

Guillermo Escamilla-Guerrero^{1a}, Juan Carlos García-Rosales^{1b}

Resumen

La detección de los antígenos eritrocitarios más significativos presentes en cada uno de los individuos es fundamental cuando se lleva a cabo una transfusión o un trasplante. La detección a la fecha se realiza mediante métodos serológicos convencionales a través de la reacción de antígeno-anticuerpo. Pero se pueden presentar varios inconvenientes dependiendo de la patología en estudio, lo cual limita la disponibilidad de los hemocomponentes. Los métodos moleculares, como la genotipificación, son una herramienta que complementa la sensibilidad y especificidad y que han venido a revolucionar la inmunohematología en el banco de sangre, lo cual permite no solo la detección de antígenos eritrocitarios sino también la de antígenos plaquetarios. Estas metodologías son aplicables en pacientes y en donantes a gran escala, partiendo de las variantes alélicas presentes en cada uno de los genes que codifican para los antígenos de interés clínico, utilizando los sistemas de microarreglos o los sistemas basados en partículas marcadas con sondas específicas o sus variantes que permiten un análisis desde el punto de vista inmunohematológico.

Abstract

The detection of the most significant erythrocyte antigens present in each one of the individuals is fundamental when carrying out a transfusion or a transplant. Detection to date is performed by conventional serological methods through the antigen-antibody reaction. But several drawbacks may arise depending on the pathology under study, limiting the availability of blood components. Molecular methods such as genotyping is a tool that complements sensitivity and specificity and has come to revolutionize immunohematology in the blood bank, allowing not only the detection of erythrocyte antigens but also platelet antigens. These methodologies are applicable in patients and in large-scale donors, starting from the allelic variants present in each of the genes that code for the antigens of clinical interest, using microarray systems or systems based on particles labeled with specific probes or their variants that allow an analysis from the immunohematological point of view.

¹Limogen, Laboratorio de Innovación Molecular y Genética, Laboratorio de Biología Molecular e Inmunohematología. Tlalnepantla, Estado de México, México

ORCID: [0000-0002-8963-2746^a](https://orcid.org/0000-0002-8963-2746), [0000-0003-3674-010X^b](https://orcid.org/0000-0003-3674-010X)

Palabras clave

Genotipificación
Sondas de ADN
Antígenos Plaquetarios Humanos
Plaquetas

Keywords


Genotyping
DNA Probes
Human Platelet Antigen
Blood Platelets


Fecha de recibido: 04/07/2022

Fecha de aceptado: 19/08/2022

Comunicación con:

Guillermo Escamilla Guerrero

 guillermo.escamilla@limogen.com.mx

 55 5362 0299 ext. 704

.....
Cómo citar este artículo: Escamilla-Guerrero G, García-Rosales JC. Genotipificación y sus aplicaciones, una mirada hacia el futuro. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2023;61 Supl 1:S37-45.

Antecedentes

Cada individuo es diferente desde el punto de vista físico (fenotipo), pero desde el punto de vista genético (genotipo) es muy parecido a los demás. La necesidad de conocer el genotipo o un mapa genético humano surgió desde la década de 1930 con los elementos científicos y tecnológicos con los que se contaba en ese momento. En el desarrollo de la genómica se distinguen dos fases o etapas: una primera etapa, en la que se realizaron los trabajos de secuenciación del genoma y que se conoce como genómica estructural, y una segunda etapa, en la que se trata de estudiar las funciones que tienen las secuencias ya conocidas y que se define como genómica funcional.¹ En 1920 Hans Winkler fusionó las palabras *gen* y *-ome* y generó la palabra *genome*, que se traduciría como conjunto completo, esto con el fin de asignarlo a la secuencia completa de ADN de cada célula. Pensemos por un momento que el genoma es como un edificio de biblioteca, los cromosomas como los estantes donde se ubican los libros, los genes ubicados dentro de estos libros y una amplia gama de letras que serían los nucleótidos.

Fue hasta febrero del 2001 cuando el proyecto del genoma humano (PGH) se convirtió en una realidad. Contiene aproximadamente 3000 millones de nucleótidos, algo así como 20,000 genes. Esto se traduce como el 1% de la longitud total del genoma, el cual produce proteína; el 99% son secuencias no codificantes (no producen proteínas) y su función puede ser la de reguladoras o pseudogenes. Más de la mitad del genoma son secuencias repetitivas (huella genómica). Este proyecto arrojó datos muy interesantes y uno de ellos es que el genoma humano es 99.99% idéntico entre individuos, lo cual significa que entre dos personas cualesquiera hay más de 20 millones de nucleótidos de diferencia, que se agrupan en 1400 regiones del genoma. Esta variación justifica las diferencias fenotípicas.² El trabajo realizado en la secuenciación del genoma humano, así como el impacto generado en este campo por la evolución de las técnicas de secuenciación, partiendo de la técnica de Sanger a la secuenciación de próxima generación (*next generation sequencing*: NGS) han permitido establecer la mayoría de los genes y polimorfismos involucrados en la expresión de los casi todos los antígenos correspondientes a los sistemas de grupos sanguíneos conocidos a la fecha.³

Sistemas de grupos sanguíneos

Las diferencias antigénicas se observan en la membrana del eritrocito, donde se localizan los antígenos para cada uno de los sistemas sanguíneos reportados actualmente. Estos pueden ser glicoproteínas o glicolípidos. Se conocen las bases moleculares, sus genes y su localización cromosómica, que llevan a la formación de la mayoría de los anti-

genos que integran los grupos sanguíneos. La presencia de estos antígenos y sus variantes (polimorfismo) son el reflejo del producto de la expresión de los genes de forma directa, como el caso del sistema Rh o a través de un producto secundario como en el sistema ABO, el cual depende de la actividad enzimática de la glucosiltransferasa para la expresión de estos antígenos. Los antígenos que se comparten entre la mayoría de los individuos son públicos o de alta incidencia, los que se localizan en determinados individuos o poblaciones son antígenos privados o de baja incidencia.⁴

Con los avances en la biología molecular en inmunohematología, hoy la Sociedad Internacional de Transfusión de Sangre (ISBT por sus siglas en inglés) tiene identificados 43 sistemas de grupos sanguíneos reconocidos que contienen 345 antígenos de glóbulos rojos.^{5,6} Un sistema de grupos sanguíneos consta de uno o más antígenos controlados en un único *locus* de genes, o por dos o más genes homólogos muy estrechamente vinculados con poca o ninguna recombinación observable entre ellos. Las colecciones consisten en antígenos relacionados serológica, bioquímica o genéticamente, que no cumplen con los criterios requeridos y contienen 14 antígenos. La serie 700 contiene 17 antígenos con una incidencia inferior al 1% y no pueden ser incluidos en un sistema o colección; sucede lo mismo con la serie 901, la cual contiene tres antígenos con una incidencia superior al 90%.^{6,7} Todos estos son capaces de expresar antígenos en la superficie del eritrocito. La mayoría de ellos han sido clonados y secuenciados. Entre ellos podemos mencionar el sistema Duffy, cuyos antígenos están codificados por el gen *ACKR1*, que está localizado en el cromosoma 1q21-q22 y se compone de dos exones. Hay sistemas sanguíneos mucho más complejos, como el sistema MNS, integrado por 49 antígenos codificados por dos genes, el gen *GYP A* y el gen *GYP B*, con siete y cinco exones, respectivamente, localizados en el cromosoma 4q31.21, lo que le confiere una gran variabilidad antigénica.^{7,8} Esto significa que las bases moleculares de estos sistemas de grupos sanguíneos ya son conocidas y en su mayoría resultan del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés: *single nucleotide polymorphism*). El SNP se presenta en al menos el 1% de la población y supone el 90% de todas las variaciones del genoma de un individuo; aparece en este entre cada 100 y 300 bases en promedio.⁹ Estas secuencias son las causantes de la mayoría de los antígenos de grupos sanguíneos. Se dan por la sustitución de un nucleótido por otro, que conlleva la sustitución de un aminoácido en la proteína final y se ve reflejado en la variación antigénica expresada en el fenotipo eritrocitario. De tal manera que los polimorfismos y particularmente las secuencias SNP pueden llevar cambios en las secuencias reguladoras del genoma, como puede ser en los promotores o sitios de unión a factores de transcripción, lo cual afecta las síntesis de proteínas (cuadro I). Uno de los sistemas más estudia-

dos es la variación que se puede encontrar en la expresión de los antígenos del sistema Duffy, particularmente con la mutación -67T>C, asociada del fenotipo nulo (Fya-, Fyb-); ambas se localizan en la región promotora del gen e implican la no expresión del antígeno en los eritrocitos pero sí en otros tejidos, con lo que adquieren una gran importancia no solo desde el punto de vista transfusional sino como un mecanismo de protección contra el *Plasmodium vivax*. De igual forma sucede con la presencia del alelo FY*02W.01, donde la expresión del antígeno Fyx implica una no detección del antígeno Fyb detectable por métodos serológicos y, por lo tanto, un riesgo mayor de aloinmunización. Los sistemas sanguíneos presentan modificaciones alélicas y dentro de estas se menciona que hay aproximadamente 1545 alelos en 44 genes. Dichas modificaciones están suscitadas por los diferentes fenotipos eritrocitarios y se van a encontrar reportadas en la página de la ISBT y en la base de datos del *Blood Group Antigen Gene MUTation* (BGMUT).^{10,11,12}

Cuadro I Polimorfismos significativos en sistemas sanguíneos^{13,14}

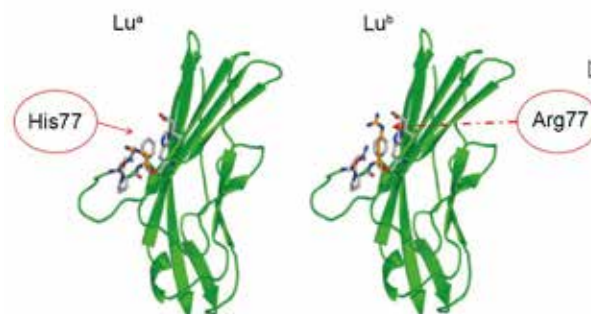
	Sistema	Cambio del nucleótido	Exón	Sustitución del antígeno
Un solo SNP	Sistema MNS	T143C > T(Met29Thr)	B4	S → s
	Sistema Rh	307C > T(Ser103Pro)	2	C → c
	Sistema Kell	578C > T(Thr193Met)	6	K1 → K2
	Sistema Duffy	125G > A(Gly42Asp)	2	Fy ^a → Fy ^b
	Sistema Kidd	838G > A (Asp280Asn)	9	Jk ^a → Jk ^b
	Sistema Diego	2561C > T(Pro854Leu)	19	Di ^a → Di ^b
	Sistema Lutheran	230G > A(Arg77His)	3	Lu ^a → Lu ^b
	Sistema Lewis	299G > A(Arg100Gln)	1	Lw ^a → Lw ^b
	Sistema Dombrock	A793G (Asn265Asp)	2	Do ^a → Do ^b

Las modificaciones alélicas que se presentan se ven reflejadas en la estructura del antígeno derivadas de la sustitución de aminoácidos.

Un ejemplo es la proteína del antígeno Lutheran: si observamos, la estructura es prácticamente la misma tanto para el Lu^a como para el Lu^b; la única diferencia radica en que en la posición 77 que en la variante Lu^a posee el aminoácido histidina (His) y en la misma posición cambia por el aminoácido arginina (Arg), que produce el antígeno Lu^b

(figura 1). Esto ocasiona una modificación en la estructura, particularmente en esa región y, por tanto, que se tengan características antigénicas diferentes. Con base en esto se han desarrollado diversos ensayos moleculares para predecir el fenotipo de los antígenos de los grupos sanguíneos.

Figura 1 Estructura del antígeno Lutheran



Diferencias estructurales en los antígenos Lu^a y Lu^b. Imagen modificada de Mankelaw *et al.*¹³

Sistemas de grupos plaquetarios

En la membrana plaquetaria se encuentran antígenos de tipo sanguíneo ABO, antígenos leucocitarios humanos (HLA), antígeno Nak localizado en CD36 y, por supuesto, antígenos propios de las plaquetas. Se les conoce como antígenos específicos de plaquetas (antígenos HPA) y son estructuras polimórficas ubicadas en glicoproteínas de la membrana plaquetaria.^{7,14}

Los HPA se describieron por primera vez a fines de la década de los cincuenta y principios de la década de los sesenta. Históricamente los antígenos plaquetarios HPA se nombraban en función del nombre del paciente donde se encontraba y era identificado el anticuerpo; los antígenos deberían nombrarse con las iniciales HPA, acrónimo de *human platelet antigens*. En el 2003, Metcalfe establece que un antígeno plaquetario específico es aceptado como tal cuando sus bases moleculares son conocidas.

La ISBT clasifica estos sistemas de forma numérica, de acuerdo con el momento de su publicación y alfabéticamente para referirse a su prevalencia en la población que se estudia. En algunas revisiones bibliográficas se sigue utilizando la nomenclatura convencional.⁶

Se han descrito 42 antígenos HPA que se distribuyen en 35 sistemas cuya denominación va de HPA-1 a HPA-35. Estos se expresan en seis glicoproteínas plaquetarias diferentes: GPIIb, GPIIIa, GPIIb, GPIIb, GPIa y CD109.¹⁵

Los sistemas HPA se clasifican en seis sistemas bialélicos, HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 y HPA-15, y los otros veintitrés sistemas son monoalélicos,¹⁶ todos los cuales se formaron por la sustitución de un solo aminoácido, que fue causada por SNP en los genes que los codifican.¹⁶ Una excepción es el aloantígeno plaquetario HPA-14, que está formado por una delección.^{17,18} Los cambios de aminoácidos resultantes de estos SNP inducen cambios en la estructura de la glicoproteína para formar antígenos que pueden provocar anticuerpos por medio de la exposición del embarazo o las transfusiones de plaquetas.¹⁹ La frecuencia de antígenos plaquetarios no varía mucho si se compara con los antígenos eritrocitarios, de tal manera que el antígeno HPA1a está presente en la mayoría de las poblaciones y los antígenos HPA1b son menos frecuentes. De forma general podemos decir que los alelos *a* son de alta frecuencia mientras que los alelos *b* son de baja frecuencia.

Papel del laboratorio de inmunohematología

A partir de Karl Landsteiner, la hemaglutinación se maneja como el estándar de oro para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo, esto es, anticuerpos y antígenos interactúan sobre la membrana del eritrocito. Esto ofrece ventajas como su costo, la facilidad de ejecución, así como una sensibilidad y especificidad adecuadas. Con el conocimiento de las bases moleculares de los antígenos eritrocitarios humanos, se desarrolla una alternativa para incrementar la sensibilidad en la detección de algunos antígenos a gran escala con el proyecto *The Blood Gen* en el que utilizan una *PCR multiplex* que permitiría un gran conocimiento de la diversidad antigénica, reducción de la alo sensibilización y, por lo tanto, una mejor compatibilidad sanguínea.²⁰ Esta prueba complementaria, basada en la tecnología de ácidos nucleicos, da un gran paso a la *inmunohematología molecular* en los bancos de sangre. Esta se refiere al uso de la genotipificación aplicada a los genes que codifican los antígenos de los glóbulos rojos o plaquetas. Se trata de un método indirecto para predecir el fenotipo eritrocitario o plaquetario en pacientes con patologías como las talasemias, drepanocitosis, o discrepancias en los grupos sanguíneos. El inconveniente de esta metodología es su costo, el cual ha limitado su penetración en los bancos de sangre, por lo que es factible que con más ensayos clínicos con los que se haga más familiar este proceso y las modificaciones de logística regulatorias necesarias, se logrará la implementación y la adopción gradual de esta tecnología.^{21,22,23,24}

Las pruebas de laboratorio sobre plaquetas comprenden la interacción del antígeno con el anticuerpo y esto se puede realizar por técnicas automatizadas o semiautomatizadas. Ambas metodologías son complementarias. Dentro

del conjunto de pruebas, se incluyen las pruebas cruzadas plaquetarias y el rastreo de anticuerpos plaquetarios.

De forma general, los estudios se enfocan en el análisis de anticuerpos plaquetarios HPA, HLA, las pruebas cruzadas y en menor medida en la presencia o ausencia de antígenos HPA. La presencia de anticuerpos HLA obliga a la búsqueda de unidades compatibles a este sistema con pruebas cruzadas plaquetarias compatibles. El hallazgo de anticuerpos irregulares plaquetarios obliga a buscar donantes con fenotipo negativo.

Dentro de las metodologías más estudiadas tenemos la MAIPA. Esta técnica (*monoclonal antibody immobilisation of platelet antigens*) está basada en el uso de anticuerpos monoclonales específicos contra las glicoproteínas (GP), en las cuales se localizan los antígenos plaquetarios. La prueba inicial de suero o plasma para la detección de anticuerpos reactivos contra plaquetas IgG e IgM se realiza utilizando plaquetas intactas de donantes seleccionados mediante las técnicas basadas en la citometría de flujo (inmunofluorescencia indirecta), las técnicas de Elisa modificadas y aquellas que toman como base en los sistemas Luminex. Las técnicas más socorridas son en fase sólida mejor conocidas como técnicas de captura y se utilizan para detectar anticuerpos antiplaquetarios y para la realización de pruebas cruzadas plaquetarias.²⁵

Ventajas de la genotipificación

En el manejo transfusional de pacientes que son sujetos a transfusiones crónicas pueden presentarse diversas eventualidades, como, por ejemplo:

- a) La identificación de la presencia de eritrocitos circulantes del donante de la transfusión anterior, los cuales pueden impedir el fenotipado exacto del grupo sanguíneo a menos que el fenotipado se realice antes del inicio de la transfusión.
- b) La exposición de estos pacientes con eritrocitos de donante portadores de antígenos extraños aumenta el riesgo de aloinmunización.
- c) La formación de aloanticuerpos clínicamente significativos puede provocar reacciones transfusionales hemolíticas durante las transfusiones posteriores.
- d) La presencia de uno o varios anticuerpos retrasa aún más el proceso para encontrar concentrados eritrocitarios compatibles.
- e) La aloinmunización acorta la vida media de los eritro-

citosis transfundidos y, por ende, aumenta la frecuencia de los requisitos de transfusión. Esto puede provocar un incremento en la carga de hierro corporal.

- f) La refractariedad plaquetaria, la cual está asociada a neoplasias malignas, enfermedades autoinmunes y pacientes bajo protocolo de trasplante de médula ósea, entre otros.

Los eritrocitos y las plaquetas con un antígeno en particular pueden provocar una respuesta inmune al ser transfundidos a alguien que carece de este antígeno. El anticuerpo producido puede generar la incompatibilidad transfusional entre las duplas donante/paciente, materno-fetal, así como anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia aloinmune fetal/neonatal. La respuesta se clasifica como inmediata o tardía y en algunos casos puede conducir a la muerte. Los reportes de la tasa de aloimmunización²⁶ muestran que en poblaciones sujetas a transfusiones frecuentes, como en pacientes con talasemia, oscilan entre el 5.3% y el 37%,^{27,28,29} en tanto que en drepanocitosis es hasta un 40%.

Algunos reportes referentes a anticuerpos antiplaquetarios en refractariedad señalan que los más frecuentes son los anticuerpos dirigidos al sistema HLA de clase I para los alelos A, B y C. En un inicio se reportaban hasta en un 80% de los pacientes hospitalizados y actualmente se estima que hasta un 50% llegan a presentar anticuerpos anti-HLA. En el caso de los anticuerpos HPA, estos son reducidos y se estima que entre el 3 y el 8% la refractariedad se presenta por los anticuerpos HPA1b, HPA5b y en menor medida HPA1a.²⁷

En eritrocitos, el método de hemaglutinación es la referencia para la determinación de antígenos asociados a grupos sanguíneos. Sin embargo, este método tiene ciertas limitaciones (disponibilidad y especificidad de los reactivos inmunológicos) cuando se trata de la determinación de antígenos de grupos sanguíneos raros. Con plaquetas, las técnicas actuales permiten la detección de anticuerpos antiplaquetarios. Estas metodologías se complementan con la genotipificación plaquetaria.

Inmunohematología molecular

Los ensayos aplicados en inmunohematología molecular utilizan biosensores de ADN o micromatrices en fase sólida o matrices de perlas suspendidas. Son de alto rendimiento y tienen el potencial que permite analizar varias muestras a la vez.²⁶ Asocian un paso de *PCR multiplex* seguido de detección con sondas específicas correspondientes a los polimorfismos analizados. En las pruebas de diagnóstico molecular se ha demostrado que no se requieren glóbulos rojos o plaquetas para el genotipado; la fuente de ADN se extrae de células que no necesariamente expresan el anti-

geno. Un ejemplo de ello son los leucocitos o las células epiteliales bucales entre otros. Asimismo, se ha confirmado de manera confiable que el DNA del donante no es detectable después de la transfusión de un hemocomponente leucorreducido, en tanto que al emplear productos parcialmente leucorreducidos puede presentarse un quimerismo hasta de un 1.5%. Esto implica que las células transfundidas no son necesariamente una limitante^{28,29,30} y con el "genotipo" obtenido se predice el fenotipo eritrocitario.

En el mercado se encuentran dos metodologías empleadas para diagnósticos *in vitro* que están aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos; con base en los estudios realizados, se ha demostrado que no requieren confirmación mediante fenotipado serológico:

- **Precise Type^{30,31,32,33,34,35} (*Microarray Technology*):** incluye 24 polimorfismos asociados con 35 antígenos eritrocitos humanos de Rh (C/c, E/e, V, VS), Kell (K/k, Jsa/Jsb, Kpa/Kpb), Duffy (Fya/Fyb, Fy nulo debido a la mutación GATA, Fyb débil), Kidd (Jka/Jkb), MNS (M/N, S/s, U), Lutheran (Lua/Lub), Dombrock (Doa/Dob, Hy, Joa), Landsteiner-Wiener (LWa/LWb), Diego (Dia/Dib), Coltan (Coa/Cob) y Scianna (Sca/Scb) y detección de la mutación de la hemoglobina S en el gen de la globina β. Este sistema demuestra una concordancia general superior al 99.4% con la serología y un 99.8% de concordancia con la secuenciación del ADN, y obtuvo la aprobación de la FDA de en mayo de 2014.
- **ID Core XT^{33,34} (*Suspension Array Technology*):** BLOODchip ID Core XT tipos ABO (33 haplotipos), RHD (91 haplotipos, incluidos varios alelos que causan D-negativo, D parcial, D débil y fenotipos Del), RHCE (nueve alelos), KEL (ocho alelos), JK (cuatro alelos, incluidos dos alelos nulos JK), FY (cuatro alelos), MNS (nueve haplotipos), DI, DO y CO. Esta plataforma demostró una precisión global del 99.8%, con la excepción de ABO. BLOODchip tiene la marca CE en la Unión Europea; sin embargo, fue aprobado por la FDA para propósitos de diagnóstico en los Estados Unidos el 11 de octubre de 2018.

También se cuenta con sistemas para abarcar los genes con muchas variantes, como RHD y RHCE, tanto en *Microarray Technology* como en *Suspension Array Technology*.³⁵

El primer sistema utiliza para su lectura la microscopía de epifluorescencia, en tanto que el segundo emplea tecnología de luminex. La interpretación del genotipo y predicción del fenotipo se realiza empleando un programa de análisis de imágenes patentado. Estas pruebas abarcan un promedio de 11 y 10 sistemas de grupos sanguíneos con 36 antígenos cada uno de ellos, los cuales son considerados clínicamente significativos.

Actualmente, el LIMOGEN (laboratorio que utiliza ambas plataformas) ha apoyado a diversos clientes con el estudio complementario de genotipificación en resolución de casos problema:

- a) Enfermedad hemolítica perinatal: triada padre/madre/paciente.
- b) Trasplante de médula ósea: triada padre/madre/paciente.
- c) Anemia hemolítica autoinmune: tres casos.
- d) Discrepancias en fenotipo: tres casos.
- e) D parcial, D débil y de otros fenotipos Rh poco comunes: cinco casos.

Otras plataformas disponibles en el mercado se han anexoado a este movimiento, como BioTrove (OpenArray), GTI (Red Cell EZ Type) y SNaPshot TM (ABI, Foster City, CA).³⁶ Estas se caracterizan por presentar una matriz de DNA que permite una adición fácil de sondas que detecta los cambios de nucleótidos, anexando a ello la opción de automatización con un tiempo mínimo de manipulación. Se consideran plataformas confiables, consistentes, flexibles, específicas, sensibles y de costo relativamente adecuado.

La revolución que esperamos es la generada por la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) o segunda generación, que es la tecnología de secuenciación que sucedió a lo que se conoce como primera generación, basada en el método de dideoxi de Sanger. La repercusión de esta es que la secuenciación del genoma es más barata y rápida. Sin embargo, se nos anuncia una tercera generación: los métodos de lectura larga/tercera generación (*long-read/third-generation sequencing technologies*), que pueden producir ensamblajes de genomas de una calidad sin precedentes. Esta tecnología será capaz de detectar modificaciones epigenéticas y permitir la secuenciación de transcripciones completas.³⁷

Aplicaciones de la genotipificación

La aplicación de la genotipificación está dirigida a determinar el fenotipo más probable que se va a expresar tanto en las membranas eritrocitarias como en las plaquetarias. Incluye el análisis de los antígenos “más comunes”, como sus variantes más frecuentes. En el estudio no solo se analizan las muestras de pacientes sino también el estudio en donantes.

Muchos de los pacientes que tienen la necesidad de lle-

var un soporte transfusional pueden generar anticuerpos irregulares en menor o mayor medida y esto va a depender de varios factores como la edad, el género, número de transfusiones, tipo de hemocomponente transfundido, antecedentes ginecológicos y de la patología que esté cursando. Estos anticuerpos pueden ser de dos tipos: aloanticuerpos y autoanticuerpos, y pueden estar presentes solo como aloanticuerpos o en combinación con los autoanticuerpos, que es quizás el peor de los casos.

Los beneficios anexos de estas plataformas en el uso clínico actual es la capacidad de ayudar en circunstancias inmunohematológicas donde los métodos tradicionales de hemaglutinación son difíciles o imposibles de llevar a cabo. Algunos ejemplos de esto son los siguientes:³⁸

- Profilaxis de alosensibilización en condiciones crónicas dependientes de transfusión: es relevante la realización del genotipo para el manejo de pacientes con enfermedades como drepanocitosis, talasemias y síndromes mielodisplásicos.^{39,40} Con el uso de unidades de sangre más compatibles, disminuye el riesgo de reacciones adversas.^{41,42,43,44} En el uso del genotipo para la aplicación de transfusión “profiláctica” hay que cuidar los antígenos inmunodominantes, ya sea por el empleo de un fenotipo corto/limitado (C/c, E/e, K) o uno extendido (C/c, E/e, K, Fya/b, Jka/b, S/s). Los resultados son muy alentadores. Hay que tener en cuenta que el genotipo permite una mejor selección de unidades compatibles para los pacientes y beneficios clínicos para ellos.⁴⁴
- Panaglutinación o reactividad serológica inespecífica o confusa.
- Anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI), ya que al tener una alta concentración de autoanticuerpos, no solo libres en el suero, sino adheridos al eritrocito, hay la presencia, por lo tanto, de Coombs directos positivos ante los que los métodos convencionales, como las eluciones, no permiten tratar la muestra, lo cual dificulta su estudio e imposibilita determinar con certeza el fenotipo. Si aunado a esto ya recibieron transfusión reciente, se imposibilita el estudio, pues la presencia de autoanticuerpos puede enmascarar uno o varios aloanticuerpos. Por lo general, para este tipo de pacientes es fundamental determinar el fenotipo eritrocitario. En el 2017 en la revista *Transfusión*⁴⁵ se mencionó como parte del protocolo de estudio de autoanticuerpos calientes el uso de la genotipificación como una alternativa complementaria a las técnicas ya existentes para este tipo de patologías.
- Discrepancia de tipificación serológica en antígenos de baja expresión.

- Búsqueda o confirmación de fenotipos raros: identificar donantes negativos para el antígeno cuando no se dispone de antisueros de tipificación o son débilmente reactivos, por ejemplo, anti-Do^a, -Do^b, -Hy, -Jo a, -V, -VS.⁴⁶
- La caracterización genómica de los llamados fenotipos D parcial, D débil y de otros fenotipos Rh poco comunes: el genotipado de RH se ha utilizado para identificar alelos de RH alterados y para predecir si los anticuerpos Rh son autoanticuerpos o aloanticuerpos, y también en aquellos pacientes con haplotipos variantes de RH que carecen de un antígeno Rh convencional. Se han descrito diversas variantes D. Estas se organizan en tres grupos: D parcial, sin epítomos D inmunogénicos y con tendencia al desarrollo de anti-D; D débil, con densidad de antígeno reducida y sin riesgo de aloinmunización, y DEL, donde el antígeno D solo puede identificarse en la membrana de los eritrocitos después de la adsorción con anti-D seguida de elución. Los análisis moleculares iniciales destinados a identificar posibles alelos RHD parciales y débiles se realizaron mediante la amplificación de los exones 3-7 y 9 de RHD.^{47,48} El soporte transfusional único ha sido posible con la expansión de la detección molecular de donantes a gran escala para identificar donantes con variantes de RH para la compatibilidad de genotipos.⁴⁹
- El trabajo con donadores Rh negativos ha demostrado la presencia de alelos variantes que potencialmente aloinmunizan a receptores RhD negativos.
- Genotipificación de donador y receptor en trasplante de médula ósea.
- Genotipificación en pacientes candidatos de soporte transfusional crónico.
- Aporte transfusional en paciente recién transfundido y que además presenta una mezcla de anticuerpos.
- La selección adecuada de donantes que previene la aloinmunización contra HPA: los trastornos plaquetarios causados por anticuerpos incluyen la trombocitopenia inmunitaria, la trombocitopenia aloinmune fetal/neonatal y la trombocitopenia inmunitaria inducida.

Los estudios moleculares reportados en población mexicana son pocos y se enfocan particularmente en donadores recurrentes tanto para el estudio de antígenos eritrocitarios como para el de plaquetarios, como se observa en el estudio realizado con 99 donadores recurrentes en el que se utilizó la PCR-SSP. Se evaluó la frecuencia fenotípica de los antígenos plaquetarios HPA y los resultados permiten conocer los fenotipos más frecuentes y su frecuencia bialélica, de tal manera que la frecuencia es mayor para el alelo

b (de alta incidencia) comparado con los reportados en la literatura.⁵⁰ Para el caso de los fenotipos eritrocitarios se buscaba la concordancia entre el genotipo y el fenotipo en una muestra de 110 donadores mediante PCR-SSP y en donde se observó concordancia para los sistemas Kell (K2), Duffy (Fy^a, Fy^b) y Kidd (Jk^a Jk^b) entre el fenotipo y el genotipo. Los estudios no concordantes pueden deberse a los diferentes mecanismos moleculares⁵¹ durante los procesos de transcripción y traducción del gen, así como a las variaciones alélicas presentes. La aplicación de la genotipificación como una prueba complementaria al análisis serológico se ve reflejada durante el análisis de la incompatibilidad sanguínea, donde el genotipo muestra la probable presencia del antígeno Fy^a, lo que sigue una variación genética que se ve reflejada en el fenotipo, en el que Fy^a es negativo y, por lo tanto, la formación de su correspondiente anticuerpo.⁵² Estas variaciones son el reflejo de la gran variabilidad que se puede encontrar en la población mexicana y que ha sido poco estudiada.

Conclusiones

Los conocimientos médicos combinados con los del Proyecto Genoma Humano permitirán la detección de nuevos marcadores genéticos y moleculares con finalidad diagnóstica. Con el desarrollo de las nuevas tecnologías para la obtención de la información genética se está logrando reducir los tiempos y los costos de los ensayos para la identificación de estos marcadores. Esto lleva aparejada la posibilidad de su expansión y la generalización de su uso, lo cual puede generar una revolución en el ámbito biomédico en tanto que la expectativa en medicina transfusional estriba en aumentar la disponibilidad y el grado de compatibilidad de concentrados eritrocitarios, lo que redundará en la seguridad para pacientes dependientes de transfusión. Actualmente, México cuenta con dos laboratorios que realizan genotipificación: una entidad pública y una privada. Con la implementación lenta y progresiva de las nuevas metodologías moleculares, surge la disyuntiva: ¿la inmunohematología molecular complementa o sustituye a la inmunohematología tradicional?

Sería ideal implementar en nuestro país un proceso de genotipado de glóbulos rojos y plaquetas de alto rendimiento e integrar los datos con la base del inventario en toda la cadena de suministro de sangre.

La inmunohematología molecular viene a complementar los métodos serológicos tradicionales para resolver casos complejos. Los bancos de sangre tienen la opción para integrar medicina genómica con el fin de mejorar la correspondencia entre el donante y el receptor de sangre. Esto tiene ventajas logísticas y, por supuesto, la desventaja del

alto costo que tiene la tecnología en evolución, así como la necesidad de contar con el personal calificado, lo cual implica un modelo de asociación hospital-laboratorio de referencia que ofrezca el beneficio de una rápida integración de la medicina genómica actualizada, al mismo tiempo que respalda la economía de las operaciones centralizadas en laboratorios de referencia a gran escala y da entrada a la nueva era de la inmunohematología molecular.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno relacionado con este artículo.

Referencias

- Pierce B. *Genética*. Un enfoque conceptual. Quinta edición. Panamericana; 2016.
- Gascón P. *La revolución genómica: origen y perspectivas*. Primera edición. México: Universidad Autónoma Metropolitana; 2004. pp. 17-50.
- Fürst D, Tsamadou C, Neuchel C, Schrezenmeier H, Mytilineos J, Weinstock C. Next-Generation Sequencing Technologies in Blood Group Typing. *Transfus Med Hemother* 2020; 47:4-13. doi.org/10.1159/000504765
- Storry JR, Olsson ML. Genetic basis of blood group diversity. *Br J Haematol*. 2004;126(6):759-71. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05065.x
- Castilho L. Molecular typing of blood group genes in diagnosis. *Ann Blood* 2021;6:20. doi.org/10.21037/aob-20-73
- International Society of Blood Transfusion. *Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology*. Amsterdam, The Netherlands: ISBT; 2022. Disponible en: <https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>
- Funk MK, Eder AF. *Technical Manual - AABB*. 19th ed. AABB; 2017.
- Lögberg L, Reid ME, Zelinski T. Human blood group genes 2010: chromosomal locations and cloning strategies revisited. *Transfus Med Rev*. 2011;25(1):36-46. doi: 10.1016/j.tmr.2010.08.005
- Gomez-M JE. *Biología Molecular: principios y aplicaciones*, Capítulo 6. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2011. pp. 77-89.
- Höher G, Fiegenbaum M, Almeida S. Molecular basis of the Duffy blood group system. *Blood Transfus*. 2018;16(1):93-100. doi: 10.2450/2017.0119-16
- Patnaik SK, Helmsberg W, Blumenfeld OO. BGMUT Database of Allelic Variants of Genes Encoding Human Blood Group Antigens. *Transfus Med Hemother*. 2014;41(5):346-51. doi: 10.1159/000366108
- Daniels G. *Human Blood Groups*. Bristol, UK: Wiley Blackwell; 2013.
- Mankelw TJ, Burton N, Stefansdottir FO, Spring FA, Parsons SF, Pedersen JS, et al. The Laminin 511/521-binding site on the Lutheran blood group glycoprotein is located at the flexible junction of Ig domains 2 and 3. *Blood*. 2007;110(9):3398-406. doi: 10.1182/blood-2007-06-094748
- Hayashi T, Hirayama F. Advances in alloimmune thrombocytopenia: perspectives on current concepts of human platelet antigens, antibody detection strategies, and genotyping. *Blood Transfus*. 2015;13:380-90.
- Soler Noda G, Romero Díaz Y, Forrellat Barrios M, Bencomo Hernández A. Conocimientos actuales sobre la patogénesis, presentación clínica, diagnóstico y manejo de la trombocitopenia neonatal aloimmune. *Rev Cubana Pediatr*. 2019 Sep;91(3):e513. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-5312019000300009&lng=es. Epub 01-Sep-2019.
- Silvestre APA, Zacarias JMV, Guelsin GAS, Visentainer JEL, Sell AM. Genetic polymorphisms of human platelet antigens in Euro-African and Japanese descendants from Parana, Southern Brazil. *Platelets*. 2017;28(6):607-10. doi: 10.1080/09537104.2016.1257785
- Mangerona CM, Garcia FB, Moraes-Souza H. Frequency of human platelet antigens (HPA)-1, -2, -5 and -15 in Brazilian blood donors and establishment of a panel of HPA-typed donors. *Transfus Med*. 2015;25(3):189-94. doi: 10.1111/tme.12210
- Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang*. 2014;106(2):93-102. doi: 10.1111/vox.12085
- Ahlen MT. Serological and molecular typing in platelet alloantibody investigations. *ISBT Science Series(2020)15*, 70-6. doi: 10.1111/voxs.12535
- Bakanay SM, Ozturk A, Ileri T, Ince E, Yavasoglu S, Akar N, et al. Blood group genotyping in multi-transfused patients. *Transfus Apher Sci*. 2013;48(2):257-61. doi: 10.1016/j.transci.2013.01.009
- Singer ST, Wu V, Mignacca R, Kuypers FA, Morel P, Vichinsky EP. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. *Blood*. 2000;96(10):3369-73.
- Wang LY, Liang DC, Liu HC, Chang FC, Wang CL, Chan YS, et al. Alloimmunization among patients with transfusion-dependent thalassemia in Taiwan. *Transfus Med*. 2006;16(3):200-3. doi: 10.1111/j.1365-3148.2006.00656.x
- Karimi M, Nikrooz P, Kashef S, Jamalian N, Davatolhagh Z. RBC alloimmunization in blood transfusion-dependent beta-thalassemia patients in southern Iran. *Int J Lab Hematol*. 2007;29(5):321-6. doi: 10.1111/j.1365-2257.2006.00856.x
- Vichinsky EP, Earles A, Johnson RA, Hoag MS, Williams A, Lubin B. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. *N Engl J Med*. 1990;322(23):1617-21. doi: 10.1056/NEJM199006073222301
- Muñiz-Díaz E, Martínez C, Madoz P. Refractariedad a las transfusiones de plaquetas. *Med Clin (Barc)*. 2003;120(14):544-9.
- Reid ME. Transfusion in the age of molecular diagnostics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:171-7. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.171
- Al-Ouda SK, Al-Banyan AA, Abdel Gader AG, Bayoumy NM, Al-Gahtani FH. Gene frequency of human platelet alloantigens-1 to -6 and -15 in Saudi blood donors. *Transfus Med*. 2016 Jun;26(3):220-4. doi: 10.1111/tme.12297

28. Reid ME, Rios M, Powell VI, Charles-Pierre D, Malavade V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion*. 2000; 40(1):48-53. doi: 10.1046/j.1537-2995.2000.40010048.x
29. DiGuardo MA, Kester SJ, Mahaffey VJ, Hammel SA, Heaser KK, Hofich CD, et al. Does Transfusion of Red Blood Cells Impact Germline Genetic Test Results? *J Pers Med*. 2020;10(4):268. doi: 10.3390/jpm10040268
30. Hashmi G, Shariff T, Seul M, Vissavajhala P, Hue-Roye K, Charles-Pierre D, et al. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion*. 2005;45(5):680-8. doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.04362.x. Erratum in: *Transfusion*. 2005 Jun;45(6):1045.
31. Hashmi G, Shariff T, Zhang Y, Cristobal J, Chau C, Seul M, et al. Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion*. 2007;47(4):736-47. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01178.x. Erratum in: *Transfusion*. 2007;47(5):952.
32. Immucor PreciseType. HEA Molecular BeadChip Test. Warren, NJ: Immucor; April 2014. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/88548/download>
33. Griffols, Innovative Diagnostic Solutions. BLOODchip ID CORE XT.Griffols: [sin lugar de publicación]; 2018.
34. Avent ND. Large-scale blood group genotyping: clinical implications. *Br J Haematol*. 2009;144(1):3-13. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07285.x
35. Tounsi WA, Madgett TE, Avent ND. Complete RHD next-generation sequencing: establishment of reference RHD alleles. *Blood Adv*. 2018 Oct;2(20):2713-23. doi: 10.1182/bloodadvances.2018017871
36. Palacajornsuk P, Halter C, Isakova V, Tarnawski M, Farmar J, Reid ME, et al. Detection of blood group genes using multiplex SNaPshot method. *Transfusion*. 2009;49(4):740-9. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.02053.x. Erratum in: *Transfusion*. 2009 Sep;49(9):2012
37. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet*. 2018;34(9):666-81. doi: 10.1016/j.tig.2018.05.008
38. Denomme GA, Flegel WA. Applying molecular immunohematology discoveries to standards of practice in blood banks: now is the time. *Transfusion*. 2008;48(11):2461-75. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01855.x
39. Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino J Jr, Alberto FL, Saad ST, et al. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion*. 2002;42(2):232-8. doi: 10.1046/j.1537-2995.2002.00029.x
40. Castilho L, Rios M, Pellegrino J Jr, Saad STO, F Costa F. Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients. *J Clin Lab Anal*. 2002;16(5):216-20. doi: 10.1002/jcla.10044
41. Fasano RM, Chou ST. Red Blood Cell Antigen Genotyping for Sickle Cell Disease, Thalassemia, and Other Transfusion Complications. *Transfus Med Rev*. 2016;30(4):197-201. doi: 10.1016/j.tmr.2016.05.011
42. Matteocci A, Pierelli L. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease and in thalassaemia: current status, future perspectives and potential role of molecular typing. *Vox Sang*. 2014;106(3):197-208. doi: 10.1111/vox.12086
43. Tahhan HR, Holbrook CT, Braddy LR, Brewer LD, Christie JD. Antigen-matched donor blood in the transfusion management of patients with sickle cell disease. *Transfusion*. 1994;34(7):562-9. doi: 10.1046/j.1537-2995.1994.34794330008.x
44. Miranda R, Leal I, TDD Santos TDD, Gilli S, Castilho L. Impact of prophylactic red blood cell (RBC) transfusion with extended antigen matching on alloimmunization in patients with sickle cell disease (SCD). *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. 2021;43 Suppl 1:S322. doi: 10.1016/j.htct.2021.10.546
45. Ziman A, Cohn C, Carey PM, Dunbar NM, Fung MK, Greinacher A, et al; the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. Warm-reactive (immunoglobulin G) autoantibodies and laboratory testing best practices: review of the literature and survey of current practice. *Transfusion*. 2017; 57(2):463-77. doi: 10.1111/trf.13903
46. Scharberg E, Rink G, Portegys J, Rothenberger S, Gillhuber N, Richter E, et al. The Impact of Using Genotyped Reagent Red Blood Cells in Antibody Identification. *Transfus Med Hemother*. 2018;45(4):218-24. doi: 10.1159/000491884
47. Perez-Alvarez I, Hayes C, Hailemariam T, Shin E, Hutchinson T, Klapper E. RHD genotyping of serologic RhD-negative blood donors in a hospital-based blood donor center. *Transfusion*. 2019;59(7):2422-8. doi: 10.1111/trf.15325
48. Dezan MR, Oliveira VB, Gomes ÇN, Luz F, Gallucci AJ, Bonifácio SL, et al. High frequency of variant RHD genotypes among donors and patients of mixed origin with serologic weak-D phenotype. *J Clin Lab Anal*. 2018;32(9):e22596. doi: 10.1002/jcla.22596
49. Kappler-Gratias S, Auxerre C, Dubeaux I, Beolet M, Ripaux M, Le Pennec PY, et al. Systematic RH genotyping and variant identification in French donors of African origin. *Blood Transfus*. 2014;12 Suppl 1(Suppl 1):s264-72. doi: 10.2450/2013.0270-12
50. Trueba R, Baptista H. Genotipificación de antígenos plaquetario en donantes recurrente. *Rev Mex Med Trans*. 2015;Supl 1:067.
51. Trueba R, Baptista H. Genotipificación de diversos grupos sanguíneo en donadores recurrente. *Rev Mex Med Trans*. 2015;Supl 1:068.
52. Padilla E, Murrieta S. Reporte de un caso de incompatibilidad sanguínea no concordante entre el genotipo y el fenotipo en el centro médico naval. *Rev Mex Med Trans*. 2019;Supl 1: S20-21.