

50
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

**PAPEL DE LOS ANTICUERPOS LINFOCITOTOXICOS
EN LOS NIÑOS RECIEN NACIDOS CON ICTERICIA
ATRIBUIBLE A HEMOLISIS.**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
LAURA ZAVALA BLANCAS



México, D. F.

1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	PAG.
1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCION	3
3.- FUNDAMENTO DEL TEMA	
3.1 Ictericia	5
3.1.1. Ictericia hemolitica	6
3.1.2. Ictericia por obstrucción	6
3.1.3. Ictericia en el recién nacido	6
3.1.4. Enfermedad hemolitica en el recién nacido	8
3.2 Metabolismo de la bilirrubina	
- Producción	11
- transporte y captación hepática de la bilirrubina	12
3.3 Sistema HLA	15
3.3.1. Antigenos HLA en eritrocitos	18
4.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS	21
5.- MATERIALES Y METODOS	22
- Determinación de grupo sanguíneo ABO	29
- Determinación del antígeno Rho (D)	30
- Determinación de hematócrito	31
- Determinación de hemoglobina	32
- Cuenta de reticulocitos	32

- Determinación de bilirrubinas	33
- Prueba de la antiglobulina humana directa	36
- Prueba de linfocitotoxicidad	37
- Prueba de despegado de anticuerpos con cloroformo-tricloroetileno	40
- Búsqueda de anticuerpos irregulares en suero fuera del SABO	41
- Determinación de anticuerpos IgG inmunes anti-A o anti-B	43
- Formación de rosetas con monocitos	45
6.- RESULTADOS	49
7.- DISCUSION DE RESULTADOS	76
8.- CONCLUSIONES	80
9.- BIBLIOGRAFIA	82
10.-APENDICE	86

1.-RESUMEN

La presencia de ictericia ocurre con mucha frecuencia en los recién nacidos, el origen de esta ictericia puede ser debida a diversas causas, una de ellas es la entidad denominada enfermedad hemolítica del recién nacido, la cual se produce cuando la madre forma anticuerpos de tipo IgG que cruzan la barrera placentaria y lesionan los eritrocitos fetales con hemólisis consecutiva.

Los anticuerpos que principalmente causan enfermedad hemolítica del recién nacido son las inmunoglobulinas IgG anti-D, anti-A y anti-B.

Los anticuerpos anti-HLA (linfocitotóxicos) también ocurren en la forma de IgG, y se tienen reportes de la presencia de antígenos HLA en eritrocitos, por lo cual en esta tesis se estudiaron parejas de madre-recién nacido con y sin evidencia de ictericia para determinar si la presencia de anticuerpos anti-HLA es causativa de ictericia en el recién nacido.

De los estudios realizados en ambos grupos, se encontró que tanto en el grupo icterico como en el no icterico hubo presencia de anticuerpos linfocitotóxicos en el suero materno dirigidos contra los linfocitos de su bebé. La frecuencia de estos anticuerpos fue de 16.9 % para el grupo icterico y de 9.1 % para el no icterico sin que esto guardara relación con la ictericia.

Al comparar los resultados de los estudios que indicaran presencia de anemia e ictericia como resultado de una mayor destrucción de eritrocitos y relacionarlos con presencia de anticuerpos linfocitotóxicos no se encontró que tuvieran relación. Sin embargo se encontró que la prueba de rosetas con monocitos resultó positiva en una proporción importante de los casos ictericos mientras que en los casos no ictericos resultó muy poco frecuente.

Por lo tanto, en este trabajo concluimos que los anticuerpos linfocitotóxicos no actúan como causantes de ictericia en el recién nacido y que los resultados de las rosetas en los niños ictericos sugieren la presencia de un anticuerpo anti-eritrocito fetal formado por la madre, que influye en la hemólisis del recién nacido.

2.- INTRODUCCION

La ictericia del recién nacido atribuible a hemólisis se produce cuando el feto presenta un antígeno eritrocitario heredado del padre, y que la madre no posee; pero que ha sido sensibilizada a este antígeno eritrocitario por un embarazo anterior o transfusión sanguínea incompatible, produciendo, consecuentemente, anticuerpos de tipo IgG, dirigidos contra el antígeno eritrocitario fetal (1). Estos anticuerpos pueden atravesar la barrera placentaria y lesionar los eritrocitos del feto con hemólisis consecutiva e hiperbilirrubinemia, produciéndose así la ictericia y anemia. Por otra parte el tejido hemopoyético puede no estar capacitado para compensar la gran destrucción de eritrocitos, y el hígado inmaduro no conjugar la bilirrubina con eficiencia, en forma suficiente como para que sea excretada con la bilis, produciéndose así un mayor grado de hiperbilirrubinemia e ictericia.

La formación de anticuerpos anti-Rho(D) es la forma más común de aloinmunización, que da lugar a una enfermedad clínicamente importante (2). Actualmente ya se sabe que, además del antígeno Rho(D), las diferencias materno-fetales en otros muchos factores sanguíneos pueden provocar la isoimmunización materna y por tanto la enfermedad hemolítica.

Entre estos factores no se incluye a los antígenos del sistema HLA, puesto que éstos dentro de los componentes sanguíneos se encuentran presentes fundamentalmente en leucocitos y plaquetas, pero no en eritrocitos (3).

Los eritrocitos humanos han sido tradicionalmente considerados carentes de antígenos HLA; excepto en el estado de reticulocitos (4). Sin embargo, se tienen reportes de la presencia de estos antígenos en eritrocitos maduros de algunos individuos (5, 6, 7). Cuando llegan a haber antígenos HLA en los eritrocitos, los más frecuentemente encontrados son: HLA-A2B, HLA-B7, HLA-B8 y HLA-B17 (8, 9).

Desde la primera observación por Rosenfield (10) en 1967, varios autores han demostrado claramente que los antisueros-HLA pueden contener hemaglutininas contra eritrocitos que presentan antígenos HLA específicos.

En el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional, se han observado algunos casos de hemólisis del recién nacido atribuíbles a un probable anticuerpo antieritrocitario, en los cuales no se ha demostrado la presencia de este anticuerpo, en cambio si se han encontrado anticuerpos linfocitotóxicos maternos y evidencia de estos en el suero del bebé. Por lo cual el propósito del presente trabajo es verificar el papel que juegan los anticuerpos linfocitotóxicos y definir su trascendencia clínica en la enfermedad hemolítica del recién nacido.

3.- FUNDAMENTO DEL TEMA

3.1.- Ictericia

Se conoce por ictericia a la coloración amarilla de la piel, mucosas y líquidos orgánicos como resultado del acúmulo excesivo de bilirrubina (libre o conjugada) en los líquidos extracelulares. La concentración plasmática normal de bilirrubina, incluyendo ambas formas es en promedio 0.5 mg por 100 ml. de plasma. En algunos procesos anormales puede alcanzar valores hasta de 40 mg. por 100 ml. La piel apenas empieza a tomar tono amarillo cuando la concentración se eleva hasta tres veces la normal (11). La intensidad de la ictericia no siempre guarda relación directa con la concentración de la bilirrubina y son frecuentes los errores de apreciación, por la intervención de algunos factores subjetivos del observador, por la iluminación, la hora, el color de la piel, etc.

Las causas más comunes de ictericia son:

- A) Mayor destrucción de los glóbulos rojos con liberación muy rápida de bilirrubina hacia la sangre (Ictericia Hemolítica).
- B) Obstrucción de conductos biliares o lesión de células hepáticas, de manera que incluso las cantidades corrientes de bilirrubina no pueden ser eliminadas hacia el tubo digestivo (Ictericia por Obstrucción).

3.1.1.- Ictericia Hemolítica.

En la ictericia hemolítica la función excretoria del hígado no está perturbada en absoluto, pero los glóbulos rojos se hemolizan muy rápido y las células hepáticas no pueden eliminar tanta bilirrubina como se va formando. En consecuencia, la concentración plasmática de bilirrubina libre se hace especialmente alta.

3.1.2.- Ictericia por obstrucción.

Esta ictericia es causada por obstrucción de los conductos biliares o por lesión de las células hepáticas, la intensidad de la formación de la bilirrubina es normal, pero la bilirrubina producida no puede pasar de la sangre a los intestinos. Sin embargo, la bilirrubina libre sigue penetrando en las células hepáticas, donde se conjuga en la forma acostumbrada, y acaba pasando nuevamente a la sangre, probablemente por rotura de los canaliculos biliares congestionados; por lo cual la mayor parte de la bilirrubina del plasma es conjugada en lugar de libre.

3.1.3.- Ictericia en el recién nacido.

Una carga aumentada de bilirrubina en los primeros días de vida puede tener diversos orígenes de acuerdo a la siguiente clasificación de ictericia del recién nacido (12).

I.- Del período neonatal temprano (primera semana de vida).

A) Fisiológica

B) De prematuridad y por medicamentos

C) Hemolítica

- Isoinmunización materno fetal por Rh, ABO, etc.
- Defectos enzimáticos hereditarios del eritrocito.
- Anormalidades de la morfología del eritrocito
- Drogas y toxinas

D) Por infecciones:

- Bacterianas (sepsis neonatal, ídem congénitas).
- Virales (enfermedades de inclusión citomegálica, síndrome de rubéola, herpes simplex diseminado).
- Por protozoarios (toxoplasmosis).

E) Por hemorragias ocultas:

- Hematomas, equimosis.
- Hemorragias de cavidades.

F) Por padecimientos metabólicos:

- Galactosemia.
- Síndrome de Crigler-Najjar.
- Leche materna.

II.-Del periodo neonatal tardío (segunda a cuarta semana de vida):

A) Por hepatitis neonatal

B) Por obstrucción anatómica de vías biliares:

- Atresia congénita de vías biliares, intra y extrahepáticas.
- Quistes de colédoco o pseudoquistes.
- Hipertrofia congénita del píloro.
- Neoplasia o hiperplasia de ganglios periportales.

C) Por cirrosis hepática neonatal.

D) Por cretinismo.

E) Misceláneas:

- Enfermedad de Gilbert.
- Síndrome de Dubin-Johnson.
- Síndrome de Rotor-Schiff.
- Carotenemia.

3.1.4.- Enfermedad hemolítica del recién nacido.

La enfermedad hemolítica del recién nacido, anteriormente conocida como eritroblastosis fetal, se presenta cuando los eritrocitos del feto contienen un antígeno heredado del padre y que al no tenerlo la madre y pasar a su circulación en el eritrocito fetal, estimula en ella la producción de anticuerpos IgG específicos contra esos antígenos.

Los anticuerpos IgG formados por la madre pasan a la circulación fetal por vía transplacentaria, donde provocan la reacción antígeno-anticuerpo y de esta forma lesionan los eritrocitos del feto con hemólisis anormal consecutiva e hiperbilirrubinemia, produciéndose así la ictericia y anemia (13).

Se acepta que el paso de los eritrocitos fetales a la circulación materna, tiene lugar principalmente en el momento del parto y por ende, el primer hijo de una pareja incompatible generalmente no sufre de enfermedad hemolítica (14). En consecuencia, los estímulos repetidos por varios embarazos, el volumen de sangre del producto que ha pasado a la madre y la capacidad de respuesta inmune de ésta, influyen

en la severidad de la enfermedad hemolítica del recién nacido (15).

La entidad que más frecuentemente provoca isoimmunización materno-fetal es la incompatibilidad en los sistemas ABO y Rh-ir.

En nuestro país, la posibilidad de incompatibilidad ABO en una pareja es del orden del 29%; y la del antígeno D, es del 7% (16).

Aunque la isoimmunización en el sistema ABO es más frecuente que la del antígeno D, por lo general es más benigna, con hemólisis menos intensas. Se conocen cuatro combinaciones capaces de ocasionar la enfermedad en el feto; vástago B de madre A, vástago A de madre B, vástago AB de madre A o B y vástago A o B de madre O; siendo esta última combinación la única que provoca enfermedad hemolítica del recién nacido clínicamente importante, debido a que las personas del grupo O son capaces de producir sueros más hemolíticos que las de grupo A o B (17).

La isoimmunización por el antígeno Rho (D), aunque es menos frecuente que la del sistema ABO, es mucho más severa, dando lugar a una enfermedad clínicamente importante (18). Estadísticamente, los lactantes con evidencia clínica de enfermedad hemolítica son, en la mayoría de los casos hijos Rho (D) positivos de madre Rho (D) negativas que han formado anticuerpos contra el antígeno Rho (D) (19). Actualmente se sabe que, además del sistema ABO y del Rho (D), las diferencias materno-fetales en otros muchos factores

sanguíneos pueden provocar inmunización materna y por lo tanto enfermedad hemolítica del recién nacido. Entre estos factores se encuentra la incompatibilidad que afecta antígenos como c, E del sistema Rh-Hr; y antígenos de otros sistemas como el Kell, Duffy, etc.

El diagnóstico de la enfermedad hemolítica del recién nacido, se basa en los hallazgos tanto clínicos como de laboratorio. Entre los principales datos clínicos se encuentran; el inicio de la ictericia dentro de las primeras 24 horas de vida, apareciendo más tempranamente en los casos con mayor sensibilización, palidez, hepato y esplenomegalia de magnitud variables en relación con el grado de hemólisis. En los casos extremos puede observarse hidropesía fetal. Dentro de los datos de laboratorio se encuentra la biometría hemática que muestra generalmente hemoglobina y hematócrito disminuidos, reticulocitos elevados y aumento de células inmaduras (eritroblastos) (20).

La prueba de Coombs directa es positiva en isoimmunización por el sistema Rh-Hr y débilmente positiva o hasta negativa en el ABO (21). La fracción indirecta de la bilirrubina suele elevarse en relación al grado de hemólisis.

La elevación de anticuerpos antieritrocitos de tipo IgG en el suero de la madre confirma el diagnóstico al precisar el grupo o sistema afectado (anticuerpos anti-A, anti-B, anti-D, etc.).

No todo recién nacido que presenta ictericia necesariamente tiene patología subyacente que requiere tratamiento; el

manejo de cada caso estará determinado por la magnitud de la bilirrubina y los datos clínicos. Cuando se requiere tratamiento, este va desde el uso de la la fototerapia hasta el empleo de exanguinotransfusión, siendo este último empleado en los caso más severos de enfermedad hemolítica del recién nacido (22).

3.2.- Metabolismo de la bilirrubina.

Producción:

La bilirrubina es el producto principal del catabolismo del Hem, cuya fuente principal es la hemoglobina. La destrucción normal de los eritrocitos circulantes explica 80 a 90 % de la producción diaria de bilirrubina en el adulto y alrededor del 75 % en el recién nacido (23). El porcentaje restante proviene de hemes o porfirinas no usadas durante la síntesis de la hemoglobina; degradación de la hemoglobina intracospuscular durante la maduración del eritrocito en la médula  sea, destrucción de eritrocitos recién formados en la médula  sea, degradación de proteínas no hemoglob nicas que contienen el grupo hem (catalasa, citocromos, triptófano pirrolasa, mioglobina).

Cuando los eritrocitos son eliminados de la circulación, son destruidos en el sistema mononuclear-fagocítico, donde la hemoglobina es catabolizada. Cada uno de sus tres componentes tiene un destino diferente, el hierro es casi por completo reutilizado cuando se produce la disociación del g bulo rojo en el sistema mononuclear-fagocítico, la porción globina de

la molécula de hemoglobina es metabolizada en sus aminoácidos constituyentes. La fracción hem es degradada hasta un pigmento verde, la biliverdina que es un tetrapirrol de cadena abierta. La reducción del puente de meteno central de la biliverdina origina la bilirrubina.

Transporte y captación hepática de la bilirrubina

La bilirrubina al salir del sistema mononuclear-fagocítico es liberada al plasma donde inmediatamente se combina fuertemente con la albúmina plasmática, y en esta forma es transportada a todo el cuerpo con la sangre y líquidos intersticiales (24). Esta forma de bilirrubina aun unida con la albúmina se denomina bilirrubina no conjugada o indirecta. En unas horas, la bilirrubina no conjugada es absorbida a través de la membrana de la célula hepática; para esto es liberada de la albúmina plasmática y casi instantáneamente se combina con otras proteínas llamadas proteína "Y" y "Z" (25). La proteína "Y" se presenta principalmente en el hígado y es la proteína principal que se une a la bilirrubina, en cambio "Z" se fija a la bilirrubina únicamente cuando la saturación de "Y" alcanza niveles críticos. Sin embargo, poco después la bilirrubina también es eliminada de estas proteínas y se conjuga en el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos con ácido glucurónico para formar glucuronido de bilirrubina mediante la acción enzimática de la glucuronil transferasa. En esta forma la bilirrubina recibe el nombre de bilirrubina conjugada o directa, y de esta manera es excretada por un

proceso de transporte activo a los canaliculos biliares y de ahí al duodeno. Una vez alcanzado el intestino, la bilirrubina es convertida por acción bacteriana en urobilinógeno. Parte del urobilinógeno es reabsorbido por la mucosa intestinal, pasa a la sangre y acaba eliminado nuevamente por el hígado hacia el intestino, el 5 % aproximadamente es eliminado por los riñones con la orina. Después de exposición al aire en la orina, el urobilinógeno se oxida y se transforma en urobilina o se oxida en las heces para dar estercobilina (figura 1).

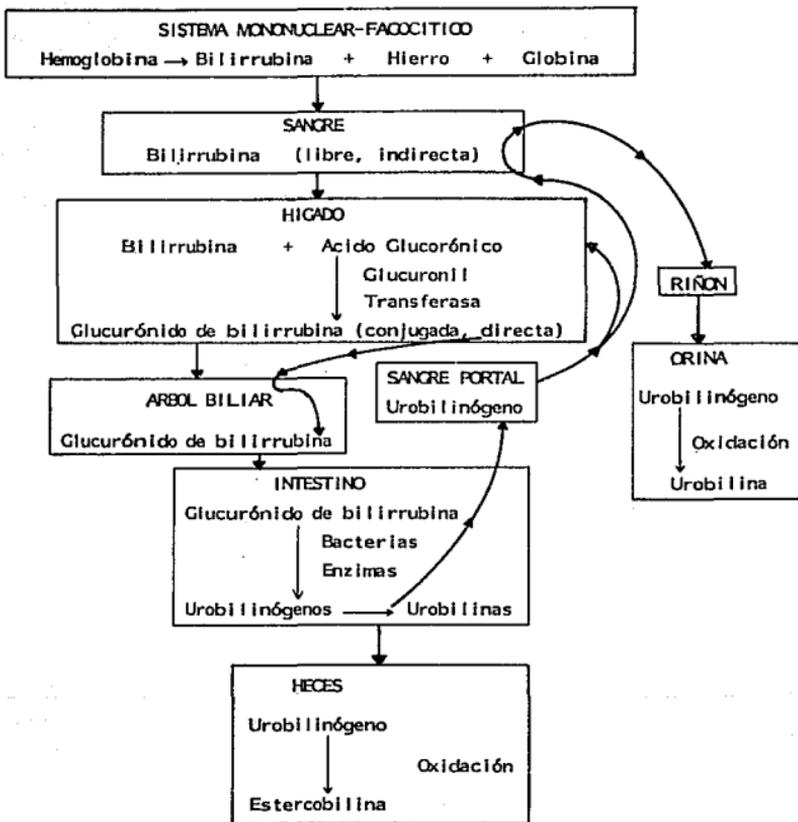


Figura 1.- Metabolismo de la bilirrubina

3.3.- Sistema HLA.

El sistema HLA es el complejo más importante de histocompatibilidad en el humano, ocupa un segmento de aproximadamente cuatro centimorgans en el brazo corto del cromosoma número seis, y consiste de varios locus cercanos portadores de genes con diversas funciones, una de ellas es la producción de determinadas sustancias antigénicas en la superficie de las membranas de casi todas las células del organismo. Estas sustancias antigénicas son llamadas antígenos HLA o antígenos de histocompatibilidad (26).

Los antígenos HLA al ser introducidos en personas que carecen de ellos dan lugar a la formación de anticuerpos anti-HLA; específicos contra el antígeno que les dió origen. Estos anticuerpos pueden ser de naturaleza IgM e IgG con actividad tanto aglutinante como citotóxica (27).

La descripción de anticuerpos anti-HLA contra leucocitos fue primero hecha por A. C. Doan en 1926. Posteriormente J. Dausset descubrió en 1954 que estos anticuerpos presentes en el suero de pacientes politransfundidos y en los sueros de 20-30 % de las mujeres multiparas, reconocían determinantes polimórficos en la superficie de los leucocitos. El describió el primer antígeno HLA al que llamo "Mac", ahora conocido como HLA-A2 (28).

Rápidamente se apreció la participación de los antígenos HLA en la aceptación de trasplantes de tejidos y órganos y motivó el estudio de los genes que determinan los antígenos HLA. En 1973, se encontró que algunos antígenos HLA están

asociados con enfermedades específicas en una elevada proporción de casos. Además, se ha comprobado que el complejo HLA regula varios aspectos de la respuesta inmunológica humana (29).

Actualmente se distinguen cuatro locus genéticos llamados A, B, C, D; que se clasifican de acuerdo a su distribución tisular y a su estructura en clase I y clase II.

Los antígenos clase I son : HLA-A, -B, -C, se encuentran en casi todas las células nucleadas del cuerpo y consisten en una molécula de dos cadenas. Una de ellas está constituida por una glucoproteína polimórfica con peso molecular de 44,000 daltones, que esta determinada por genes del complejo HLA y se asocia en forma no covalente con una proteína no polimórfica con peso molecular de 12,000 daltones: la β 2-microglobulina (30), determinada por un gen del cromosoma número quince (31). La molécula entera está insertada en la membrana celular mediante la cadena glucoproteica (figura 2).

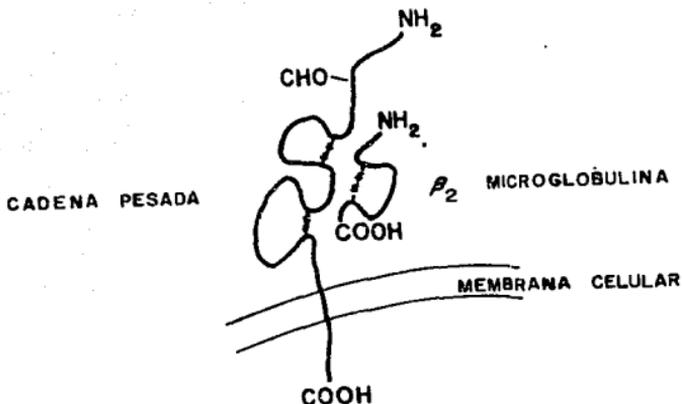


Figura 2.- Representación esquemática de una molécula HLA clase I.

Los antígenos de la clase II son los HLA-D, se encuentran principalmente en la superficie de las células inmunocompetentes, incluyendo macrófagos, monocitos, linfocitos T activados, linfocitos T supresores y particularmente en los linfocitos B. Están constituidos por una molécula de dos cadenas de glucoproteínas: cadena α con peso molecular de 34,000 daltones y cadena β con peso molecular de 29,000 daltones, unidas no covalentemente (figura 3).

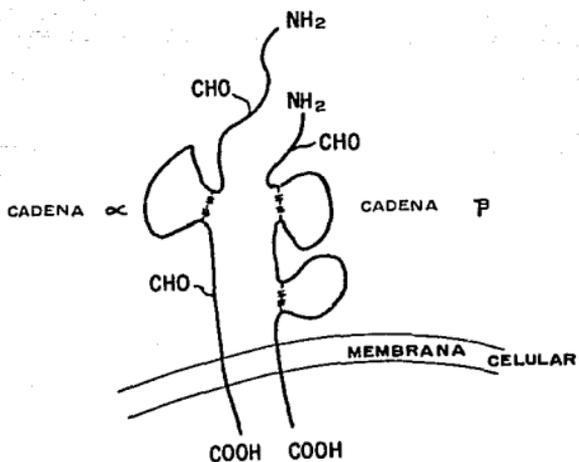


Figura 3.- Representación esquemática de una molécula de HLA clase II.

3.3.1.- Antígenos HLA en eritrocitos.

Los eritrocitos humanos han sido tradicionalmente considerados carentes de antígenos HLA, excepto en el estado de reticulocitos (32, 33). Sin embargo, cantidades variables de antígenos HLA han sido descritas en eritrocitos maduros (25, 34).

Es probable que los antígenos HLA sean eliminados de la membrana de los eritrocitos, cuando ocurren importantes modificaciones estructurales en el estado de maduración de los mismos, pero es más probable que los antígenos HLA en la superficie celular sean constantemente sintetizados y renovados como se ha sugerido para otras macromoléculas y antígenos (36). La síntesis de antígeno HLA puede persistir en los reticulocitos, en los cuales ocurre un alto nivel de síntesis de hemoglobina. La duración de síntesis de antígenos HLA puede depender del tiempo de supervivencia del RNA mensajero, el cual dura hasta el fin de la maduración de los eritrocitos, cuando desaparecen los polisomas y mitocondrias (37). Con esta hipótesis los antígenos HLA en eritrocitos, en contraste con antígenos eritrocitarios propios, pueden ser de muy corta vida y rápidamente eluidos o destruidos, desapareciendo tan pronto como su síntesis para (33). Es por ello que se considera que la expresión de antígenos HLA en eritrocitos maduros de algunos individuos, es debido a variaciones individuales en la actividad enzimática concerniente a la maduración de los eritrocitos (38).

Los antígenos HLA expresados en eritrocitos se encontró que son de la clase I y son similares a los expresados en los linfocitos, igualmente se detectó la presencia de $\beta 2$ microglobulina (39).

Muchos individuos tienen niveles no detectables de antígenos HLA en sus eritrocitos, mientras que otros tienen relativamente grandes cantidades (40). Sin embargo, la concentración de

moléculas en la membrana de los eritrocitos siempre parece ser baja cuando se compara con otras células, tales como linfocitos. Se tienen reportes de que un linfocito tiene aproximadamente 10^5 moléculas de antígenos HLA, mientras que los eritrocitos con niveles detectables de antígenos HLA tienen entre 100-200 moléculas por célula (41).

La primera observación de antígenos HLA en eritrocitos maduros fue hecha por Rosenfield en 1967 (42). El primer antígeno HLA que se demostró inequívocamente en eritrocitos fue el HLA-B7 (13). Posteriormente se han demostrado la presencia de otros antígenos como son: HLA-A9, -A10, -A28, -B8, -B12, -B15, -B17 (43). Siendo los más fuertemente expresados en eritrocitos los HLA-A28, -B7, -B17, y -B8.

4.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Durante el parto llegan al organismo materno leucocitos fetales conteniendo material genético mixto (tanto paterno como materno), esto hace que el sistema inmune de la madre se ponga en contacto con antígenos HLA fetales de herencia paterna que son reconocidos como extraños y como consecuencia de esto, elabora anticuerpos linfocitotóxicos de naturaleza IgG que pueden atravesar la barrera placentaria. En base a estas consideraciones y a estudios previos de la presencia de antígenos HLA en eritrocitos, se planteó la siguiente hipótesis: Ya que los anticuerpos linfocitotóxicos son capaces de actuar contra sitios antigénicos HLA, produciendo lisis, entonces, si existen sitios antigénicos HLA en los eritrocitos de los recién nacidos, éstos favorecerán la acción de los anticuerpos linfocitotóxicos produciendo hemólisis e ictericia en el recién nacido.

Los objetivos planteados en esta tesis son:

- 1.- Realizar la investigación de anticuerpos linfocitotóxicos mediante técnicas inmunohematológicas en la pareja madre-recién nacido, para precisar su trascendencia clínica en la ictericia del recién nacido.
- 2.- Determinar si la incompatibilidad del sistema ABO en las parejas madre recién-nacido influye en la formación de anticuerpos linfocitotóxicos y esto a vez en el grado de hemólisis.

3.- Evaluar si la incidencia de anticuerpos linfocitotóxicos aumenta a medida que aumenta el número de embarazos.

5.- MATERIALES Y METODOS

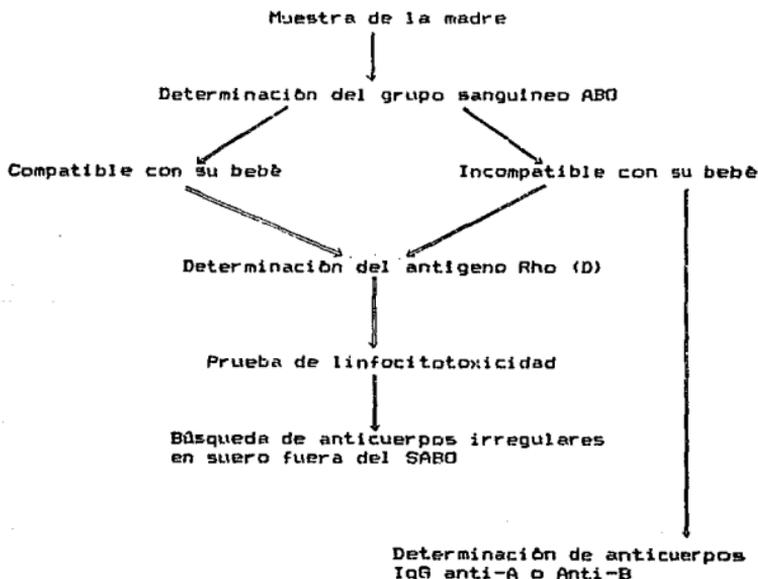
Para el desarrollo de esta tesis se estudiarón 59 parejas madre-recièn nacido ictericos y 46 parejas madre-recièn nacido no ictericos (grupo control), esta clasificación fue realizada por el médico pediatra el cual evaluó clínicamente la ausencia de ictericia o la presencia de ésta dentro de las primeras 72 horas de vida del recièn nacido.

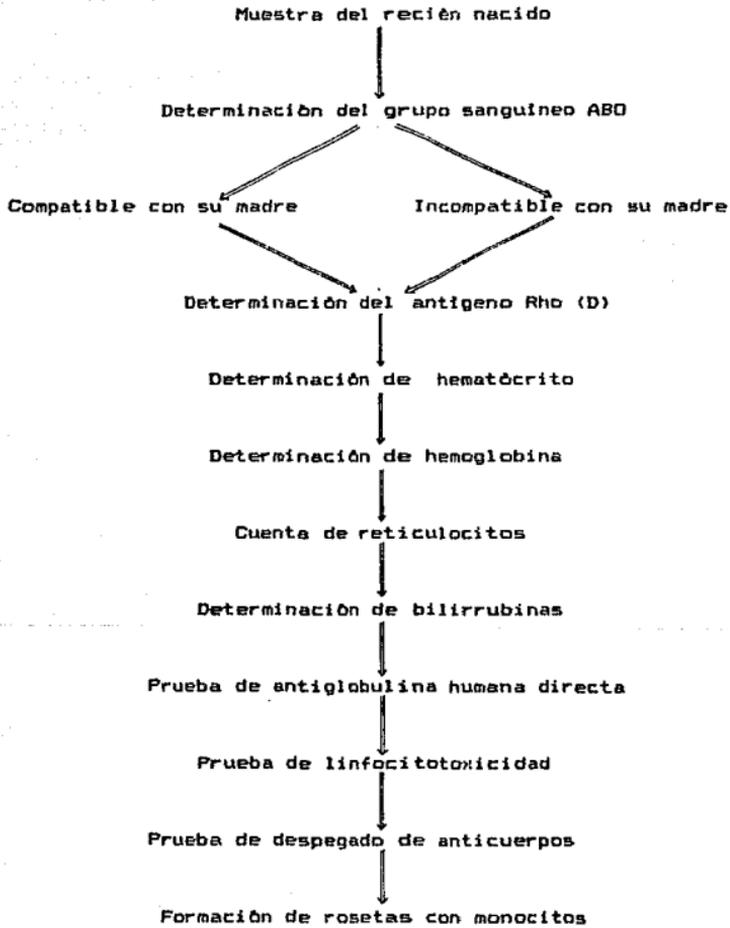
Con las muestras de sangre obtenidas se determinaron los siguientes parámetros.

- 1) Determinación de la incompatibilidad desde el punto de vista sistema ABO y Rho, mediante la realización del grupo sanguíneo ABO y detección del antígeno D, en las parejas madre recièn-nacido.
- 2) Valoración del grado de hemólisis en el recièn nacido mediante la determinación de Ht., Hb., bilirrubinas y cuenta de reticulocitos.
- 3) Valoración de la presencia de anticuerpos linfocitotóxicos en el suero de las madres, por medio de la técnica de linfocitotoxicidad.
- 4) Determinación de la presencia de anticuerpos pegados al eritrocito del recièn nacido mediante las pruebas de Coombs directo y despegado de anticuerpos.

- 5) Determinación de la presencia de otros anticuerpos fuera del sistema HLA, para valorar si su presencia es causativa de hemólisis en el recién nacido y determinar la trascendencia de los anticuerpos linfocitotóxicos en estos casos, empleando para ello las técnicas de búsqueda de anticuerpos irregulares fuera del sistema ABO (medio salino), y dentro del sistema ABO (determinación de anti-A o anti-B de tipo IgG).

DIAGRAMAS





Material biológico

- 1 ml. de sangre capilar heparinizada del recién nacido.
- 5 ml. de sangre de cordón umbilical desfibrinada.
- 5 ml. de sangre venosa de la madre sin anticoagulante.
- Eritrocitos de fenotipo conocido.
- Suero humano con linfocitotoxicidad positiva confirmada y con valoración alta.
- Complemento de conejo liofilizado.
- Mezcla de sueros "AB" Rho (D) positivos provenientes de 5 donadores de sangre.
- Sangre venosa desfibrinada de 9 donadores varones "O" Rho (D) positivo.
- Saliva de personas secretoras de sustancia A.
- Saliva de personas secretoras de sustancia B.

Instrumentos

- Microscopio de contraste de fases (American Optical Mod. Biostar).
- Espectrofotómetro (Coleman Junior II, Mod. 6/20)
- Microscopio óptico (American Optical).
- Balanza analítica (Mettler).
- Microcentrifuga (Solvat Mod. H-07).
- Centrifuga de pie (Damon Mod. CS).
- Centrifuga clínica (Clay-Adams Cat. No. 0541).
- Incubadora bacteriológica de calor seco a 37° C.
- Campana de extracción.

- Aparato lector de hematócrito.
- Baño maria a 22°C, 37°C y 56°C.

Material de vidrio

- Pipetas shali.
- Cámara de Neubauer
- Pipetas para toma de glóbulos blancos y glóbulos rojos.
- Pipetas graduadas de 0.05, 0.2, 1, 2, 5 y 10 ml.
- Pipetas volumétricas de 5 ml.
- Pipetas pasteur.
- Matraces aforados de 5 y 100 ml.
- Matraces erlenmeyer de 25 ml.
- Vasos de precipitados de 50, 100 y 500 ml.
- Probeta de 50 ml.
- Tubos de ensaye de 6 x 50, 10 x 75 y 13 x 100 mm.
- Portaobjetos
- Tubos capilares heparinizados.
- Perlas de vidrio
- Tubos netelson.

Material diverso

- Cajas de plástico falcon.
- Cajas petri de plástico.
- Cámara húmeda de plástico.
- Jeringas Hamilton de 1 y 5 lambdas.
- Termómetro clínico de -10°C a 100°C.
- Mechero bunsen

- Tripie.
- Tela de asbesto.
- Piseta.
- Gradillas.
- Boquillas.
- Bulbos de goma.
- Papel parafilm.
- Gasas.

Reactivos

- Suero comercial anti-A. Laboratorios Ortho.
- Suero comercial anti-AB. Laboratorios Ortho.
- Suero comercial anti-B. Laboratorios Ortho.
- Suero comercial anti-Rho(D) albuminoso. Laboratorios Ortho.
- Suero comercial control Rh-Hr. Laboratorios Ortho.
- Cianuro de potasio R. A. Laboratorios Merck.
- Bicarbonato de sodio R. A. Laboratorios Merck.
- Citrato de sodio R. A. Laboratorios Merck.
- Cloruro de sodio R. A. Laboratorios Merck.
- Nuevo azul de metileno. Laboratorios Sigma.
- Aceite de inmersión. Laboratorios Sigma.
- Acido clorhídrico R. A. Laboratorios Merck.
- Acido ascórbico R. A. Laboratorios Merck.
- Hidróxido de sodio R. A. Laboratorios Merck.
- Cafeína R. A. Laboratorios Merck.
- Acetato de sodio R. A. Laboratorios Merck.

- Acido sulfanilico R. A. Laboratorios Merck.
- Nitrito de sodio R. A. Laboratorios Merck.
- Versatol pediátrico (20 mg/ml.). Laboratorios Abbott.
- Tartrato de sodio y potasio R. A. Laboratorios Merck.
- Benzoato de sodio R. A. Laboratorios Merck.
- Suero de coombs. Laboratorios Ortho.
- Hypaque al 50 %. Laboratorios the Sydney Ross.
- Ficoll. Laboratorios Sigma.
- Eosina acuosa al 5 %. Laboratorios Sigma.
- Formol R. A. Laboratorios Merck.
- Cloruro de potasio R. A. Laboratorios Merck.
- Sulfato de magnesio heptahidratado. Laboratorios Merck.
- Cloruro de calcio R. A. Laboratorios Merck.
- Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado R. A. Laboratorios Merck.
- Fosfato monobásico de potasio anhidro R. A. Laboratorios Merck.
- Glucosa R. A. Laboratorios Merck.
- Rojo de fenol. Laboratorios Merck.
- Hepes. Laboratorios Sigma.
- Aceite mineral. Laboratorios Merck.
- Cloroformo R. A. Laboratorios Merck.
- Tricloroetileno R. A. Laboratorios merck.
- Solución salina isotónica al 0.9 %. Laboratorios Abbott.

Determinación de grupo sanguíneo ABO. (16)

Fundamento: La prueba consiste en la identificación de los antígenos presentes o no, en la membrana del eritrocito, y caracterización de los anticuerpos antitéticos regularmente presentes en el suero o plasma, basándose para ello en una reacción antígeno-anticuerpo de aglutinación.

Método: Prueba directa: Se rotularon 4 tubos de ensaye 10 x 75 mm. como anti-A, anti-AB, anti-B y autotestigo, se les agregó una gota de eritrocitos (de la madre o del recién nacido) suspendido al 2 % en solución salina isotónica, se agregó una gota del suero-anti respectivo a cada tubo, al tubo rotulado como autotestigo se le agregaron dos gotas de suero o plasma del problema.

Prueba inversa: Se rotularon 4 tubos como A1, A2, B y O, se agregó una gota de estos eritrocitos suspendidos al 2 % en solución salina isotónica a los tubos correspondientes más - dos gotas del suero de la madre a cada tubo. Todos los tubos tanto de la prueba inversa como de la directa se centrifugaron a 3400 rpm (1292 G) y se observó aglutinación y/o hemólisis resuspendiendo suavemente el botón formado. La presencia de aglutinación y/o hemólisis en los tubos de la prueba directa indicó la presencia del antígeno en el eritrocito problema, mientras que en la prueba inversa indicó la presencia de anticuerpos en el suero problema.

Determinación del antígeno Rho(D). (16)

Fundamento: La determinación consiste en detectar la presencia o ausencia del antígeno Rho(D) en la membrana del eritrocito mediante una reacción antígeno-anticuerpo de aglutinación, empleando para ello un suero-anti específico.

Método: Se hizo una suspensión de los eritrocitos problema al 2 % en solución salina. Se rotularon dos tubos de ensaye de 10 x 75 mm, uno como anti-D y el otro como control Rh-Hr, se agregó una gota de la suspensión de eritrocitos a cada tubo y se agregó una gota del antisuero específico al tubo correspondiente, se mezcló y centrifugó ambos tubos por 90 seg. a 3400 rpm. (1292 G), se resuspendió suavemente el botón formado y se observó si hubo aglutinación, si ésta aparecía en el tubo rotulado como anti-D, la muestra se reportó como Rho (D) positivo. Si la aglutinación resultaba negativa en el tubo rotulado como anti-D los tubos se incubaron 30 minutos a 37°C después se centrifugaron por 90 segundos a 3400 rpm (1292 G), se resuspendió suavemente el botón formado y se observó si hubo aglutinación, si resultaba positiva en el tubo rotulado como anti-D se reportó como Rho (D) positivo variedad D^u. En caso de que volviera a dar negativo, los eritrocitos se lavaron tres veces con solución salina isotónica centrifugando dos minutos por cada lavado, en el último lavado después de decantar la solución salina se secó la boca de los tubos con una gasa y se agregó una gota de

suero de Coombs a cada tubo, se centrifugaron 30 segundos a 3400 rpm (1292 G) y se observó si hubo aglutinación, en caso de ser negativa, la muestra se reportó como Rho (D) negativo. Si la aglutinación resultaba positiva en el tubo rotulado como anti-D la muestra se reportó como Rho (D) positivo variedad D^u de bajo grado.

Determinación de hematócrito

Método de microhematócrito. (2)

Fundamento: La determinación consiste en una centrifugación de la muestra para obtener una separación de los componentes sanguíneos manifestada en zonas o bandas debidas a la diferencia de densidades de tales componentes. Las bandas obtenidas son factibles de medir pudiendo así calcular el porcentaje de eritrocitos con respecto al volumen total de la muestra.

Método: Se homogenizó perfectamente la muestra de sangre heparinizada del recién nacido, se llenaron las dos terceras partes de dos tubos capilares con la muestra de sangre, éstos se sellaron a la flama por el extremo más distante de la sangre con objeto de no hemolizarla, se centrifugaron en una microcentrifuga por 5 min. a 11000 rpm (12000 G), se leyó en un aparato lector de microhematócrito obteniéndose así el porcentaje de eritrocitos.

Se tomó como valores normales: 47.0-68.0 %.

Determinación de hemoglobina

Método de la cianometahemoglobina (2)

Fundamento: La hemoglobina reacciona con el ferricianuro de potasio formando metahemoglobina, la cual con el cianuro de potasio forma la cianometahemoglobina, las soluciones de este compuesto son relativamente estables y capaces de ser medidas espectrofotométricamente.

Método: Se tomó con pipeta de Shali 0.02 ml. de sangre heparinizada del recién nacido, se limpio la sangre adherida al exterior de la pipeta con una gasa limpia, se transfirió el contenido de la pipeta a un tubo de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo 5 ml. de reactivo de drabkin, enjuagando bien la pipeta, se tapó el tubo con papel parafilm y se mezcló por inversión, se dejó reposar por 10 min. y se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm, paralelamente se desarrolló una curva estandar de hemoglobina con solución patrón de acuglobin.

Se tomó como valores normales: 15.0-22.0 g/dl

Cuenta de reticulocitos

Técnica de tinción vital empleando nuevo azul de metileno. (44).

Fundamento: Los reticulocitos contienen residuos de Acidos nucleicos y ribosomas que reaccionan con el colorante nuevo azul de metileno formando un precipitado granuloso o

filamentoso de color azul; el cual disminuye a medida que la célula madura.

Método: Se homogenizó perfectamente la sangre anticoagulada del recién nacido y se colocó una gota de esta sangre en un tubo de ensaye de 10 x 75 mm agregándose una gota de nuevo azul de metileno al 1%, se mezcló e incubó por 15 min. a 37 °C, pasado este tiempo se mezcló nuevamente y se hizo una extensión en un portaobjetos utilizando una gota de la mezcla, se dejó secar al aire y se observó al microscopio con el objetivo de inmersión, se contaron los reticulocitos que aparecieron en un total de 500 células (entre eritrocitos y reticulocitos) y se calculó el porcentaje de reticulocitos de la siguiente forma:

$$\% \text{ de reticulocitos} = \frac{\text{Número de reticulocitos} \times 100}{500}$$

$$\% \text{ de reticulocitos corregidos} = \frac{\% \text{ reticulocitos} \times \text{Ht}}{100}$$

Se tomó como valores normales: 0.5-5.0%

Determinación de bilirrubinas

Método de Jendrassik y Grof. (45).

Fundamento: El método se basa en el acoplamiento de la bilirrubina con el ácido sulfanílico diazotado, lo cual forma

un complejo colorido azul, cuya intensidad es directamente proporcional a su concentración. La bilirrubina directa o conjugada se acopla al diazo-reactivo en medio ácido (pH=1.5) y una vez terminado el tiempo de reacción, se adiciona ácido ascórbico-cafeína y reactivo alcalino y se cuantifica fotométricamente. La bilirrubina total se determina utilizando como acelerador cafeína benzoato de sodio-acetato de sodio. Al finalizar la reacción se agrega ácido ascórbico y reactivo alcalino y se cuantifica fotométricamente. La bilirrubina indirecta se obtiene por diferencia entre la bilirrubina total y la bilirrubina directa.

Método: Se preparó el diazo reactivo B (estable 30 min a temperatura ambiente). Se rotularon tres tubos de ensayo de 13 x 100 mm. para cada problema con: bilirrubina total, bilirrubina directa y blanco respectivamente. Se rotularon 2 tubos con: bilirrubina total y blanco para la solución patrón de versatol pediátrico. Se agregó 0.2 ml de diazo-reactivo a todos los tubos correspondientes a problema y patrón. Se agregó 1.2 ml de cafeína I a cada uno de los tubos excepto a los rotulados como bilirrubina directa. Se agregó 0.6 ml de ácido clorhídrico 0.05 N a cada uno de los tubos rotulados con bilirrubina directa, se agitó suavemente hasta la mezcla completa de los reactivos. Se agregó 0.1 ml de ácido ascórbico al 5 % a los tubos rotulados como blanco. Se agregó 0.05 ml de versatol pediátrico a los tubos rotulados con total y blanco de la solución patrón. Se agregó 0.05 ml de

suero del recién nacido a cada uno de los tubos rotulados con bilirrubina directa, total y blanco de cada problema respectivamente y se mezcló suavemente, se dejaron reposar 10 minutos a 22 °C. Se preparó la mezcla de cafeína II y se agregó una alícuota de 0.7 ml a los tubos rotulados con bilirrubina directa, se agregó 0.5 ml de mezcla alcalina a cada uno de los tubos rotulados con bilirrubina directa y blanco; se mezclaron por inversión después de taparlos con papel parafilm, se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó en el espectrofotómetro a 600nm. de longitud de onda llevando a 100 % la transmitancia con el blanco preparado para cada problema y el patrón. Los tubos rotulados con bilirrubina total se dejaron reposar por 30 minutos a 22°C, se les adicionó 0.1 ml de Ácido ascórbico y 0.5 ml de mezcla alcalina, se taparon todos los tubos con papel parafilm y se mezclaron por inversión, se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó a 600 nm. de longitud de onda llevando a 100 % la transmitancia con el blanco preparado para cada problema y para el patrón. Se anotó la densidad óptica.

Los mg/100 ml de bilirrubina directa, indirecta y total se obtuvieron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Bilirrubina total y/o directa} = \frac{\text{D.O. del problema}}{\text{D.O. de la solución patrón}} \times \frac{\text{Concentración de la solución patrón}}{\text{mg/100 ml}}$$

Bilirrubina indirecta = bilirrubina total - bilirrubina directa.
Se tomó como valores normales de bilirrubina indirecta:
0.5-6.0 mg %

Prueba de la antioglobulina humana directa.

Prueba de Coombs directo. (16)

Fundamento: La prueba se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, para demostrar la presencia de anticuerpos unidos al eritrocito in vivo, empleando para ello suero antioglobulina humana, la cual al ponerse en contacto con eritrocitos que lleven fijados anticuerpos gammaglobulínicos humanos, produce una marcada aglutinación.

Método: se lavó tres veces una alícuota de aproximadamente 0.1 ml. de sangre heparinizada del recién nacido en 50 veces su volumen en solución salina isotónica, se hizo una suspensión de eritrocitos lavados al 2 % con solución salina isotónica. Se rotularon 9 tubos de ensayo de 10 x 75 mm del 1 al 9, se agregaron a los tubos No. 1 y 2 dos gotas de suero de Coombs, a partir del tubo No. 2 y hasta el tubo No. 9 se agregaron 2 gotas de solución salina isotónica. Se mezcló el contenido del tubo No. 2 y se pasaron 2 gotas de esta mezcla al tubo No. 3 y así sucesivamente hasta llegar al tubo No. 9 de donde se descartaron 2 gotas, a los 9 tubos se les agregó una gota de la suspensión de eritrocitos lavados, se mezclaron y se centrifugaron todos los tubos por 30 seg. a

3400 rpm (1292 G). se resuspendió suavemente el botón formado y se leyó aglutinación en todos los tubos, reportando en cruces.

Cuando no apareció aglutinación se reportó como negativa. Cuando si hubo aglutinación se tomó en cuenta la última dilución donde apareció aglutinación reportandose la positividad hasta dicha dilución.

Prueba de linfocitotoxicidad

Método de Terasaki modificada. (46)

Fundamento: La prueba consiste en la búsqueda de anticuerpos anti-HLA en el suero de la madre, dirigidos contra los antígenos HLA de su bebé que ella desconoce, y que pueden detectarse en los linfocitos del bebé. El método detecta anticuerpos fijadores de complemento que conducen a la muerte del linfocito, si éste presenta el antígeno correspondiente al anticuerpo, perfora su membrana, permitiendo así la penetración del colorante a la célula (células muertas) que se observan al microscopio de contraste de fases como células coloreadas y opacas. Las células vivas son brillantes y refringentes.

Método: La muestra de sangre del cordón umbilical (5 ml.) en el grupo de recién nacidos controles, se tomó en matraces erlenmeyer que contenía 5 perlas de vidrio, se mezcló con movimiento rotatorio para desfibrinar durante 5-7 min., hasta aparición de fibrina en las perlas de vidrio, se diluyó la

sangre desfibrinada 1:2 con solución salina isotónica, se mezcló por inversión tapando el tubo con papel parafilm, con pipeta pasteur se estratificó cuidadosamente la sangre diluida en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm. que contenía 2.5 ml. de ficoll-hypaque.

La muestra de sangre capilar heparinizada del recién nacido (0.3 ml.) en el grupo icterico, se diluyó 1:4 con solución salina isotónica, se mezcló por inversión y con pipeta pasteur se estratificó cuidadosamente en un tubo de ensaye de 10 x 75 mm que contenía 1 ml. de ficoll-hypaque.

En ambas muestras (grupo control y grupo icterico) los tubos se centrifugaron a 1350 rpm (400 G) durante 40 minutos, se obtuvieron los linfocitos con pipeta pasteur humedecida en solución salina isotónica y se colocaron en otro tubo de 13 x 100 mm. ó 10 x 75 mm. según el caso, y se centrifugaron nuevamente a 1350 rpm (400 G) durante 10 minutos. Se obtuvieron los linfocitos decantando el sobrenadante, se les adicionó 4 ml. de medio de Hanks IX, se centrifugó a 1350 rpm (400 G) durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se secó la boca del tubo sobre una gasa. Se le agregó a cada tubo que contenía los linfocitos 0.1 ml. de suero amortiguado (pH=7) y se resuspendió, en placas falcon que contenían aceite mineral, se numeraron por cada muestra problema cuatro positos, en el primer posito se colocó mediante una jeringa hamilton una lambda de medio de Hanks IX (testigo negativo), en el segundo posito se colocó una lambda de suero puro de la madre correspondiente, previamente descomplementado a 56 °C

en baño maria por 30 minutos y centrifugado a 10 000 rpm (22360 G) durante 10 minutos, en el tercer posito se colocó una lambda del suero anterior diluido 1:2 con medio de Hanks IX, en el cuarto posito se colocó una lambda de suero con linfocitotoxicidad positiva confirmada y con valoración alta, previamente descomplementado y centrifugado (testigo positivo). Se agregó en los cuatro positos una lambda de linfocitos del recién nacido correspondiente con el suero de su madre, se incubaron las placas 30 minutos a temperatura ambiente. Se reconstituyó el complemento de conejo liofilizado, se agregaron .5 lambdas de éste a los cuatro positos y se mezcló por rotación. Se incubaron las placas por 60 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 3 lambdas de eosina acuosa al 5 % a los cuatro positos y se mezcló por rotación dejándose reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron a los cuatro positos 2 lambdas de formol (pH 7) y se cubrieron con una laminilla de cristal, se dejaron reposar durante 12 horas a temperatura ambiente. Se leyó en microscopio de contraste de fases, las células que refringen son células vivas y las células teñidas (quinda obscuro) son células muertas reportándose éstas como positivo. Los resultados de positividad se reportaron en porcentaje, el cual se obtuvo restando el % de positividad del control negativo al % de positividad de la muestra problema sin diluir.

Prueba de despegado de anticuerpos con cloroformo-tricloroetileno.

Método de Massuet y Armengol. (47).

Fundamento: Los eritrocitos son lisados por los solventes orgánicos, liberando así anticuerpos que se encuentran unidos al antígeno correspondiente presente en la membrana del eritrocito. Los anticuerpos que se encuentran en el despegado son probados con células correspondientes de fenotipo conocido para identificar su especificidad.

Método: Se lavaron 6 veces 0.3 ml. de sangre anticoagulada del recién nacido con solución salina isotónica fría (4 °C) en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm., en el último lavado se obtuvo el paquete globular (un volumen) y se le adicionó un volumen de solución salina isotónica y dos volúmenes de mezcla cloroformo-tricloroetileno, se mezcló cuidadosamente rotando el tubo con las manos y se incubó a 37 °C durante 10 minutos mezclando levemente cada minuto, se centrifugó a 6000 rpm (8000 G) durante 5 minutos. Se separó el despegado que se obtuvo en la capa superior, se centrifugó a 3400 rpm (1292 G) durante 5 minutos y se probó con células A1, B y eritrocitos del recién nacido (autotestigo) en el grupo de recién nacidos con incompatibilidad al SABO con su madre, y con células de fenotipo conocido correspondientes al sistema Rh-Hr en el grupo de recién nacidos compatibles al SABO con su madre, empleando para ello la técnica de salina rápida, 22 °C, 37 °C y coombs.

La observación de aglutinación indicó la presencia de anticuerpos en el despegado y para conocer su especificidad se hizo uso de la carta de eritrocitos de fenotipo conocido realizada en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional del I.M.S.S. (Apéndice).

Búsqueda de anticuerpos irregulares en suero fuera del SORO

Técnica de salina completa hasta coombs. (16)

Fundamento: La prueba se basa en la reacción antígeno-anticuerpo in vitro. El antígeno está representado por suspensiones de eritrocitos cuyos fenotipos de grupos sanguíneos se conocen. El anticuerpo desconocido, que se encuentra en el suero problema, se enfrenta a estos eritrocitos en condiciones óptimas de reacción para la obtención de aglutinación y/o hemólisis.

Método: Se rotuló una serie de 11 tubos de ensayo de 10 x 75 mm. numerados del 1 al 10 y autotestigo, se agregaron dos gotas de suero de la madre en cada uno de los tubos y una gota de suspensión de eritrocitos al 2 % en solución salina isotónica de fenotipo conocido correspondientemente; al tubo de autotestigo se le agregó una gota de eritrocitos de la madre suspendidos al 2 % igual que los anteriores. Se mezclaron los tubos y se centrifugaron a 3400 rpm (1292 G) por 30 segundos, se resuspendieron los botones con agitación moderada observando continuamente contra una fuente de luz

blanca y se reportó cualquier aglutinación macroscópica o hemólisis (salina rápida).

Todos los tubos se incubaron en un baño maría 22°C por una hora, pasado ese tiempo se centrifugaron a 3400 rpm (1292 G) por 30 segundos y con agitación moderada se resuspendieron los botones anotando cualquier aglutinación macroscópica o hemólisis observada (salina a 22°C).

Se incubaron todos los tubos en un baño maría a 37°C durante una hora, se centrifugaron a 3400 rpm (1292 G) por 30 segundos y con agitación moderada se resuspendieron los botones anotando cualquier aglutinación macroscópica o hemólisis observada (salina a 37°C).

Todos los tubos cuyo resultado de aglutinación fue negativo se lavaron tres veces con solución salina isotónica a 3400 rpm (1292 G) por un minuto para cada lavado, al final del último lavado se escurrió el remanente de la solución salina en una gasa limpia y seca. Se adicionó a cada tubo una gota de suero de coombs, se mezcló y se centrifugaron todos los tubos a 3400 rpm (1292 G), se resuspendieron los botones y se reportó aglutinación o hemólisis (salina coombs).

Para obtener la probable especificidad del (los) anticuerpo (s) encontrado (s), se empleó la carta de eritrocitos de fenotipo conocido, realizada en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional del IMSS (Apéndice).

Determinación de anticuerpos IgG inmunes anti-A o anti-B.

Método de neutralización con saliva secretora de sustancia de grupo sanguíneo A o B. (48)

Fundamento: Los anticuerpos anti-A y anti-B de clase IgM se neutralizan a 22 °C con saliva secretora de grupo sanguíneo A o B mientras que los de naturaleza IgG quedan libres y activos en el suero, para ser determinados posteriormente en una reacción de aglutinación a 37 °C y con ayuda de suero de Coombs.

Método: Se rotularon 3 tubos de ensayo de 10 x 75 mm. como 1, 2 y 3, se adicionó a cada tubo 5 gotas del suero de la madre respectiva, al tubo No. 1 se le agregó 5 gotas de saliva secretora de sustancia A o B según el caso; al tubo No. 2 se le agregaron 10 gotas de saliva y al No. 3 de la misma saliva se le agregaron 15 gotas, se mezcló perfectamente el contenido de los tres tubos y se incubaron a 22 °C durante 30 minutos.

Se tomaron 4 gotas del tubo No. 1, 6 gotas del tubo No. 2 y 8 gotas del tubo No. 3 y se colocaron en tres tubos limpios rotulados nuevamente como 1, 2 y 3. Se adicionó a cada tubo una gota de suspensión de eritrocitos de grupo sanguíneo A1 o B según el caso al 2 % en solución salina isotónica, se mezcló y se centrifugó a 3400 rpm (1292 G) por 30 segundos, se resuspendieron los botones con agitación moderada y se tomó como punto de neutralización el primero de los tres

tubos que mostró un resultado de aglutinación negativa, estos tubos se desecharon.

Se rotularon 12 tubos de ensayo de 10 x 75 mm. del 1 al 12 y se realizó una dilución doble progresiva del suero donde se llevó a cabo la neutralización, con solución salina, se adicionó a cada tubo una gota de eritrocitos de grupo sanguíneo A1 o B según el caso suspendidos al 2 % en solución salina isotónica, se mezclaron e incubaron a 37 °C por una hora, pasado ese tiempo se centrifugaron los tubos a 3400 rpm (1292 G) por 30 segundos y se resuspendió el botón con agitación moderada. Los tubos en donde la aglutinación fue negativa se lavaron tres veces con solución salina isotónica, centrifugando a 3400 rpm (1292 G) por un minuto para cada lavado, al finalizar el tercer lavado se decantó el remanente de solución salina en una gasa y se adicionó a cada tubo una gota de suero de coombs, se mezcló y se centrifugó a 3400 rpm (1292 G) por 30 segundos, se resuspendió el botón formado con agitación moderada y se reportó aglutinación. Para reportar la concentración de anticuerpos IgG se tomó en cuenta la dilución en que se llevó a cabo la neutralización de la IgM y de ahí se partió para contar la última dilución donde apareció aglutinación, reportándose esa dilución como la concentración de anti-A o anti-B de tipo IgG.

Formación de rosetas con monocitos

Método de Nance y Garratty. (49)

Fundamento: Los monocitos tienen sitios receptores para IgG y complemento por tanto son capaces de captar los complejos antígeno-anticuerpo formados por eritrocitos sensibilizados con IgG por medio de la fracción Fc del anticuerpo, formando así rosetas.

Método: La muestra de sangre de cordón umbilical (5 ml) en el grupo de recién nacidos controles se desfibrinó y se diluyó 1:2 con solución salina isotónica, mezclando enseguida de tapar el tubo con papel parafilm, con pipeta pasteur se estratificó cuidadosamente la sangre diluida en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm. que contenía 2.5 ml. de ficoll-hypaque. La muestra de sangre capilar heparinizada del recién nacido (0.3 ml.) del grupo icterico se diluyó 1:4 con solución salina; se mezcló por inversión y con una pipeta pasteur se estratificó cuidadosamente la sangre diluida en un tubo de ensayo de 10 x 75 mm. que contenía 1 ml. de ficoll-hypaque.

Se tomaron muestras de sangre venosa (5 ml.) de 9 donadores varones "O" Rho (D) positivo, se desfibrinaron y se diluyeron 1:2 con solución salina, esta sangre se estratificó cuidadosamente en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm. conteniendo 2.5 ml. de ficoll-hypaque.

Todos los tubos de las muestras de sangre anteriores (grupo

control, grupo icterico y las muestras de los 9 donadores) se centrifugaron a 1350 rpm (400 G) durante 40 minutos, se pasaron cuidadosamente los tubos a una gradilla y se extrajo de la interfase la capa de células mononucleares que aparece como una capa blanca con ayuda de una pipeta pasteur. En las muestras de los donadores se mezclaron todas las capas obtenidas y se colocaron en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm. al que se le agregó 4 ml. de medio de Hanks IX y se tapó con un parafilm para mezclar por inversión.

A las muestras de los recién nacidos del grupo control y del grupo icterico se les agregó 2 ml. de medio Hanks IX. Todos los tubos se centrifugaron a 1350 rpm (400 G) durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante decantando y se resuspendió el botón formado con 2 gotas de medio de Hanks IX. Con una pipeta Pasteur previamente humedecida con Hanks IX se colocó la suspensión de células mononucleadas en el centro de una caja petri de plástico, se tapó y se colocó dentro de una cámara húmeda, se incubó durante 90 minutos a 37 °C, pasado ese tiempo se sacó la caja petri de la cámara húmeda y se desechó el sobrenadante (el cual consiste de linfocitos que fueron ocupados para la prueba de linfocitotoxicidad), los monocitos que quedaron adheridos a la caja petri se enjuagaron 6 veces con un mililitro de medio de Hanks IX realizando movimientos circulatorios en una superficie plana y se desechó el sobrenadante. Se despegó la capa de monocitos con un papel parafilm raspando cuidadosamente y se transfirió a un tubo de ensaye de 12 x 75 mm. enjuagando cuidadosamente

con medio de Hanks IX (4 gotas en total), se mezcló y se contaron los monocitos en una cámara de Neubauer ajustandolos a $4000/\text{mm}^3$.

Los eritrocitos del recién nacido (0.1 ml.) se lavaron tres veces con solución salina isotónica y se ajustaron a $100\ 000/\text{mm}^3$ resuspendidos en medio de Hanks IX.

En un tubo de ensaye de 10 x 75 mm. se colocaron 2 gotas de monocitos ajustados (monocitos del recién nacido en el grupo control y de donadores adultos en el grupo icterico), 2 gotas de eritrocitos del recién nacido ajustados y 3 gotas de medio de Hanks IX, se centrifugó a 1200 rpm (160 G) durante 8 minutos, se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió el botón celular. Con una pipeta pasteur se tomó del fondo del tubo una gota, se colocó en una cámara de Neubauer y se observó al microscopio contandose las rosetas formadas (un monocito con 2 ó más eritrocitos pegados se contó como roseta).

Se colocó un testigo positivo que se preparó con eritrocitos "O" Rho (D) positivos incubados 30 minutos a 37°C con anti-D diluido 1:32 en solución salina isotónica, y un testigo negativo con eritrocitos de un donador varón sano con prueba de coombs directo negativa. Se procesaron estos testigos de la misma forma que los eritrocitos problema.

Se contó en toda la parte cuadrículada de la cámara de Neubauer el número de rosetas formadas y el número de monocitos libres. Se calculó después el número de monocitos vivos de acuerdo al resultado de la prueba de viabilidad de

monocitos y con esto se calculó el porcentaje de rosetas.

Viabilidad de monocitos.- en un tubo de ensaye de 10 x 75 mm. se colocaron 7 lambdas de monocitos, 3 lambdas de eosina acuosa al 5 %, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se agregaron 2 lambdas de formal pH 9.0, se colocó una gota de esta mezcla en una cámara de Neubauer y se observó al microscopio con el objetivo seco fuerte (40 X), se contó el número total de monocitos muertos y vivos en toda la parte cuadrículada de la cámara, observandose los monocitos muertos opacos y los vivos refringentes. Se calculó el porcentaje de monocitos vivos.

$$\% \text{ Monocitos vivos} = \frac{\text{No. de monocitos X 100}}{\text{No. de monocitos vivos} + \text{No. de monocitos muertos}}$$

$$\text{No. Monocitos vivos} = \frac{\text{No. monocitos libres (prueba de rosetas)} \times \% \text{ monocitos vivos (prueba de viabilidad)}}{100}$$

$$\% \text{ de Rosetas} = \frac{\text{No. de Rosetas X 100}}{\text{No. de Rosetas} + \text{No. monocitos vivos (fórmula anterior)}}$$

6.- RESULTADOS

Se estudiaron 59 parejas de madre-recién nacido icterico y 66 parejas de madre-recién nacido control (no icterico). Ambos grupos se separaron en grupo de niños compatible y grupo de niños incompatible con la madre, desde el punto de vista de grupo sanguíneo ABO.

En el cuadro No. 1 se observa que de los productos de las madres con anticuerpos linfocitotóxicos, 10 tuvieron ictericia (16.9 %) y 6 no (9.1 %); en contraste, en los recién nacidos de 109 madres en quienes no se demostraron anticuerpos linfocitotóxicos, se observan 49 recién nacidos ictericos (83.1 %) y 60 no ictericos (90.9 %).

En el cuadro No. 2 y 3 se anota el total de las madres de recién nacidos ictericos y no ictericos, incompatibles y compatibles en sistema ABO que tuvieron linfocitotoxicidad positiva en su suero, se observa que en 5 de las madres de recién nacidos incompatibles se encontraron anticuerpos linfocitotóxicos y en 11 con recién nacidos compatibles. En cambio en los cuadros No. 4 y 5, la investigación de anticuerpos linfocitotóxicos fue negativa en 22 madres con recién nacidos incompatibles y en 87 con recién nacidos compatibles.

En el cuadro No. 6 se anotan los resultados de la búsqueda de anticuerpos irregulares fuera del sistema ABO, en el suero de las madres de 7 recién nacidos ictericos compatibles por

sistema ABO, que presentaron anticuerpos linfocitotóxicos positivos, así como el resultado de las rosetas M formadas (eritrocitos del recién nacido con monocitos de adulto). Se observa que en el suero de la madre del recién nacido No. 8 se encontró un anticuerpo anti-kell, y las rosetas negativas. Con los eritrocitos de los recién nacidos No. 32, 45 y 56 se formaron rosetas, en ausencia de anticuerpos irregulares.

En el cuadro No. 7 se anotaron las valoraciones de anti-A y anti-B inmunes, en el suero de las madres de 3 recién nacidos incompatibles en el sistema ABO, que tuvieron anticuerpos linfocitotóxicos, de las cuales, en dos de ellas la No. 14 y 43 se formaron rosetas.

En el cuadro No. 8 se anota el resultado de la investigación de anticuerpos irregulares fuera del sistema ABO en el suero de las madres de 36 recién nacidos ictericos compatibles en sistema ABO, con linfocitotoxicidad negativa, así como la formación de rosetas (eritrocitos de recién nacido con monocitos de adulto normal); se observa la presencia de anticuerpos naturales irregulares como los anti-M, anti-P, anti-Le^a, anti-N y anti-S (comunes en las mujeres embarazadas y en las mujeres en postparto) en los casos 27, 31, 33 y 51. Así como anticuerpos inmunes como el anti-JK^b, el anti-Kell y la mezcla de anti-G, anti-E y anti-Fy^b, estos últimos - relacionados todos con la enfermedad hemolítica del recién nacido por isoimmunización materno-fetal. Con eritrocitos de los recién nacidos de estas madres se formaron rosetas, así

como con la mayoría de los eritrocitos de los recién nacidos de madres que no tuvieron anticuerpos irregulares anti-eritrocitos.

En el cuadro No. 9 se anotaron los resultados de la investigación de anticuerpos inmunes del sistema ABO en el suero de 11 madres sin anticuerpos linfocitotóxicos con recién nacidos ictericos incompatibles en el sistema ABO; observándose que el valor mínimo de anti-A fue de 1:16.

La formación de rosetas con eritrocitos de recién nacidos se presentó en 5 casos, siendo el valor mínimo de anticuerpos en la madre de un recién nacido que presentó la formación de rosetas de 1:64.

En los cuadros 10, 11, 12 y 13 se resumen los datos de los recién nacidos controles (no ictericos) compatibles e incompatibles del sistema ABO con anticuerpos linfocitotóxicos positivos y negativos en los sueros de las madres de estos recién nacidos.

En el cuadro No. 10 vemos que los límites de las valoraciones de anticuerpos inmunes del sistema ABO en las madres de 9 recién nacidos fueron de 1:2.5 hasta 1:384. Los límites de anti-A inmune son más amplios 1:2.5 hasta 1:384, que los de anti-B 1:2.5 hasta 1:8. Con los eritrocitos de 2 recién nacidos, uno para los anti-A y otro para los anti-B se formaron rosetas, a pesar de ser de valoración baja.

Del grupo de recién nacidos del cuadro No. 11 vemos que solamente en un caso (de los 51), el No. 88 se formaron rosetas.

Para el grupo de recién nacidos en el suero de cuyas madres se encontró anticuerpos linfocitóticos positivos, cuadros 12 y 13, ninguno de ellos formó rosetas. Notándose entre ellos el caso No. 81 con un valor de anti-A inmune de 1:512.

En los cuadros No. 14 y 15 se concentraron los resultados de los estudios practicados a los recién nacidos agrupados como ictericos y no ictericos con linfocitotoxicidad positiva, las dosificaciones de bilirrubina indirecta son claramente superiores en los pacientes ictericos encontrándose una diferencia significativa en los valores promedio ($p < 0.001$), las dosificaciones de hemoglobina y hematocrito son practicamente identicas en los recién nacidos ictericos y en los no ictericos. Otro dato que se registró es el de la formación de rosetas que en los 6 casos no ictericos es negativa y en 9 de los 10 ictericos es positiva.

En el cuadro No. 16 se registraron los datos globales obtenidos en los recién nacidos ictericos con linfocitotoxicidad negativa, la \bar{X} de bilirrubina indirecta es de 9.8 mg., que no es significativamente diferente a la de los recién nacidos ictericos con linfocitotoxicidad positiva del cuadro No. 14 que presentaron una \bar{X} de bilirrubina indirecta de 8.2; tampoco hay una diferencia importante entre los promedios de hemoglobina y hematocrito entre estos dos

grupos. En la prueba de rosetas del cuadro No. 16 se encontraron 20 casos de rosetas positivas de un total de 49 casos.

En el cuadro No. 17 se registraron los datos globales correspondientes al grupo de recién nacidos no ictericos (controles) con linfocitotoxicidad negativa; los promedios de bilirrubina indirecta como de hemoglobina y hematocrito son muy parecidos a los de los recién nacidos no ictericos con linfocitotoxicidad positiva del cuadro No. 14. Como dato notable esta el que el número de rosetas formadas es muy inferior (3 de 60) que el de ictericos con linfocitotoxicidad negativa, diferencia que es similar a la observada en los grupos de los cuadros No. 14 y 15.

En el cuadro No. 18 observamos el promedio de bilirrubina indirecta de los recién nacidos ictericos y no ictericos agrupados como compatibles e incompatibles con sus madres en sistema ABO con linfocitotoxicidad positiva o negativa, notandose que los promedios de bilirrubina indirecta son prácticamente iguales dentro de los subgrupos de ictericos así como de los no ictericos (controles), sucediendo lo mismo en el cuadro No. 19 donde las diferencias de bilirrubina indirecta sólo son significativas si se compara globalmente el grupo icterico contra el grupo no icterico.

En el cuadro No. 20 y 21 se anotaron las frecuencias de anticuerpos anti-HLA con respecto al número de embarazos en

el grupo icterico y no icterico, aunque el número de casos con anticuerpos anti-HLA fue muy pequeño, se nota una mayor frecuencia de estos anticuerpos en el grupo icterico que en el no icterico.

RESULTADOS GLOBALES DE LINFOCITOTOXICIDAD

GRUPO	No. TOTAL DE CASOS	LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA		LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA	
		No. DE CASOS	%	No. DE CASOS	%
ICTERICO	59	10	16.9	49	83.1
NO ICTERICO	66	6	9.1	60	90.9

Cuadro 1

**LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA EN LAS MADRES
CON RECIEN NACIDOS INCOMPATIBLES EN SABA**

GRUPO	No. TOTAL DE CASOS	LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA	
		No. DE CASOS	%
ICTERICO	16	3	18.8
NO ICTERICO	11	2	18.2

Cuadro 2

**LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA EN LAS MADRES
CON RECIEN NACIDOS COMPATIBLES EN SABA**

GRUPO	No. TOTAL DE CASOS	LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA No. DE CASOS	%
ICTERICO	43	7	16.3
NO ICTERICO	55	4	7.3

Cuadro 3

**LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA EN LAS MADRES
CON RECIEN NACIDOS INCOMPATIBLES EN SABO**

GRUPO	No. TOTAL DE CASOS	LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA	
		No. DE CASOS	%
ICTERICO	16	13	81.3
NO ICTERICO	11	9	81.8

Cuadro 4

**LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA EN LAS MADRES
CON RECIEN NACIDOS COMPATIBLES EN SABO**

GRUPO	No. TOTAL DE CASOS	LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA No. DE CASOS	%
ICTERICO	43	36	83.7
NO ICTERICO	55	51	92.7

Cuadro 5

**RECIEEN NACIDOS ICTERICOS COMPATIBLES CON SUS MADRES
(SABO) CON LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA**

NO. DE CASO	ACS.	ACS.	ROSETAS
	ANTI-ERITROCITOS FUERA DEL SABO (EN EL SUERO MATERNO)	LINFOCITOTOXICOS (EN EL SUERO MATERNO) %	(ERITROCITOS R.N. MONOCITOS ADULTO) %
8	anti-Kell	10	-
20	-	5	-
22	-	5	-
32	-	10	5.9
45	-	15	5.8
56	-	5	3.3
58	-	5	-

Cuadro 6

**RECIEN NACIDOS ICTERICOS INCOMPATIBLES CON SUS MADRES
(SABO) CON LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA**

NO. DE CASO	ACS. ANTI-ERITROCITOS FUERA DEL SABO (EN EL SUERO MATERNO)	LINFOCITOTOXICIDAD (EN EL SUERO MATERNO) %	ROSETAS (ERITROCITOS R.N. MONOCITOS ADULTO) %
14	anti-A 1:640	10	5.4
41	anti-B 1:128	5	-
43	anti-B 1:512	10	4.1

Cuadro 7

**RECIEEN NACIDOS ICTERICOS COMPATIBLES CON SUS MADRES
(SABO) CON LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA**

NO. DE CASO	ACS. ANTI-ERITROCITOS FUERA DEL SABO (EN EL SUERO MATERNO) MATERNO)	ROSETAS (ERITROCITOS R.N. MONOCITOS ADULTO) %
1 - 7	-	-
9	-	3.4
10-13	-	-
15-16	-	-
18, 21, 23	-	-
28	-	2.2
34	-	1.7
36	-	1.8
37, 38, 40	-	-
44	-	2.3
48	-	4.1
49	-	3.4
50	-	2.0
54	-	2.9
57	-	-
27	anti-M, anti-P	2.7
31	anti-Le ^a	6.0
51	anti-N	-
33	anti-M, anti-B	4.9
30	anti-JK ^b	4.9
35	anti-kell	1.6
55	anti-c, anti-E, anti-Fy ^b	3.0

Cuadro B

**RECIEN NACIDOS ICTERICOS INCOMPATIBLES CON SUS MADRES
(SABO) CON LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA**

NO. DE CASO	ACS. ANTI-ERITROCITOS (EN EL SUERO MATERNO):		ROSETAS (ERITROCITOS R.N. MONOCITOS ADULTO)
	DENTRO DEL SABO	FUERA DEL SABO	%
17	-	-	-
29	-	-	6.0
39	anti-A 1:16	-	-
25	anti-A 1:32	-	-
42	anti-A 1:32	-	-
19	anti-A 1:40	-	-
24	anti-A 1:64	-	-
26	anti-A 1:64	-	-
52	anti-A 1:64	-	5.1
47	anti-A 1:80	-	6.4
53	anti-A 1:80	-	5.9
46	anti-A 1:256	-	-
59	anti-A 1:640	-	2.9

Cuadro 9

**RECIEEN NACIDOS NO ICTERICOS INCOMPATIBLES CON SUS MADRES
(SABO) CON LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA**

NO. DE CASO	ACS. ANTI-ERITROCITOS (EN EL SUERO MATERNO):		ROSETAS (ERITROCITOS Y MONOCITOS DEL R.N.) %
	DENTRO DEL SABO	FUERA DEL SABO	
62	anti-A 1:2.5	-	-
105	anti-A 1:16	-	4.4
103	anti-A 1:128	-	-
114	anti-A 1:128	-	-
125	anti-A 1:128	-	-
115	anti-A 1:384	-	-
80	anti-B 1:2.5	-	-
63	anti-B 1:8	-	5.1
97	anti-B 1:8	-	-

Cuadro 10

**RECIEEN NACIDOS NO ICTERICOS COMPATIBLES CON SUS MADRES
(SABO) CON LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA**

NO. DE CASO	ACS. ANTI-ERITROCITOS FUERA DEL SABO (EN EL SUERO MATERNO)	ROSETAS (ERITROCITOS Y MONOCITOS DEL R.N. %)
60	-	-
64-79	-	-
82	-	-
84-87	-	-
88	-	2.4
89, 92-96	-	-
98-102	-	-
104	-	-
106-110	-	-
112, 113	-	-
116-124	-	-

Cuadro 11

**RECIEN NACIDOS NO ICTERICOS COMPATIBLES CON SUS MADRES
(SABO) CON LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA**

NO. DE CASO	ACS. ANTI-ERITROCITOS FUERA DEL SABO (EN EL SUERO MATERNO)	LINFOCITOTO- XICIDAD (EN EL SUERO MATERNO) %	ROSETAS (ERITROCITOS Y MONOCITOS DEL R. N.) %
61	-	40	-
83	-	10	-
90	-	20	-
111	-	5	-

Cuadro 12

**RECIEN NACIDOS NO ICTERICOS INCOMPATIBLES CON SUS MADRES
(SABO) CON LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA**

NO. DE CASO	ACS. ANTI-ERITROCITOS (EN EL SUERO MATERNO):		ROSETAS (ERITROCITOS Y MONOCITOS DEL R.N.) %
	DENTRO DEL SABO	FUERA DEL SABO	
81	anti-A 1:512	-	-
91	anti-B 1:2	-	-

Cuadro 13

**DATOS GLOBALES DE LOS RECIEN NACIDOS ICTERICOS
CON LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA**

C O N C E P T O	\bar{x}	S	LIMITES
No. DE CASOS: 10			
BILIRRUBINA INDIRECTA	8.2	1.8	4.3 - 10.3
HEMOGLOBINA	16.3	2.1	13.2 - 19.2
HENATOCRITO	52.7	7.18	43 - 67
RETICULOCITOS	3.3	2.3	1.3 - 9.4
No. DE CASOS QUE FORMARON ROSETAS: 9			

Cuadro 14

**DATOS GLOBALES DE LOS RECIEN NACIDOS NO ICTERICOS
CON LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA**

C O N C E P T O	\bar{x}	S	LIMITES
No. DE CASOS: 6			
BILIRRUBINA INDIRECTA	1.0	0.6	0.5 - 1.9
HEMOGLOBINA	16.6	1.5	15.2 - 19.2
HENATOCRITO	52	5.9	43 - 59
RETICULOCITOS	1.9	0.7	1.2 - 3.2
No. DE CASOS QUE FORMARON ROSETAS: ----			

Cuadro 15

**DATOS GLOBALES DE LOS RECIEN NACIDOS ICTERICOS
CON LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA**

C O N C E P T O	\bar{x}	S	LIMITES
No. DE CASOS: 49			
BILIRRUBINA INDIRECTA	9.8	2.5	1.8 - 14.0
HEMOGLOBINA	17.2	2.0	12.8 - 21.8
HEMATOCRITO	53.9	7.4	40 - 73
RETICULOCITOS	2.6	1.0	0.9 - 7.0
No. DE CASOS QUE FORMARON ROSETAS: 20			

Cuadro 16

**DATOS GLOBALES DE LOS RECIEN NACIDOS NO ICTERICOS
CON LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA**

C O N C E P T O	X	S	L I N I T E S
No. DE CASOS: 60			
BILIRRUBINA INDIRECTA	1.0	0.3	0.2 - 2.2
HEMOGLOBINA	16.0	1.5	12.8 - 19.2
HEMATOCRITO	53.2	8.1	39 - 70
RETICULOCITOS	2.0	0.8	0.6 - 4.2
No. DE CASOS QUE FORMARON ROSETAS: 3			

Cuadro 17

**BILIRRUBINA INDIRECTA Y LINFOCITOTOXICIDAD EN LOS
DIFERENTES GRUPOS DE RECIEN NACIDOS**

GRUPO	BILIRRUBINA INDIRECTA X
CONTROL	
R.N. COMPATIBLES CON LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA	0.6
R.N. COMPATIBLES CON LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA	0.9
R.N. INCOMPATIBLES CON LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA	1.7
R.N. INCOMPATIBLES CON LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA	1.0
ICTERICO	
R.N. COMPATIBLES CON LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA	7.8
R.N. COMPATIBLES CON LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA	9.7
R.N. INCOMPATIBLES CON LINFOCITOTOXICIDAD POSITIVA	8.7
R.N. INCOMPATIBLES CON LINFOCITOTOXICIDAD NEGATIVA	10.0

Cuadro 18

**BILIRRUBINA INDIRECTA Y ROSETAS EN LOS DIFERENTES
GRUPOS DE RECIEN NACIDOS**

G R U P O	BILIRRUBINA INDIRECTA \bar{x}
CONTROL	
R.N. COMPATIBLES CON ROSETAS POSITIVAS	0.8
R.N. COMPATIBLES CON ROSETAS NEGATIVAS	0.9
R.N. INCOMPATIBLES CON ROSETAS POSITIVAS	1.2
R.N. INCOMPATIBLES CON ROSETAS NEGATIVAS	0.9
ICTERICO	
R.N. COMPATIBLES CON ROSETAS POSITIVAS	8.2
R.N. COMPATIBLES CON ROSETAS NEGATIVAS	10.3
R.N. INCOMPATIBLES CON ROSETAS POSITIVAS	9.3
R.N. INCOMPATIBLES CON ROSETAS NEGATIVAS	10.1

Cuadro 19

**NUMERO DE EMBARAZOS Y SENSIBILIZACION A LOS
ANTIGENOS HLA EN EL GRUPO ICTERICO**

C O N C E P T O	No. DE CASOS	%
PRIMIPARAS	2	1.6
SECUNDIPARAS	5	4.0
MULTIPARAS	3	2.4
T O T A L	10	8.0

Cuadro 20

**NUMERO DE EMBARAZOS Y SENSIBILIZACION A LOS
ANTIGENOS HLA EN EL GRUPO NO ICTERICO**

C O N C E P T O	No. DE CASOS	%
PRINIPARAS	1	0.8
SECUNDIPARAS	3	2.4
MULTIPARAS	2	1.6
T O T A L	6	4.8

Cuadro 21

7.- DISCUSION DE RESULTADOS

En este trabajo las pruebas de laboratorio que se hicieron para tratar de encontrar características que pudieran servir para definir el papel de los anticuerpos linfocitotóxicos en la enfermedad hemolítica del recién nacido, nos permiten afirmar que en los pacientes no se encontró evidencia de que pudieran tener algún papel. En cambio, cuando los datos se agruparon globalmente se ve con claridad que la prueba de rosetas con monocitos resultó positiva en una proporción importante de los casos ictericos independientemente de que tuvieran linfocitotoxicidad positiva o negativa, mientras que en los recién nacidos no ictericos (controles) la prueba de rosetas positivas resultó muy poco frecuente. Por lo tanto podemos decir que la hiperbilirrubinemia del recién nacido en la que no se demuestra relación directa con la valoración de anticuerpos anti-A o anti-B inmunes o presencia de anticuerpos contra otros sistemas eritrocitarios, indistintamente con o sin anticuerpos linfocitotóxicos, las rosetas positivas sugieren un mecanismo alterno que influye en la hemólisis, cuya naturaleza desconocemos y sólo podemos plantear la hipótesis de que se trate de un anticuerpo inespecifico o especifico contra los eritrocitos fetales que coadyuva en la hemólisis "fisiológica" del recién nacido cuando ésta produce icterica.

Al observar los cuadros No. 6 y 9 llaman la atención algunos casos en donde hubo formación de rosetas en ausencia de

anticuerpos irregulares, esto hace suponer que los macrófagos probablemente están reconociendo un anticuerpo anti-eritrocito fetal formado por la madre. En el cuadro No. 10 se observan dos casos que contrastan con los demás por tener valores bajos de anti-A y anti-B y aun así tuvieron formación de rosetas, lo cual también viene a apoyar la posibilidad de que exista un anticuerpo anti-eritrocitos fetales que pudo ser el responsable de la formación de rosetas en estos casos. La posibilidad de un anticuerpo anti-eritrocitos fetales es una hipótesis justificable en tanto se ha descrito que los eritrocitos fetales desaparecen en el recién nacido paulatinamente para no ser detectables hacia los seis meses de edad, esto puede ser explicable porque la formación de anticuerpos en el recién nacido es relativamente tardía, es decir, éste recibe anticuerpos de la madre (IgG). Por lo tanto, si bien en los primeros días estos anticuerpos anti-eritrocitos fetales pueden provenir de la madre, la vida media de estas inmunoglobulinas limita su mecanismo de acción a los primeros 20 días de edad, esto sería una explicación para los niños no ictericos que posteriormente podrían formar anticuerpos contra neoantigenos de los eritrocitos fetales como ha sido descrito para los "eritrocitos del adulto" por Kay (50). Para los recién nacidos ictericos en los cuales no se encuentra una explicación clara de la presencia de la hemólisis, si bien existe el factor inmadurez fetal para la retención de la bilirrubina, la presencia de rosetas de eritrocitos del bebé más monocitos de adulto sugiere el paso

de anticuerpos IgG formados por la madre específicamente contra eritrocitos fetales.

Existen otros casos en donde a pesar de haber anticuerpos IgG no hubo formación de rosetas, como por ejemplo el caso No. 8 del cuadro No. 6 en donde a pesar de haberse encontrado un anticuerpo anti-Kell en el suero de la madre, los eritrocitos del recién nacido no fueron rosetados, lo cual puede ser explicable por varias posibilidades: el anticuerpo no tenía dominio específico para ser reconocido por los macrófagos o bien que existía poco anticuerpo, lo cual es factible ya que la prueba de coombs directo fue negativa en este caso, y otra es que los eritrocitos del recién nacido carecían del antígeno Kell y por ende los anticuerpos no se fijaron a ellos. Otro caso similar es el No. 41 del cuadro No. 7 en donde no hubo formación de rosetas aun existiendo valoración de anti-B inmune, esto puede ser debido a que este valor es más bajo que en los otros casos, además, de que se sabe que los eritrocitos de recién nacido tienen menor número de sitios antigénicos con respecto a los eritrocitos de adulto; esto hace suponer que en este caso la cantidad de anticuerpos así como el número de sitios antigénicos no fueron suficientes para dar lugar a la formación de rosetas.

Con respecto a los anticuerpos anti-HLA, aunque se ha demostrado que en los eritrocitos hay antígenos HLA, en los grupos de recién nacidos estudiados en este trabajo no hay relación entre los resultados de anticuerpos linfocitotóxicos positivos y la prueba de rosetas positivas ya que ésta se

observó en un gran número de casos con linfocitotoxicidad negativa, en otras palabras, las rosetas no son producidas por la presencia de anticuerpos linfocitotóxicos en la membrana del eritrocito. Los anticuerpos anti-A y anti-B tampoco son el origen de las rosetas, en tanto que estas se observaron en las parejas de madre-recién nacido ictericos compatibles.

Con respecto a la sensibilización de las mujeres embarazadas por los anticuerpos HLA en relación con el número de embarazos, encontramos que de 125 casos estudiados, sólo 16 presentaron anticuerpos anti-HLA frente a los linfocitos del bebé, lo que da una frecuencia global de sensibilización del 12.8%, notándose en el grupo icterico una frecuencia del 8 %, mayor con respecto al grupo control que fue de 4.8 %.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

8.-CONCLUSIONES

- 1.- En este trabajo el análisis del papel de los anticuerpos linfocitotóxicos en la ictericia del recién nacido demostró que no juegan un papel como anticuerpos hemolíticos.
- 2.- El análisis de su presencia en grupos de recién nacidos ictericos y no ictericos compatibles e incompatibles con sus madres desde el punto de vista grupo sanguíneo ABO, demostró que aunque fueron más frecuentes en los casos de incompatibles ictericos (18.8 %) y no ictericos (18.2 %), con respecto a los grupos de compatibles ictericos y no ictericos, no guardan relación con la ictericia.
- 3.- De los otros estudios practicados simultáneamente, destacó la presencia de formación de rosetas M (eritrocitos del recién nacido con monocitos de adulto) en los recién nacidos ictericos con una frecuencia de 49.2 %, mientras que los no ictericos presentaron una frecuencia de 4.5 %, sin que ello guardara relación con incompatibilidad al sistema ABO, con presencia de anticuerpos linfocitotóxicos, ni con anticuerpos irregulares fuera del sistema ABO.
- 4.- Por lo anterior en este trabajo se plantea la hipótesis de que en la hemólisis "fisiológica" del recién nacido cuando ésta produce ictericia, influye un anticuerpo antieritrocito fetal formado por la madre.

- 5.- Del análisis de la frecuencia de sensibilización de las mujeres embarazadas a los antígenos HLA con respecto al número de embarazos, podemos deducir que la máxima frecuencia de sensibilización se alcanza en las mujeres con un embarazo previo, no observándose un incremento progresivo de dicha frecuencia a medida que aumenta el número de embarazos.
- 6.- La observación de que no todas las madres hacen anticuerpos anti-HLA se confirma en este trabajo, dado que la presencia de estos anticuerpos fue de 12.8 % con respecto al total de casos estudiados (125 casos). Esta frecuencia es inferior a la observada en otros grupos étnicos (51).

9.-BIBLIOGRAFIA

- 1.- Schaffer AJ. Diseases of newborn. 2a. ed. Philadelphia:W.B. Saunders Company, 1966; 567.
- 2.- Davidsohn I, Henry JB. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6a ed. Barcelona: Salvat editores, 1981; 408, 109-112, 119.
- 3.- Robinson J, Sief C, Delia D. Expression of cell-surface HLA-DR, HLA-ABC and glycophorin during erythroid differentiation. Nature 1981; 289: 68-71.
- 4.- Zervas JD, Delamore JW. Observations on the survival of circulating reticulocytes. Br J Haematol 1972; 23: 453-460.
- 5.- Doughty RW, Goodier SR. Further evidence for HL-A antigens present on adult peripheral red blood cells. Tissue Antigens 1973; 3: 189-194.
- 6.- Nordhagen R, Orjasæter H. Association between HL-A and red cell antigens and auto-analyzer study. Vox Sang 1974; 26: 97-106.
- 7.- Panzer S, Mueller EG, Salama A y col. The clinical significance of HLA antigens on red cells. Survival studies in HLA-sensitized individuals. Transfusion 1984; 24: 486-489.
- 8.- Nordhagen R. Association between HLA and red cell antigens. IV. Further studies of haemagglutinin in cytotoxic HLA antisera. Vox Sang 1977; 32: 82-89.
- 9.- Morton HA, Pickles JA. Identification of further antigens on red cells and lymphocytes. Vox Sang 1971; 21: 141-153.
- 10.- Rosenfield RE, Rubinstein P. Hemagglutination by human anti-leukocyte serums. Vox Sang 1967; 13: 461-466.
- 11.- Palafox J. Metabolismo de la bilirrubina. II. Alteraciones primarias del metabolismo de la bilirrubina. Bol Med. Hosp Infant Mex 1988; 45: 263-269.
- 12.- Salas AM. Ictericia del recién nacido. Bol Med Hosp Infant Mex 1970; 27: 815-825.
- 13.- Mollison PL. Haemolytic disease of newborn. En: Blood transfusion in clinical medicine. 6a ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979; 666: 723-379.

- 14.- Nelson WE. Textbook of pediatrics. 9a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1969: 1049.
- 15.- Vengelen-Tyler V. The serologic investigation of hemolytic disease of the newborn caused by antibodies other than anti-D. En: hemolytic disease of the newborn. Arlington: American Association of Blood Banks, 1984: 145-167.
- 16.- Rodriguez MH, Quintanar GE y col. Esquemas y procedimientos inmunohematológicos. México: Banco de Sangre del Centro Médico Nacional, 1986: 4-9, 20, 53, 55-56.
- 17.- Dodd BE, Lincoln PJ. Inmunología de los grupos sanguíneos. México: El Manual Moderno, 1976: 166-169.
- 18.- Lorenzo NM, Jurado GE. Incompatibilidades sanguíneas materno-fetales. Bol Med Hosp Infat Mex 1969; 27: 261-263.
- 19.- Rapaport SI. Introducción a la hematología. Barcelona: Salvat Editores, 1980: 116.
- 20.- Oski FA, Naiman JL. Hematological problems of the newborn. London: W. B. Saunders Company, 1966: 126.
- 21.- Hugh FH, Stittes PD. Inmunología clínica. 2a ed. México: El Manual Moderno, 1980: 554.
- 22.- Jurado GE, Grisard N, La fototerapia en el manejo de la hiperbilirrubinemia neonatal. Bol Med Hosp Infant Mex 1969; 27: 141-145.
- 23.- Odell GB. Neonatal jaundice. Prog Liver Dis. 1976; 5: 457-475.
- 24.- Guyton CA. Tratado de Fisiología médica. 6a ed. México: Editorial Interamericana. 1985: 1031.
- 25.- Fleischner G, Arias IM. Recent advances in bilirubin formation, transport, metabolism and excretion. Amer J Med 1970; 49: 576.
- 26.- Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JW. Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chorionic habitual abortions in humans. Am J Obstet Gynecol 1981; 15: 987-999.
- 27.- De Horatius RJ. Lymphocytotoxic antibodies. Prog Clin Immunol 1980; 4: 151-154.

- 28.- Johanssen R, Agbedor A. Laboratory notes: HLA system. West-Germany 1976 June: 1.
- 29.- Roitt IM, Brotoff J, Male DK. Immunologia. Barcelona: Editorial Medsi, 1986: 4.8-4.11.
- 30.- Ziegler A, Pink JR. Structural similarity of major histocompatibility antigens on leucocytes and erythrocytes. Immunochimistry, 1978; 15: 515-516.
- 31.- Munro A, Susan B. Products of the major histocompatibility complex and their relationship to the immune response. Nature 1976 ; 264: 145-152.
- 32.- Kourilesky FM, Silvestre D. Immunoferritin study of the distribution of HLA antigens on human blood cells. J Immunol 1979; 106: 454.
- 33.- Silvestre D, Kourilsky FM, Niccolai MG. Presence of HLA antigens on human reticulocytes as demonstrated by electron microscopy. Nature 1970; 228: 67-68.
- 34.- Morton JA, Pickles MM, Sutton L. Correlation of the Bga Blood group with the HL-A7 leucocyte group: demonstration of antigenic sites on red cells and leucocytes. Vox Sang 1969; 17: 536-547.
- 35.- Nordhagen R, Aas M. Association between HLA and red cell antigens. VII. Survival studies of incompatible red blood cells in a patient with HLA-associated haemagglutinins. Vox Sang 1978; 35: 319-323.
- 36.- Soack E, Edidin M. The class I MHC antigens of erythrocytes: a serologic and biochemical study. J Immunol 1986; 136: 2834-2945.
- 37.- Lee JS, Trowsdale J, Rodmer WF. Synthesis of HLA antigens from membrane-associated messenger RNA. J Exp Med 1980; 152: 3s-9s.
- 38.- Nordhagen R. HLA antigens on red blood cells. Two donors with extraordinarily strong reactivity. Vox Sang 1979; 37: 209-215.
- 39.- Rivera R, Scornik JC. HLA antigens on red cells. Implications for achieving low HLA antigen content in blood transfusion 1986; 26: 375-381.
- 40.- Nordhagen R. Association between HL-A and red cell antigens. III. Studies of haemagglutinins in cytotoxic anti-HL-A7 and anti-HL-A5 related sera. Vox Sang 1975; 29: 33-35.

- 41.- Everett ET, Kao KJ, Scornik JC. Class I HLA molecules on human erythrocytes. Quantitation on transfusion effects. *Transplantation* 1987; 44: 123-129.
- 42.- Salama A, Mueller-Eckardt G, Strauss BE, Kiefel V. HLA-B7 on human red blood cells. Improved detection by a radioactive anti-IgB test. *Tissue Antigens* 1982; 19: 183-188.
- 43.- Nordhagen R. Association Between HLA and red cell antigens. V. A Further study of the nature and behaviour of the HLA antigens on red blood cells and their corresponding haemagglutinin. *Vox Sang* 1978; 35: 49-47.
- 44.- Dace JV, Lewis SM. *Practical hematology*. 5a ed. Churchill: J. and A., 1975: 102.
- 45.- Gambino SR. Bilirrubina (método de Jendrassik y Grof modificado). En: *Métodos seleccionados de análisis clínicos*. Barcelona: Salvat Editores, 1969; vol 5: 68-78.
- 46.- Zmijewski MCH, Fletcher JL. *Immunohematology*. 13a ed. New York: Apleton Century Crofts, 1978: 280-282.
- 47.- Massuet L, Armengol R. A new method of antibody elution from red cells using organic solvents. *Vox Sang* 1980; 343-344.
- 48.- Quintanar de RE, García NE, García CA y col. *Manual de procedimientos inmunológicos y administrativos del Banco Central de Sangre*. México: Banco Central de Sangre del IMSS, 1977; 45-49.
- 49.- Nance S, Garratty G. Correlations between an in vitro monocyte monolayer assay and autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion* 1982; 24: 410.
- 50.- Kay MMB. Senescent cell antigen: A red cell aging antigen. En: *Red cell antigens and antibodies*. Arlington: George Garraty. American Association of Blood Banks, 1986: 37-72.
- 51.- Goodman HS, Masaitis L. Analysis of the isoimmune response to leukocytes. I. Maternal cytotoxic leukocyte isoantibodies formed during the first pregnancy. *Vox Sang* 1967; 16: 97.

10.- APENDICE

Preparación de reactivos:

Solución de drabkin.- se disolvieron 2 g. de bicarbonato de sodio, 0.05 g de cianuro de potasio y 200 g de ferricianuro de potasio y se aforó a un litro con agua destilada.

Solución de nuevo azul de metileno al 1 %.- se pesó 1 g de nuevo azul de metileno y se disolvió en solución citrato-salina aforando a 100 ml.

Solución citrato-salina.- se preparó agregando un volumen de solución citrato de sodio al 3 % más 4 volúmenes de solución de cloruro de sodio al 0.9 %.

Solución de cloruro de sodio al 0.9 %.- se pesaron 0.9 g de cloruro de sodio y se disolvieron en agua destilada aforando a 100 ml.

Solución de citrato de sodio al 3 %.- se pesaron 3 g de citrato de sodio y se disolvieron en agua destilada aforando a 100ml.

Acido clorhídrico 0.05 N.- se pipetearon 4.2 ml. de HCL en un matraz aforado de un litro y se aforó con agua destilada.

Acido ascórbico al 5 %.- se pesaron 5 g de ácido l-ascórbico y se disolvieron en agua destilada aforando a 10 ml. (estable por 60 días a 4 °C y por 5 días a temperatura ambiente).

Mezcla alcalina.- se mezclaron 100 g de NaOH y 350 g de tartrato de sodio y potasio, se disolvieron en agua destilada y se aforó a un litro (estable 6 meses a temperatura ambiente).

Reactivo de cafeina I.- se calentaron 500 ml. de agua destilada entre 50 y 60°C en un matraz erlenmeyer y se agregaron 75 g de benzoato de sodio, 50 g de cafeina, 125 g de acetato de sodio granular. Se disolvieron y se enfriaron para aforar a un litro con agua destilada (estable 6 meses a temperatura ambiente).

Reactivo de cafeina II.- se calentaron 250 ml. de agua destilada entre 50 y 60°C en un matraz erlenmeyer y se agregaron 75 g de benzoato de sodio, 50 g de cafeina y 125 g de acetato de sodio granular. Se disolvieron y se enfriaron para aforar a 500 ml. con agua destilada (estable 6 meses a temperatura ambiente).

Diazo reactivo A.- se disolvieron 5 g de ácido sulfanilico en 60 ml. de HCl concentrado y se aforaron a un litro con agua destilada.

Nitrito de sodio al 20 %.- se pesaron 20 g de nitrito de sodio, se disolvieron y aforaron a 100 ml. con agua destilada. Se conservó en refrigeración en frasco ámbar.

Diazo reactivo B.- se diluyó 1:10 la solución de nitrito de sodio

al 20 % en agua destilada (estable por 24 horas a temperatura ambiente).

Diazo reactivo.- se mezcló 0.03 ml. de diazo-reactivo B por cada mililitro de diazo-reactivo A (estable 30 minutos a temperatura ambiente).

Mezcla de cafeína II.- se agregaron 0.8 ml. de cafeína II, 0.1 ml de diazo-reactivo y 0.15 ml. de ácido ascórbico al 5 % (se preparó al momento de usarse).

Medio de Hanks 10X:

- Solución A.- se pesaron 8 g de cloruro de sodio, 0.4 g de cloruro de potasio y 0.2 g de sulfato de magnesio heptahidratado, los cuales se disolvieron en 4 ml. de agua destilada.

- Solución B.- se pesaron 0.14 g de cloruro de calcio y se disolvieron en 0.5 ml. de agua destilada.

- Solución C.- se mezcló la solución A con la B y se llevó a 5 ml. con agua destilada.

- Solución D.- se pesaron 0.152 g de fosfato dibásico de sodio dodecahidratado, 0.05 g de fosfato monobásico de potasio anhidro, 1 g de glucosa, 0.01 g de rojo de fenol y se disolvieron en agua destilada aforando a 5 ml. Finalmente se mezclaron 5 ml. de la solución C con 5 ml. de

la solución D, se agregaron 4.766 g de hepes y se aforó a 100 ml. con agua destilada.

Medio de Hanks IX.- de la solución de medio de Hanks 10X se hizo una dilución 1:10 con agua destilada.

Mezcla de ficoll-hypaque.- se pesaron 1.92 g de ficoll, se le adicionaron 24 ml. de agua libre de hierro y se dejó que se disolviera sólo. Se midieron 6.56 ml. de hypaque al 50 % y se le agregaron 3.44 ml. de agua libre de hierro. Finalmente se mezcló el ficoll con el hypaque.

Complemento de conejo restituido.- se pesaron 50 mg. de complemento de conejo liofilizado y se disolvieron en 0.75 ml. de agua destilada.

Suero amortiguado.- se recolectaron sueros de 5 varones "AB" Rho(D) positivos, se mezclaron e inactivaron a 56°C en baño maría durante 30 minutos. Se tomaron 0.9 ml. de estos sueros y se mezclaron con 0.3 ml. de medio de Hanks 4X.

Medio de Hanks 4X.- de la solución de medio de Hanks 10X se hizo una dilución 1:2.5 con agua destilada.

Mezcla de cloroformo-tricloroetileno.- se preparó volumen a volumen.

Saliva secretora de sustancia A o B.- La persona secretora de sustancia A o B confirmada, se enjuagó la boca con agua y salió en un vaso de precipitado de 50 ml. inmediatamente se

transfirió en tubos de ensaye de 13 x 100 mm. a los que se les tapó con algodón la boca del tubo, se colocaron en un baño de agua a ebullición durante 10 minutos procurando que el agua cubriera el nivel de la saliva contenida en los tubos y a la vez que no les entraría agua. Se enfriaron los tubos al chorro de agua y se centrifugaron por 10 minutos a 4000 rpm (3580 G), se tomó el sobrenadante con una pipeta pasteur y se transfirió a tubos de 10 x 75 mm. en alícuotas de 40 gotas. Se almacenaron a -20°C para su uso en un mes.

No. DE CELULA	GPO. SANG.	ANTIGENOS PRESENTES																			
		C	D	E	e	e	M	N	S	s	P	Fy ^a	Fy ^b	K	k	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	Di ^a	Di ^b
1	"O"	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
2	"O"	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
3	"O"	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
4	"O"	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
5	"O"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
6	"O"	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
7	"O"	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
8	"O"	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
9	"O"	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
10	"O"	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+

Cuadro 22

CARTA DE ERITROCITOS DE FENOTIPO CONOCIDO REALIZADA EN EL BANCO CENTRAL DE SANGRE DEL CENTRO MEDICO NACIONAL DEL I.M.S.S.