la etapa de incubación. En estos casos, la solución de baja fuerza iónica es cambiada (LISS mod.) por un pequeño aumento de su constante dieléctrica (D), para compensar el efecto de la disminución de la fuerza iónica del medio de la suspensión ( $\mu$ ) sobre el potencial zeta (Z).

Observen que se puede trabajar, al mismo tiempo, en más de una variante de la ecuación del potencial zeta (Z) de Pollack.

#### • Prueba de la antiglobulina humana o prueba de Coombs

La prueba de la antiglobulina humana o prueba de Coombs representa la técnica más importante de aglutinación artificial en inmunohematología.

Por un procedimiento inmunológico, esta reacción nos permite revelar la presencia de anticuerpos "no aglutinantes" en la membrana del glóbulo rojo. Decimos "procedimiento inmunológico", porque los sueros de Coombs son compuestos de anticuerpos contra anticuerpos humanos. Son producidos por la inyección de cadenas leves y pesadas de IgGs humanas en animales (conejos u ovejas), que producen anticuerpos contra las fracciones "Fc" de las inmunoglobulinas humanas.

Estos anticuerpos pueden reconocer cualquier inmunoglobulina humana, por esto en la ejecución de la prueba de Coombs es necesario lavar los glóbulos rojos, después de la etapa de sensibilización (incubación) y antes de la adición del suero de Coombs, con el propósito de remover los anticuerpos libres. Los glóbulos rojos quedan involucrados solamente con los anticuerpos que se ligan específicamente con sus antígenos membranares. En la técnica de "Gel-centrifugación", donde no hay lavados, la separación de los anticuerpos libres de los fijados sobre antígenos membranares ocurre por un gradiente de centrifugación.

Cuando añadimos el suero de Coombs, los anticuerpos antiglobulinas humanas (AGH), se ligan en las fracciones "Fc" de los anticuerpos anti-eritrocitarios fijados en la membrana globular. Considerando su estructura tridimensional, cada fracción "Fc" de un anticuerpo fijado en la membrana globular, puede reaccionar con diversas moléculas de antiglobulinas humanas (AGH). De esta manera queda más grande y más pesado. La capacidad de aglutinación de los anticuerpos de la clase IgG ligados a la AGH es similar a la de los de clase IgM que son naturalmente "aglutinantes" (Gráfico 5).

La sensibilidad de la prueba de Coombs indirecto (PCI) puede ser aumentada por procedimientos que cambian la primera etapa de la reacción, o sea, de la fijación de los anticuerpos durante la incubación. Los más utilizados son: adición de albúmina al 22% (BSA) o polietilenglicol (PEG) al medio, uso de medios de baja fuerza iónica (LISS) y la utilización de glóbulos rojos ya tratados por enzimas proteolíticas.

La adición de albúmina o polietilenglicol (PEG) aumenta la constante dieléctrica (D) del medio de suspensión y baja el valor del potencial zeta (Z), favoreciendo la fijación inicial de los anticuerpos a la membrana eritrocitaria por la disipación de iones positivos cerca de la membrana, sin embargo este procedimiento es menos eficaz que la disminución de la fuerza iónica del medio.

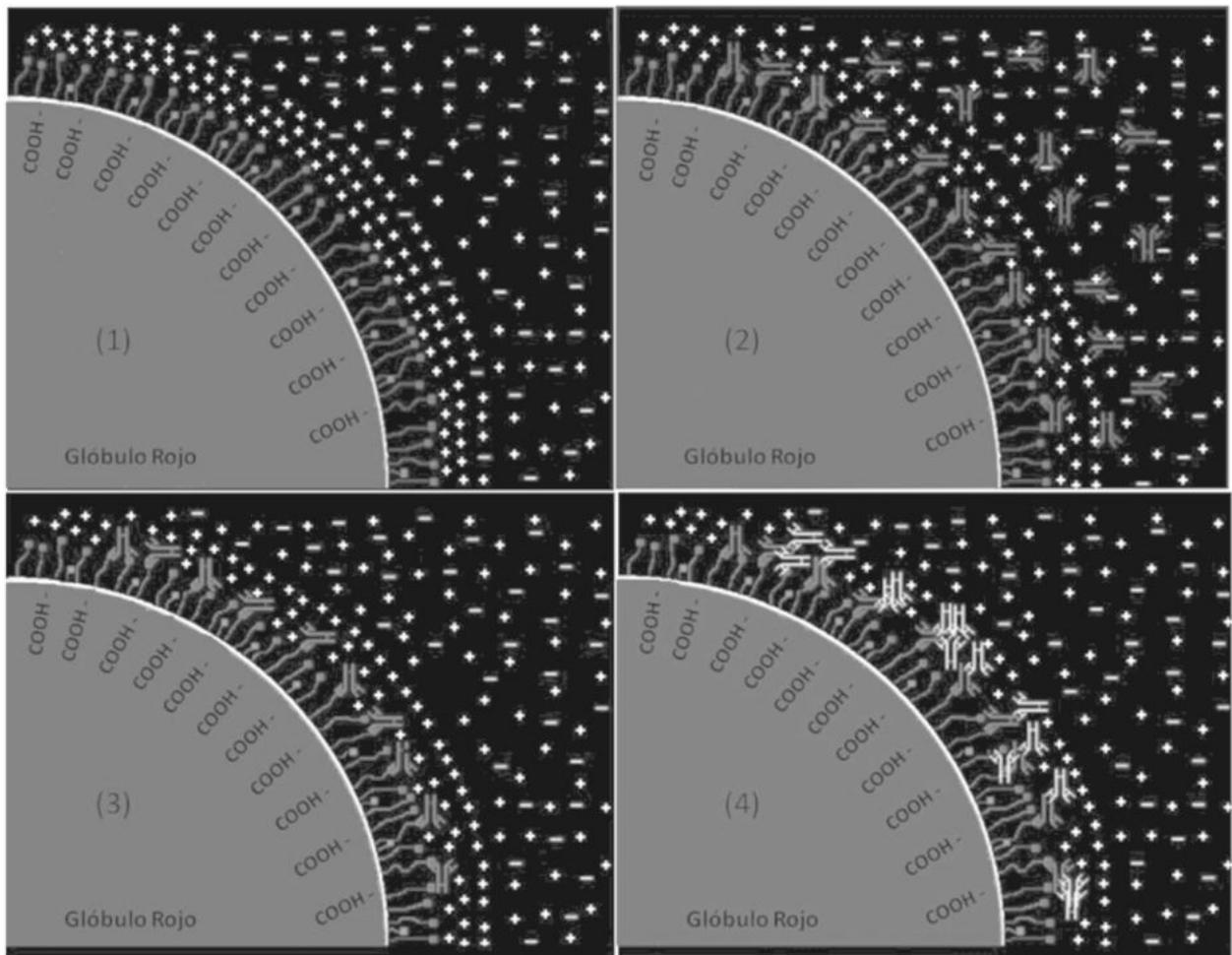
El uso de glóbulos rojos pre-tratados con enzimas proteolíticas (tripsina o papaína) en prueba de Coombs indirecto (PCI), es un procedimiento indicado para mejorar la detección de anticuerpos anti-Kidd.

#### Otros factores que influyen la reacción de hemaglutinación

La temperatura de la reacción y el pH del medio de suspensión influyen la fijación primaria de los anticuerpos sobre sus antígenos y sobre el fenómeno de aglutinación, ya que los dos aspectos de la reacción no son disociables.

Como ya se discutió anteriormente, distinguimos dos temperaturas de reacción: un primer grupo presenta reacciones óptimas en bajas temperaturas y otro grupo presenta reacciones óptimas en temperaturas más elevadas.

Los anticuerpos activos en temperaturas bajas (4°C), también llamados "anticuerpos fríos" corresponden, prin-



**Gráfico 5. Prueba da Antiglobulina Indirecta**

principalmente, a las especificidades anti-I, -H, -A, -B, -AB, -Le, -M, -N y -P<sub>1</sub>. Se trata, normalmente, de anticuerpos naturales regulares o irregulares.

Los anticuerpos llamados "inmunes" reaccionan mejor en 37°C y son, también, llamados "anticuerpos calientes". Este es el caso, por ejemplo, de los anticuerpos de los sistemas Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, Diego, etc.

Los cambios de pH entre 6,0 y 8,0 tienen poca o ninguna influencia sobre la reactividad de los anticuerpos. Fuera de estos límites se puede observar hemólisis de los glóbulos rojos para valores extremos del pH, o una inhibición de la aglutinación debida a una disminución importante de la constante de asociación de los anticuerpos.

### Bibliografía

M.Goudemand, Ch.Salmon. *Immuno-hématologie et Immunogénétique*. Paris: Flammarion Médecine – Sciences.

Ph.Rouger, Ch.Salmon. *La Pratique de l'agglutination des érythrocytes et le test de Coombs*. Paris: Masson,éd.

Ph.Rouger, Ch.Salmon. *La Pratique des Groupes et Groupages Erythrocytaires*. Paris: Masson,éd.

Ph.Rouger, Ch.Salmon. *La Pratique des Allo et Auto-anticorps Anti-Erythrocytes*. Paris: Masson,éd.

B.Genetet, G.Andreu,J.M.Bidet. *Aide Mémoire de Transfusion Sanguine*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences.

Issit PD, Anstee DJ. *Applied blood group serology*. 4th ed. Durham, NC: Montgomery Scientific Publications; 1998.

I.Roitt, J.Brostoff, D.Male. *Imunologia*. 4ª Ed. 1997. Ed. Manole Ltda.

A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2007.

G. Daniels. *Human Blood Groups*. 3th ed. Wiley-Blackwell. *Technical Manual of AABB*; USA: Bethesda, Maryland, 17th ed, 2011.

PL. Mollison, C.P. Engelfriet. M. Contreras. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 10th Edition, Blackwell.

M.K.Moulds. Review: Monoclonal Reagents and Detection of Unusual or Rare phenotypes or antibodies. *Immunohematology*, 2006;22:52–63.