

Enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad Rh: Profilaxis con gammaglobulina anti-D

RAMÓN F. MONTAÑO*
JANELI FUENMAYOR**
OSCAR WALTER TORRES***

* *MSc, PhSc en Inmunología. Investigador asociado en el Laboratorio de Patología Celular y Molecular. Centro de Medicina Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. rmontano@ivic.gob.ve*

** *Laboratorio de Patología Celular y Molecular. Centro de Medicina Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela. jfuenmay@ivic.gob.ve*

*** *Jefe de Unidad de Hemoterapia. Hospital Materno-Infantil Ramón Sardá. Esteban de Luca 2151. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. owtorres@gmail.com*

El sistema sanguíneo Rh

Los aloantígenos que conforman el sistema sanguíneo Rh humano residen en una pareja de proteínas, RhD y RhCE, que se expresa exclusivamente en la membrana de los glóbulos rojos (GR).¹ RhD y RhCE forman parte de un complejo proteico, el complejo Rh, cuya función está aparentemente vinculada con un rol estructural en la membrana eritrocitaria;² aunque puede además desempeñarse como un canal proteico, facilitador del transporte de gases (CO₂, O₂, NH₃, NO)³⁻⁷ y/o de cationes mono-

valentes^{8,9} hacia o desde el interior del eritrocito. Desde el punto de vista inmunitario, el sistema aloantigénico Rh es una colección diversa de determinantes antigénicos (epítomos) localizados en la secuencia de las cadenas polipeptídicas RhD y RhCE. RhD y RhCE son proteínas integrales de membrana, no glicosiladas,¹⁰ que exhiben un grado apreciable de polimorfismo¹¹⁻¹² y son identificadas en la nomenclatura CD con la designación CD240.¹³ En este complejo aloantigénico se incluyen las clásicas especificidades antitéticas C/c y E/e, que dependen del alelo de RhCE presente en cada individuo, y D/d que inicialmente se pensó también correspondía a un par de alelos antitéticos, pero que en realidad está determinada por la presencia (D) o ausencia (d) de la proteína RhD. Esto último ha permitido la clasificación de los seres humanos en Rh positivo (D; cuando RhD está presente) o Rh negativo (d; cuando RhD está ausente).

Las proteínas RhD y RhCE son codificadas por los genes *RHD* y *RHCE*, los cuales tienen un origen común, exhiben una alta homología (96% de identidad) y se encuentran ubicados, muy próximos uno del otro, en el cromosoma 1 humano.¹⁴⁻¹⁶ En consecuencia, RhD y RhCE son muy semejantes en su secuencia primaria y estructura.⁷ La presencia de ambas proteínas en la membrana eritrocitaria depende críticamente de la interacción con otra proteína integral de membrana denominada RhAg (CD241), con la que comparten cierto grado de homología. Estos tres polipéptidos forman parte de la “familia proteica Rh” y se unen en la membrana del GR a proteínas acce-

sorias –CD47, LW, GPB– constituyendo el complejo Rh.¹⁷ Serológicamente, se han identificado al menos cincuenta variantes antigénicas dentro del complejo Rh,^{18,19} todas relacionadas a RhD o RhCE, conformándose así en el sistema de antígenos (Ag) eritrocitarios humano más complejo y polimórfico que se conoce. La carencia de la proteína RhD en los individuos Rh negativo [Rh(-)], aunada a su extenso polimorfismo, la hacen muy inmunogénica para estos, y se estima que hasta un 85%-90% de quienes se exponen a un contacto con GR Rh positivo [Rh(+)] desarrollan una respuesta inmunitaria –se “sensibilizan”– produciendo aloanticuerpos anti-RhD, principalmente de los isotipos de inmunoglobulina IgG₁ e IgG₃.²⁰⁻²² De esta manera, la mayor contribución a la variedad aloantigénica del complejo la aporta sin duda la proteína RhD.

La inmunodominancia de RhD ha facilitado la producción de anticuerpos monoclonales que reconocen de manera específica un número apreciable de variantes alélicas de la misma.²³ Esto, en conjunto con estudios de genética molecular dirigidos a la caracterización del polimorfismo del gen *RHD*,²⁴ ha permitido una descripción detallada, aunque aparentemente aún incompleta, de la antigenicidad de la proteína RhD y de las diferentes variantes alélicas presentes en las poblaciones humanas.^{25, 26} Es así que hoy día se entiende a lo que clásicamente se ha llamado el “antígeno Rh” (aludiendo a la proteína RhD) como un mosaico antigénico diverso que contiene por lo menos treinta epítomos distintos.^{23, 27} De acuerdo con los análisis moleculares realizados, muchos de estos epítomos se solapan,

algunos son independientes, pero entre ellos se han definido al menos seis *clusters* o agrupaciones.^{25, 26}

La inmunogenicidad de la proteína RhD tiene además consecuencias desde el punto de vista clínico para la práctica de la medicina transfusional. La administración de sangre o productos sanguíneos (principalmente aquellos que contengan GR) derivados de un donante Rh(+) a un paciente Rh(-) casi invariablemente conducirá a la sensibilización de éste al Ag RhD y a la eventual ocurrencia de reacciones hemolíticas postransfusionales. Adicionalmente, existen individuos Rh(+) cuya proteína RhD exhibe mutaciones que se traducen en la pérdida de uno o varios determinantes antigénicos (son los llamados RhD parcial o variantes D²⁸). Estos individuos son usualmente identificados como Rh(+) al utilizar los reactivos y procedimientos de hemoclasificación empleados rutinariamente en bancos de sangre y laboratorios clínicos, pero al transfundirles sangre “Rh-compatibil” de un donante cuya proteína RhD es antigénicamente normal pueden generar una respuesta de anticuerpos anti-RhD dirigida a los epítomos que su proteína RhD no posee. Lo anterior es particularmente importante para aquellos pacientes que requieren una transfusión sanguínea y poseen alguna de las variantes de la proteína RhD parcial agrupadas bajo la “categoría DVI”.²⁹ En el ámbito de la obstetricia y perinatología, una madre Rh(-), o RhD parcial, también se encuentra a riesgo de sensibilización con la proteína RhD si gesta un bebé Rh(+), y puede presentarse la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad Rh.

La enfermedad hemolítica del recién nacido

La enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido (EHRN) fue reconocida como un síndrome clínico durante los años treinta y cuarenta del siglo XX,³⁰⁻³² aun cuando el primer registro documentado de la misma se remonta a principios del siglo XVII.³³ El cuadro clínico de la EHRN incluye anemia de origen hemolítico, eritroblastosis, *Hydrops fetalis* (acumulación excesiva de líquidos en el espacio extravascular) e ictericia, de gravedad variable. La etiopatogenia de esta enfermedad fue sugerida en 1938³⁴ y está vinculada a la presencia de anticuerpos maternos en la circulación fetal, causantes de la destrucción de los eritrocitos del feto. Estos anticuerpos reconocen aloantígenos paternos, presentes en los GR fetales, pero ausentes en la madre,³⁵ y su existencia puede ocurrir de manera “natural”, como en el caso de la EHRN por incompatibilidad materno-fetal en el grupo sanguíneo ABO (EHRN-ABO),³⁶ o producto de una inmunización o gestación previa, como sucede en el caso de la EHRN por incompatibilidad entre los grupos sanguíneos Rh de la madre y el bebé (EHRN-Rh).³⁷

En la EHRN-Rh, la vasta mayoría de los casos ocurre cuando una madre cuyo tipo sanguíneo es Rh(-) gesta un feto Rh(+), y además, presenta anticuerpos anti-RhD. Como se mencionó, los anticuerpos anti-RhD maternos generalmente pertenecen a la clase IgG, y por tanto, tienen la facultad de atravesar la placenta y alcanzar la circulación fetal donde se combinan con los eritrocitos fetales y aceleran su destrucción,

principalmente en el bazo. Como resultado de la destrucción acelerada de los hematíes se produce anemia, con presencia de eritroblastos en sangre periférica (eritroblastosis) y el catabolismo de cantidades excesivas de hemoglobina, lo que conduce a un incremento en los niveles de bilirrubina no conjugada, ocasionando ictericia y, en casos graves, neurotoxicidad que desemboca en la muerte *in utero* del feto.

De lo anterior resulta claro que, dado el supuesto de la incompatibilidad de grupo sanguíneo indicada, el evento clave para la ocurrencia de la EHRN-Rh es la producción de anticuerpos anti-RhD tipo IgG por parte de la madre. El evento de sensibilización responsable de la aparición de estos anticuerpos puede ser una hemorragia transplacentaria durante, o al término de un embarazo Rh(+) previo o a consecuencia de una transfusión sanguínea con GR Rh(+).

Profilaxis de la EHRN-Rh

Desde mediados del siglo XX se conoce que la administración de preparaciones de IgG humana enriquecidas en anticuerpos anti-RhD (a las cuales llamaremos genéricamente "IgRh") a individuos Rh(-) cuando estos son expuestos a GR Rh(+) previene el evento de sensibilización a RhD y la subsecuente producción de anticuerpos anti-RhD.³⁸ La utilización de IgRh para prevenir la aloinmunización de madres Rh(-) que se encuentran bajo riesgo de sensibilización a RhD, ha resultado tan exitosa que, luego de su introducción inicial, la incidencia de inmunización en embarazos Rh-incompatibles se redujo en un 90% (de 14% a 1%-2%) en regiones

industrializadas del mundo como Norteamérica y Europa; y es actualmente una indicación médica rutinaria en estas pacientes. Inicialmente, la indicación consistió en la administración por vía intramuscular o endovenosa de 100 microgramos a 300 microgramos de IgRh a toda madre Rh(-) no inmunizada a RhD (si la paciente ya está sensibilizada, la administración de IgRh no es capaz de revertir la inmunización) durante las primeras 72 horas después del parto,³⁹ ya que es el momento cuando la sangre fetal tiene la mayor probabilidad de alcanzar la circulación materna. Posteriormente fue establecido que la administración de IgRh anteparto (a las 28 semanas de embarazo) puede reducir aún más (hasta 0,1%-0,2%) la posibilidad de sensibilización (debida a hemorragias transplacentarias ocultas que ocurrieran durante el embarazo),⁴⁰⁻⁴² por lo que es cada vez más común el uso de IgRh anteparto (a las 28-30 semanas de gestación), además de la administración posparto. El problema con la indicación anteparto, a diferencia de la posparto, es que para el momento de la administración de la IgRh usualmente se desconoce si el feto es Rh(+) o Rh(-), lo cual obliga a suministrar el material a todas las gestantes Rh(-). Esto hace que en aquellos casos en los que el feto es RhD(-), la IgRh se utilice sin necesidad. Recientemente, varios laboratorios en el mundo han explorado la posibilidad de utilizar pruebas moleculares para realizar la genotipificación *RHD* del feto, empleando como fuente de ADN fetal el plasma de la madre gestante,⁴³⁻⁴⁵ con resultados tan alentadores que en algunos países esto ya se ha convertido

en una práctica rutinaria, en los casos que así esté indicado.⁴⁶ Adicionalmente, el establecimiento del genotipo *RHD* del padre –mediante pruebas de biología molecular y a partir de una muestra de su sangre periférica– constituye otra herramienta de reciente desarrollo, mínimamente invasiva, pero muy útil e informativa para identificar a las madres Rh(–) gestantes que se encuentren en riesgo de sensibilización a RhD;^{47,48} e incluso para identificar entre las madres Rh(–) ya sensibilizadas a RhD, aquellas que gestan un bebé Rh(+), y por tanto, poseen un alto riesgo de ocurrencia de la EHRN-Rh.⁴⁹

Esquemas actuales de profilaxis.

La profilaxis IgRh, a pesar de ser un gran avance médico, representa un método inmunoprofiláctico distinto a lo que comúnmente se entiende por inmunoprofilaxis o vacunación, pues no inmuniza a la paciente frente al antígeno, dado que lo único que se administra es un anticuerpo para prevenir la aloinmunización. Este modo de actuación requiere que la IgRh sea suministrada cada vez que hay una exposición al antígeno y que la dosis sea suficiente para cubrirlo, lo que depende del volumen de la hemorragia feto-materna (HFM). Muchos hospitales utilizan la técnica de Kleihauer-Betke como método de detección de la HFM y si ésta es superior a 4 ml emplean la citometría de flujo para cuantificar la HFM y así ajustar la dosis de IgRh.

Profilaxis prenatal

La administración de IgRh para prevenir la aloinmunización feto-materna y los posteriores efectos de mortalidad

y morbilidad neonatal es una práctica generalizada, pero su uso y su efecto preventivo en el primer trimestre del embarazo es actualmente motivo de controversia. En una de las últimas revisiones sistemáticas realizadas en *Medline* en la *Cochrane Collaboration* se concluyó que la administración antenatal de 100 microgramos (500 UI) de IgRh puede reducir el riesgo de sensibilización materna a 0,2%, sin la aparición de efectos adversos, confirmando una vez más la importancia de la inmunoprofilaxis antenatal.⁵⁰

La evidencia clínica no da soporte al uso de IgRh en mujeres RhD(–) con aborto espontáneo sin intervención médica antes de la semana 12-14; sin embargo, en caso de duda de la edad gestacional se debe administrar IgRh.

El *American College of Obstetricians and Gynecologists* no define una pauta general. Consideran que se puede establecer una recomendación sin estar basada en la evidencia, pero por otra parte dicen que la aloinmunización por aborto espontáneo antes de la semana 12 es muy rara.⁵¹ En Inglaterra, el *Royal College of Obstetricians and Gynecologists* no recomienda la administración de IgRh en abortos espontáneos cuando éste ocurre antes de la semana 12 de gestación. Ello conduce a que no exista una práctica generalizada en el uso de la IgRh a mujeres RhD(–) con aborto espontáneo antes de la semana 12. La dosis no está definida, pero 50 microgramos debería ser suficiente en el primer trimestre.

Después del primer trimestre se debe administrar IgRh para prevención de la aloinmunización RhD en aquellas situaciones y/o maniobras que

conduzcan a un riesgo de hemorragia feto-materna; tales como aborto, amniocentesis, traumatismo abdominal, embarazo ectópico, toxemia del embarazo, cordocentesis, biopsia coriónica, biopsia de placenta, feto muerto, mola hidatiforme, cirugía intrauterina y hemorragia vaginal.

La frecuencia y volumen de hemorragia fetal aumenta a medida que progresa el embarazo, el mayor riesgo ocurre después de la semana 28 de gestación, cuando el feto está completamente desarrollado y el volumen fetoplacentario es mayor. En estudios realizados se estima que el 3% de las mujeres embarazadas tienen hematíes fetales circulando en el primer trimestre, el 12% en el segundo trimestre, el 45% en el tercer trimestre, y hasta el 60% en el parto. La incidencia de inmunización durante el embarazo de mujeres RhD(-) que han tenido un hijo RhD(+) es de 1,5%. En una revisión sobre la administración de IgRh en el embarazo que incluyó a 4.500 mujeres se observó que la administración de 100 microgramos de anti-D en la semana 28 y 34 de gestación puede reducir el riesgo de aloinmunización de 1,5% a 0,2%. La profilaxis prenatal no se ha instaurado de una forma sistemática porque existen controversias derivadas del aumento del consumo de anti-D que ello conlleva.⁵⁰

En general se reconocen dos esquemas de inmunoprofilaxis antenatal: i) administración de una única dosis de 300 microgramos (1.500 UI) en la semana 28 de gestación; o ii) dos dosis de 100 microgramos y 125 microgramos (500 UI-625 UI), una en la semana 28, y la otra en la semana 34.⁵²

Profilaxis posnatal

En los programas de profilaxis RhD existe un consenso internacional en el que toda madre RhD(-) o con un recién nacido (RN) RhD(+), con prueba anti-globulínica directa (PAD) negativa de sangre de cordón debe recibir 300 microgramos (1.500 UI) de anti-RhD independientemente del estatus ABO del RN. Así mismo, toda madre RhD(-) no sensibilizada con mortinato que imposibilite conocer el Grupo Rh y PAD del producto, debe recibir 300 microgramos (1.500 UI); en ambas circunstancias, dentro de las 72 horas posparto. Si la paciente no ha recibido la profilaxis en las primeras 72 horas posevento, ésta puede administrarse hasta cuatro semanas después.

Si se sospecha HFM importante, se debe administrar 300 microgramos de IgG anti-RhD por cada 30 ml de sangre fetal, lo que se puede calcular por diferentes pruebas (Test de Rosetas, Kleihauer-Betke o citometría de flujo).⁵³ En relación con la HFM, afortunadamente, el volumen que se pierde por lo general es pequeño, con menos de 0,025 mL eritrocitos fetales observados en 75% de los casos, menos de 0,5 mL en 6%, y menos de 15 mL en más del 99%.⁵⁴ La incidencia de HFM de importancia clínica varía dependiendo del volumen de sangre fetal considerado significativo. Muchas series se han enfocado en un punto de corte de 30 mL, ya que esta es la cantidad de eritrocitos fetales cubiertos por la dosis estándar de 300 microgramos de IgRh administrada para la prevención a la sensibilización a Rh.⁵⁵ Con este punto de corte, la incidencia de la HFM se ha estimado en aproximadamente 3 por 1.000 nacimientos.⁵⁴

Prevención de la aloinmunización en la Unión Europea

Entre los países de la Unión Europea (UE) se aprecia falta de uniformidad en los programas de prevención de la aloinmunización RhD y en la cantidad de IgRh que se debe administrar para un efecto preventivo eficaz. Mientras que Inglaterra o Francia administran dosis de 100 microgramos en el parto, otros países administran 300 microgramos. En la prevención prenatal son mayores las diferencias en la cantidad de IgRh que se administra, y van desde los 75 microgramos en Holanda hasta los 300 microgramos en Austria o Alemania, pasando por los 100 microgramos en las semanas 28 y 34 en Inglaterra o Francia. La profilaxis prenatal en la semana 28 no se realiza de forma sistemática en todos los países, y en Holanda y Polonia se limita a mujeres que no tienen hijos vivos.

En Inglaterra, la cuantificación del volumen de HFM solo se realiza de rutina después del parto si el recién nacido es RhD(+). En la mayoría de los países el volumen de la HFM sólo se cuantifica si se sospecha una HFM masiva o si el neonato presenta anemia, y la técnica empleada puede ser citometría de flujo o el Test de Kleihauer-Betke.⁵⁶

Prevención de la aloinmunización en América Latina

En Bolivia no hay normativas específicas para el control inmunohematológico de la gestante y del neonato; tampoco sobre la inmunoprofilaxis. Solamente en las *Guías para uso racional de hemocomponentes* editadas

por las anteriores autoridades del Plan Nacional de Sangre se recomienda que “personas Rh negativo que reciben plaquetas Rh positivo o hemocomponente contaminado con glóbulos rojos, deberán recibir gammaglobulina hiperimmune anti-D”. De todas maneras, la EHP por anti-D en este país no reviste importancia sanitaria porque la población, por sus características étnicas, es Rh(+) en un 92%-100%.^{57, 58}

En Venezuela no existen normas del Ministerio de Salud para la inmunoprofilaxis Rh. En cambio, la Sociedad de Obstetricia recomienda determinar el tipo sanguíneo ABO y Rh, y la Sociedad Venezolana de Hematología ha recomendado la administración de la IgG Rh en los casos en que estuviere indicada. Aproximadamente, desde 1980 se está haciendo la profilaxis prenatal, con 300 microgramos de IgRh a las 28 semanas de gestación.⁵⁹

Según datos obtenidos del *Boletín del Instituto Nacional de Salud Pública de México*, en este país no se tiene experiencia alguna en la cuantificación de la HFM en cualquier etapa del embarazo, ni con la prueba de Kleihauer-Betke. Es decir, que en ausencia de la experiencia o infraestructura para realizar la cuantificación de la HFM, ésta no debe ser aún un criterio para ser incorporada en las medidas de prevención de la isoinmunización. El empleo de la IgRh, en las semanas 28 y 34, ha demostrado un efecto marginal y no significativo en la reducción del riesgo en mujeres Rh(-) primíparas o sin distinción de la paridad de 0,30 (0,22-0,38) y 0,34 (0,28-0,40), respectivamente. Pero sin duda alguna, el elemento más preocupante es la falta de un marco norma-

tivo o regulatorio, pues el INPer (Instituto Nacional de Perinatología) es la única institución donde se tienen claramente establecidos las normas y los criterios para la inmunoprofilaxis en la gestante D(-). En el ámbito nacional, la Norma Oficial Mexicana (NOM) para la atención de la mujer durante el embarazo, parto o puerperio y del recién nacido, señala criterios generales para la atención de la gestante D(-). No especifica ningún criterio adicional, ni para modificar la dosis, ni la aplicación prenatal o ningún otro procedimiento que permita proteger a las gestantes D(-) en riesgo, bajo circunstancias clínicas que favorecen la isoimmunización. Las nuevas propuestas de actualización de la NOM para la disposición de sangre humana y sus componentes han eliminado cualquier recomendación respecto a las prácticas de inmunoprofilaxis.⁶⁰

En Ecuador, el *Reglamento a la Ley de Maternidad Gratuita y de Atención a la Infancia* del Ministerio de Salud Pública menciona en el Art. 1 inc. a) “La asistencia prenatal incluirá: el diagnóstico de embarazo y los controles que sean necesarios, mediante los siguientes exámenes: biometría hemática, VDRL, grupo sanguíneo y factor Rh, tiempo de protrombina...”. No existen otras consideraciones para situaciones de gestantes sensibilizadas, como tampoco la detección de anticuerpos irregulares en forma sistemática.⁶¹

En Brasil no existen normas que regulen los controles inmunohematológicos perinatales, tampoco sobre la IP. La prevención se lleva a cabo con una dosis de 300 microgramos posparto, sin cuantificación de la HFM. No está sistematizada la profilaxis antenatal.

En Uruguay, según normas, se deben estudiar todas las gestantes, en lo posible en el primer trimestre (ABO, Rh y detección de anticuerpos séricos irregulares). En las pacientes sensibilizadas se efectúa el seguimiento mensual (inmunohematológico y obstétrico), para evaluar el grado de sufrimiento fetal. La inmunoprofilaxis se efectúa con dosis de 300 microgramos en las semana 28 y dentro de las 72 horas posparto. Para la indicación de la dosis posparto no se efectúa la cuantificación de la HFM.

En la República Argentina, el diagnóstico, tratamiento y prevención de la EHP por Rh son abordadas en las *Recomendaciones para el Equipo Perinatal* del Ministerio de Salud de la Nación y por las *Normas Técnicas de la Ley Nacional de Sangre* N° 22.990. Ambas normativas coinciden en la obligatoriedad de que se deben estudiar todas las gestantes, en lo posible en el primer trimestre (ABO, Rh y detección de anticuerpos séricos irregulares), así como a todos los neonatos (ABO, Rh, PAD). En relación con la inmunoprofilaxis, se recomienda administrar no menos de 250 microgramos de IgRh entre las semanas 28 y 32 de gestación y no menos de 300 microgramos dentro de las 72 horas posparto. También es obligatoria la cuantificación de la HFM para ajustar la dosis de IgRh posparto, pero su cumplimiento es parcial.⁶²⁻⁶⁴

IgRh

La materia prima utilizada para la preparación de IgRh es una mezcla de plasmas humanos obtenidos mediante plasmáferesis de donantes inmunizados a RhD que poseen altos títulos de aloanticuer-

pos específicos. En el pasado los donantes solían ser mujeres Rh(-), sensibilizadas durante un embarazo Rh(+) y que ya no se encontraban en edad reproductiva. Paradójicamente, este tipo de donantes ahora es escaso debido al éxito de los programas de prevención a la aloinmunización a Rh con IgRh. En su lugar, en la actualidad se utilizan hombres Rh(-), quienes voluntariamente acceden a ser inmunizados y luego estimulados repetidas veces mediante la inyección de GR Rh(+). Las mezclas de plasma son procesadas industrialmente de manera similar (fraccionamiento mediante precipitación con etanol frío) a como se prepara la inmunoglobulina endovenosa (IVIG) o mediante cromatografía de intercambio aniónico para rendir un producto final que contiene esencialmente IgG humana (principalmente IgG₁ y en menor proporción IgG₃). Solo una pequeña fracción del total de proteínas presente en una dosis de IgRh profiláctico corresponde a anticuerpos anti-RhD (entre 50 microgramos y 300 microgramos de anticuerpo versus 50 miligramos - 60 miligramos de proteína total, dependiendo de la formulación). La naturaleza policlonal de estas preparaciones hace suponer que deben contener una mezcla de anticuerpos anti-RhD con especificidad por la mayoría –sino la totalidad– de los epítomos B (determinantes antigénicos reconocibles por los linfocitos B humanos) de la proteína RhD, aunque no se dispone de estudios sistemáticos que confirmen esta suposición.

Mecanismo de acción de la IgRh

La administración conjunta de GR Rh(+) (ABO-compatibles) e IgRh a indi-

viduos Rh(-) ocasiona una rápida desaparición de los GR alogénicos de la circulación.⁶⁵ Algo similar sucede si los GR Rh(+) son recubiertos con IgG anti-RhD *ex vivo* y luego son inyectados.³⁸ El órgano en el cual ocurre el secuestro de los GR alogénicos recubiertos de anti-RhD es el bazo.⁶⁶ Contrariamente, cuando se inyectan los GR alogénicos en ausencia de IgRh, estos exhiben una vida media similar a la de los GR autólogos, y se detectan en la circulación durante meses. En los primeros dos casos, un porcentaje elevado (en algunos estudios el 100%) de los individuos resulta “protegido” de la sensibilización a RhD; en el tercero, entre un 80%-90% se inmunizan y comienzan a producir anti-RhD. Estos hallazgos han sido interpretados para proponer que, en el caso de una mujer Rh(-) con un embarazo Rh(+) a la cual se le administró IgRh, la eliminación de los GR fetales es tan rápida y completa que no da oportunidad para que ocurra contacto alguno entre estos y los linfocitos B RhD-específicos de la madre, y evitar así su activación y posterior diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos anti-RhD, lográndose entonces el efecto profiláctico. Esto es lo que en la literatura angloamericana se conoce con el nombre de “*antigen (RBC) clearance hypothesis*”, es decir, “hipótesis de eliminación del antígeno”.⁶⁷

Aun cuando la hipótesis de eliminación del antígeno resulta satisfactoria para explicar el efecto preventivo inmediato de la IgRh, no lo es para aclarar el carácter “residual” o prolongado de su acción profiláctica. En varios estudios se ha documentado que si

se deja transcurrir el tiempo suficiente (hasta 10 meses) para que desaparezca (o al menos no sea detectable) la IgG anti-RhD de la circulación de los individuos Rh(-) en los que la administración de IgRh produjo un efecto profiláctico, un número de individuos bastante menor al esperado resulta inmunizado al repetir la inyección de GR Rh(+), esta vez en ausencia de una nueva dosis de IgRh.^{55, 68} Ello ha dado lugar a la formulación de otras hipótesis que toman en cuenta esta observación. La que mayor aceptación ha tenido –hasta hace relativamente poco tiempo– se fundamenta en un fenómeno experimental denominado Inmunosupresión Mediada por Anticuerpos (AMIS; del inglés, *Antibody-Mediated Immune Suppression*), en el cual la administración a conejos,^{69, 70} ratones⁷¹ y otras especies animales⁷² de un Ag –en la forma de complejo inmune (CI) con anticuerpos tipo IgG– conduce a la supresión de la respuesta humoral específica en contra del Ag administrado. La explicación que se ha dado a la AMIS es que cuando el Ag –en la forma de CI– interactúa con la célula B a través del BCR (receptor para el antígeno en la célula B), también lo hace a través de un receptor para la porción Fc de la IgG (FcγR; del inglés, *Fc gamma receptor*) que está presente en la membrana de la célula B denominado FcγRIIB. FcγRIIB es un receptor inhibitorio (posee motivos “ITIM” –del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*– en su porción intracelular⁷³) que exhibe baja afinidad por la IgG y, en consecuencia, se une a la porción Fc de la IgG solo cuando ésta se encuentra formando CI con el Ag. Esta situación de coligamiento a

través del BCR y del FcγRIIB envía dos señales al interior de la célula B virgen, una positiva (vía BCR) y otra negativa (vía FcγRIIB), que son “interpretadas” conjuntamente como un mensaje de regulación (arresto celular), en lugar de activación, y que la conducen a un estado de anergia.⁷⁴ Adicionalmente, la agregación del FcγRIIB en la membrana de la célula B estimula la generación de señales proapoptóticas.⁷⁴ De esta manera, los clones de células B Ag-específicas se mostrarían “tolerantes” (escenario de anergia) y/o estarían ausentes (escenario de la apoptosis) cuando se hace la segunda administración del Ag.

El mecanismo de AMIS pareciera adecuado para explicar la acción profiláctica (tanto inmediata como residual) de la IgRh. No obstante, estudios recientes realizados en ratones no para el receptor FcγRIIB (ratones mutantes que no expresan dicho receptor) han arrojado una sombra de duda sobre la idea de que éste sea el mecanismo por el cual opera la IgRh en la prevención de la aloinmunización a la proteína RhD. En estos estudios se puso en evidencia que el fenómeno de AMIS ocurre en los ratones FcγRIIB-nocaut de manera normal y similar a como se manifiesta en los ratones silvestres.⁷⁵

En vista de que ni los mecanismos revisados aquí ni otros que se han propuesto^{76, 77} parecen explicar de manera satisfactoria la acción profiláctica de la IgRh, es pertinente proponer una explicación diferente que, por supuesto, tome en cuenta tanto el carácter inmediato como el efecto residual de la IgRh. En este sentido y en atención a los antecedentes examinados, nos ha parecido importante sugerir un mecanismo

alternativo: que la IgRh pueda operar provocando en la madre un asincronismo entre las respuestas mediadas por las células B y T RhD-específicas, y que esta sea la causa de la acción profiláctica. Expliquémonos con un poco más de detalle.

En primer lugar sostengamos que, efectivamente, cuando se administra IgRh a un individuo Rh(-) y en su circulación hay GR Rh(+) ocurre un secuestro rápido y eficaz de estos GR alogénicos por el sistema retículo-endotelial esplénico. *In vitro*, la unión de IgG anti-RhD al GR Rh(+) no conduce a activación del complemento^{78,79} ni a hemólisis; más aún, tampoco es capaz de inducir hemaglutinación, lo cual ha sido atribuido a la relativamente baja densidad y a la poca exposición de la proteína RhD en la superficie del GR.⁶⁵ De esta manera, el secuestro y posterior eliminación de los GR Rh(+) sensibilizados con anti-RhD en el bazo, probablemente no implique el concurso del sistema del complemento. De acuerdo con esto, es posible que los GR alogénicos viajen en la circulación materna e ingresen al parénquima esplénico, a la pulpa roja más concretamente, confundidos entre los GR autólogos, pero recubiertos de moléculas de IgG anti-RhD. El retorno de la sangre desde la pulpa roja a la circulación implica un proceso de filtración a través de un endotelio especializado que reviste los senos venosos.⁸⁰ En este endotelio abundan células del sistema retículo-endotelial (macrófagos esplénicos), lo que permitiría entonces la interacción de los “complejos inmunes” –GR Rh(+): IgG anti-RhD– con estos macrófagos esplénicos y su subsiguiente retención rápida

y selectiva. Esto impediría la ocurrencia de contactos productivos entre los linfocitos B RhD-específicos y los GR Rh(+), evitándose la activación de estos linfocitos. La IgRh actuaría entonces como lo postula la “hipótesis de eliminación del antígeno” e impediría la estimulación del componente humoral de la respuesta inmunitaria anti-RhD. Pero ¿cuál es el destino de los GR alogénicos que interactúan con el sistema retículo-endotelial esplénico? ¿Cuáles mecanismos operan para su destrucción?

En este orden de ideas, los dos mecanismos principales de eliminación deberían ser la fagocitosis inmune y/o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC; del inglés, *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*); ambos supeditados a la unión de la porción Fc γ de los anticuerpos anti-RhD con receptores Fc γ R en la superficie de las células efectoras. El consenso en la literatura es que ambos mecanismos operan, aunque no existen evidencias experimentales directas para apoyar esta suposición. Haciendo un ejercicio teórico, uno podría imaginar una condición “extrema” en la cual hay numerosas moléculas de IgG anti-RhD sobre la superficie de cada GR Rh(+), en cantidad suficiente como para inducir a través de su porción Fc el agrupamiento de los receptores Fc γ R en la membrana de la célula efectora, y así fomentar la eritrofagocitosis de manera preferencial sobre la ADCC. En este escenario, toda la carga antigénica RhD estaría inmediatamente disponible para la maquinaria de procesamiento del fagocito y su posterior presentación en el contexto de moléculas HLA clase II a clo-

nes de linfocitos T cooperadores (Th) cuyo TCR (receptor para el antígeno en la célula T) muestre especificidad por péptidos derivados de la proteína RhD. El “extremo” opuesto sería la situación en la cual cada GR Rh(+) tiene moléculas de IgG anti-RhD unidas, pero no en la cantidad suficiente para estimular la fagocitosis, aunque sí capaces de mediar la unión del GR a la célula efectora y posteriormente el fenómeno de ADCC. En este escenario, el estroma de los GR lisados podría mantenerse unido a la membrana de la célula efectora, pero no estaría disponible para el procesamiento y presentación. Aunque nosotros nos inclinamos a suponer que el destino final del estroma es la fagocitosis, ello constituye una incógnita, puesto que no hay estudios que le den soporte a tal suposición. Para continuar el ejercicio teórico, se podría además concebir un sinnúmero de situaciones intermedias en la ocurrencia de ambos procesos.

En cualquier caso es muy factible que, luego de la rápida captura de los GR alogénicos en el bazo, tenga lugar el procesamiento y presentación antigénica a linfocitos Th RhD-específicos. Si esto es así, la respuesta de células T anti-RhD sería estimulada y deberían expandirse clones de linfocitos Th RhD-reativos. Evidencia experimental, obtenida mediante el examen de la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica de individuos Rh(-) inmunizados con GR Rh(+) cuando son estimuladas *in vitro* con péptidos sintéticos de la proteína RhD, apunta en este sentido.⁸¹ Bajo tales condiciones, al no haber linfocitos B RhD-específicos que se encuentren

experimentando estimulación a través de su BCR, las células Th RhD-específicas no tendrían a quien ayudar. ¿Qué le sucede a estos clones “huérfanos” de linfocitos Th RhD-específicos? La respuesta a esta pregunta podría ser clave para un mejor entendimiento del mecanismo de acción profiláctica residual de la IgRh. Si estos clones de linfocitos Th se agotan en el tiempo, cuando se realice la administración de GR Rh(+) por segunda vez (de 6 a 10 meses después y en ausencia de IgRh), se podría dar la situación inversa; esto es, hay una adecuada estimulación de la respuesta humoral (los linfocitos B RhD-específicos tienen ahora el tiempo suficiente y la disponibilidad antigénica en la superficie del GR alogénico para garantizar encuentros efectivos y estimulantes), pero los clones de linfocitos Th RhD-específicos ya no están presentes para cooperar. El resultado en este escenario sería que, nuevamente, pero por razones distintas, la cooperación entre las células T y B RhD-específicas no ocurre, y estaría operando el efecto profiláctico inmediato y residual de la IgRh, debido a la inducción de un asincronismo entre los componentes humoral y celular de la respuesta anti-RhD de la madre.

La comprobación experimental de la hipótesis del asincronismo entre las respuestas de las células B y T RhD-específicas resultaría algo complicada de justificar y de realizar en humanos. Ello implicaría el concurso de voluntarios Rh(-) a los que se inyecten GR Rh(+) o mujeres Rh(-) con embarazos Rh(+), a quienes luego de la administración de IgRh se les tendría que tomar muestras de sangre seriadas en el tiempo para

estudiar la producción de anticuerpos y la presencia de células Th anti-RhD alorreactivas, para luego readministrar GR Rh(+), en el caso de los voluntarios, o aguardar por un segundo embarazo Rh(+), en el caso de las madres, y repetir el análisis. Sin embargo, la reciente disponibilidad de un modelo de ratones transgénicos que expresan la proteína HEL (lisozima de huevo de gallina) de manera exclusiva en sus GR⁸² ha creado, por vez primera, un grupo sanguíneo en el ratón de laboratorio, lo cual facilita la posibilidad de estudiar el efecto profiláctico de una IgG específica contra un “aloantígeno” de GR en este modelo.

Ahora bien, si la IgRh funciona tan espléndidamente previniendo la aloinmunización a RhD, y es un producto seguro que ha mostrado no tener efectos colaterales mayores y una eficacia demostrada durante más de cuarenta años de continua administración en cientos de miles de mujeres embarazadas ¿por qué molestarse en encontrarle una explicación a su acción profiláctica? La respuesta tiene dos vertientes. En primer lugar, desde el punto de vista académico-científico, la curiosidad por conocer las intimidades de cómo estas moléculas actúan para resultarnos tan útiles en la vida cotidiana, y la esperanza de que en ese conocimiento se encuentren respuestas a cómo opera el sistema inmunitario humano en otros contextos, son justificaciones más que suficientes. En segundo lugar, y tal vez más importante aún, están otros hechos de orden práctico: con la indicación de la IgRh anteparto (referida al inicio de este capítulo) y el crecimiento poblacional, la demanda de IgRh va en

aumento. Lo anterior se enfrenta al hecho de que, por razones de índole ética vinculadas a riesgos de transmisión de agentes infecciosos,⁸³ la disponibilidad de las mezclas de plasma hiperinmune (que es la materia prima a partir de la cual se prepara la IgRh) se ve cada día más comprometida. Estas razones empujan con fuerza a la comunidad científica y médica hacia la búsqueda de una alternativa a la IgRh. No cabe duda que el camino cierto para encontrarle reemplazo a la IgRh debe pasar por un entendimiento cabal del mecanismo a través del cual actúa.

Anticuerpos monoclonales anti-RhD como posible reemplazo de la IgRh

Una de las opciones que más se ha considerado como posible reemplazo de la IgRh para la profilaxis de la EHRN-Rh son los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-RhD. Los intentos iniciales para producir mAb anti-RhD se realizaron preparando hibridomas de ratón y resultaron un fracaso, ya que el sistema inmunitario del ratón de laboratorio produce una respuesta humoral anti-Rh que no distingue los determinantes antigénicos RhD de los RhCE. Sin embargo, actualmente se dispone de numerosos clones de células productoras de mAb anti-RhD de origen humano. La vasta mayoría de estos mAb humanos (humAb) fueron producidos utilizando variaciones de la tecnología desarrollada inicialmente por Köhler y Milstein,⁸⁴⁻⁸⁷ o a través de la producción de líneas de células linfoblastoides humanas generadas mediante transformación con el virus Epstein-Barr,⁸⁸ lo cual en

esencia implica la “inmortalización” y clonación de las células productoras del anticuerpo. Más recientemente, un número menor de humAb anti-Rh se ha desarrollado mediante la aplicación de técnicas de biología molecular y ADN recombinante,⁸⁹⁻⁹⁴ en las cuales se persigue la clonación e “inmortalización” de los genes que codifican estas proteínas. Un número apreciable de estos humAb anti-RhD ha sido caracterizado *in vitro* en cuanto a su especificidad por los distintos epítomos RhD²³ y en su habilidad para mediar funciones efectoras como la fagocitosis y ADCC.⁹⁵ Unos pocos han sido probados en estudios experimentales realizados en voluntarios Rh(-), con el propósito de calcular su vida media *in vivo*, evaluar su capacidad para mediar la eliminación acelerada de GR Rh(+) y estimar sus bondades como agentes profilácticos en la prevención de la aloinmunización a la proteína RhD, todo ello con el fin último de compararlos con las preparaciones policlonales de IgRh disponibles hoy en día.⁹⁶

Si bien es cierto que los trabajos iniciales de caracterización *in vitro* de los humAb anti-RhD suscitaron gran expectativa acerca de la posible formulación de un reactivo monoclonal que sustituyera las preparaciones de IgRh usadas en la actualidad, los resultados de los estudios *in vivo* no han sido tan alentadores. Efectivamente, a partir de los estudios *in vitro* utilizando GR Rh(+) que expresan formas mutadas de RhD, tales como las variantes RhD parcial a las que se hizo referencia al inicio del capítulo, y otras, ha quedado claro que se dispone de humAb anti-RhD que reconocen una mayoría importante

de los diferentes epítomos RhD presentes en las poblaciones humanas.^{23,27} Por otro lado, los estudios *in vitro* también han permitido la identificación de humAb anti-RhD que se comportan eficazmente en ensayos funcionales de fagocitosis y ADCC mucho mejor que las preparaciones policlonales.⁹⁷ Este tipo de ensayos ha posibilitado además un examen detallado y por separado de las bondades de los isotipos IgG₁ e IgG₃ anti-RhD, que son los dos isotipos presentes en la IgRh, para facilitar la unión de los GR Rh(+) a células efectoras, así como también para mediar la fagocitosis y la ADCC.^{95,98} Más aún, gracias al uso de técnicas de mutagénesis sitio-dirigidas y otras de biología molecular, se han desarrollado formas alteradas de estos anticuerpos. Por ejemplo, algunos poseen modificaciones en la secuencia de aminoácidos correspondiente a lugares específicos en la porción Fc de la molécula, lográndose variantes que no muestran afinidad alguna por los receptores FcγR,^{99,100} pero preservan la capacidad de unión al receptor FcRn,¹⁰¹ y con ello mantienen la propiedad de ser transportados a través de la placenta. Estas formas recombinantes se han propuesto como una posible terapia para aquellos casos en los que la madre Rh(-) ya está sensibilizada y produciendo IgG anti-RhD; así se postula que las formas recombinantes competirían con los anticuerpos anti-RhD maternos, al unirse a los eritrocitos fetales y bloquear el antígeno Rh allí presente, con lo cual se evitaría su secuestro y destrucción en el bazo fetal.¹⁰⁰ Otros son anticuerpos tipo IgG que polimerizan en una forma similar a como lo hace la IgM y adquieren ahora la habilidad de

mediar la aglutinación directa de los GR Rh(+).¹⁰²

Infelizmente, a pesar de todos estos esfuerzos no ha sido posible formular una alternativa monoclonal a la IgRh. Los resultados de los estudios *in vivo* y el estado actual del desarrollo de los monoclonales anti-RhD para fines profilácticos son un claro testimonio de ello. En primer lugar, hay que decir que el número de humAb anti-RhD que han sido probados *in vivo* (diecinueve anticuerpos, de acuerdo con la literatura consultada) parece discreto si se compara con la cantidad potencialmente disponible (más de cien anticuerpos que han sido estudiados sistemáticamente, de acuerdo con el más reciente *workshop* de la ISBT (*International Society of Blood Transfusion*)).²³ Con estos diecinueve anticuerpos se han realizado catorce estudios *in vivo*,^{99,103-115} pero solo once fueron evaluados en términos de su capacidad profiláctica. La variabilidad de los resultados obtenidos no pudo ser mayor. Sólo dos de los once anticuerpos se comportaron igual o mejor que las preparaciones policlonales previniendo la aloinmunización a RhD;^{108,109} algunos incluso produjeron un incremento en el número de individuos inmunizados,¹⁰⁶ y en los otros casos el número de individuos que resultó protegido fue bastante menor a lo observado con las preparaciones policlonales utilizadas como control.^{103-105,107}

El precario desempeño de los humAb anti-RhD como agentes profilácticos de la aloinmunización a RhD ha dado lugar a la elaboración de una variedad de posibles explicaciones, ninguna de las cuales ha sido definiti-

vamente confirmada o refutada experimentalmente.^{96,106,116} Una de estas hipótesis propone que el “déficit” profiláctico de los humAb anti-Rh puede deberse a la forma particular como los sistemas de expresión empleados para la producción de estas proteínas llevan a cabo la glicosilación de las mismas. La presencia de residuos de carbohidratos diferentes a los encontrados en las preparaciones policlonales de anti-RhD afectaría de diversas maneras la interacción de los humAb anti-Rh con los sistemas efectores de fagocitosis y citotoxicidad mediados por anticuerpo, impactando negativamente su acción profiláctica.⁹⁶ De manera interesante y pertinente, recientemente fueron publicados los resultados de un estudio farmacocinético y de inocuidad realizado en cuarenta y seis voluntarios Rh(-) con un anticuerpo monoclonal denominado roledumab. Roledumab es una IgG₁ recombinante humana anti-RhD, en la que el componente de carbohidrato presente en la porción Fc de la molécula ha sido “optimizado” para interactuar con un receptor Fc activador denominado FcγRIII, el cual le confiere a la molécula una mayor capacidad para mediar ADCC.¹¹⁷ Los hallazgos del estudio indican que roledumab tiene una farmacocinética muy similar a la de los anticuerpos anti-RhD presentes en las preparaciones de IgRh, y no produjo efectos adversos más allá de lo observado con el placebo empleado.¹¹⁸ Un ensayo clínico fase II con roledumab se encontraba en desarrollo en el momento en que se escribía este capítulo.

En nuestra opinión, un aspecto al que no se ha prestado suficiente aten-

ción y que probablemente sea importante para explicar las diferencias entre la IgRh y los humAb anti-RhD en términos de su capacidad para prevenir la isoimmunización a Rh, es el carácter monoespecífico de estos últimos versus la naturaleza poliespecífica de las preparaciones de IgRh. ¿Por qué esto pudiera ser importante? La IgRh está compuesta por una población de moléculas de IgG anti-RhD heterogénea en cuanto a su especificidad por los distintos epítomos de la proteína RhD, la cual brinda la oportunidad de que a cada molécula RhD en la membrana eritrocitaria se una más de una molécula de IgG anti-RhD. En el caso de los humAb anti-RhD esto no es posible; por cada molécula RhD solo una molécula de anticuerpo se puede unir. Esta limitación le permitiría a los linfocitos B cuyos BCR tengan la especificidad adecuada, el reconocimiento en la molécula RhD de los epítomos libres o desocupados, así se facilita la aparición de una respuesta humoral dirigida contra los eritrocitos RhD(+). Además, la relativa poca movilidad¹⁷ y la baja densidad del complejo Rh en la membrana eritrocitaria (se ha calculado que existan entre 10.000 complejos Rh a 30.000 complejos Rh que contienen proteína RhD por GR, dependiendo del fenotipo)³⁷ haría que esta diferencia sea crucial en cuanto a facilitar el proceso de eritrofagocitosis por parte de la IgRh en comparación con los humAb anti-RhD. En otras palabras, al haber solo una molécula de anticuerpo unida por complejo Rh en el caso de los humAb anti-RhD, esto se traduciría en una mediación menos eficiente de la fagocitosis, y ello conduce a una menor capacidad para facilitar el

secuestro rápido de los eritrocitos alógenos en el bazo, lo cual es considerado el mejor indicador de la acción profiláctica de los anticuerpos anti-RhD. Nosotros produjimos y comparamos en ensayos de fagocitosis *in vitro*¹¹⁹ versiones monoméricas y poliméricas de una IgG recombinante anti-RhG (RhG representa un epítomo común a las proteínas RhD y uno de los alelos de RhCE). En las versiones monoméricas, cada molécula de IgG posee solo una porción Fc, mientras que en las versiones poliméricas cada molécula tiene un mínimo de dos hasta un máximo de cinco a seis porciones Fc por molécula. Los GR Rh(+) opsonizados con los anticuerpos monoméricos fueron discretamente fagocitados por macrófagos aislados de la cavidad peritoneal de ratones de laboratorio, mientras que el 100% de los GR opsonizados con las versiones poliméricas de anti-Rh (a una concentración no aglutinante) resultaron fagocitados. De manera interesante y conveniente, en estos estudios no se apreciaron diferencias en cuanto a la incapacidad manifiesta tanto de las formas poliméricas como de las monoméricas de los anticuerpos anti-RhG para activar el complemento.

Si las consideraciones anteriores son correctas, probablemente será necesario utilizar una mezcla de monoclonales con especificidad por epítomos RhD diferentes e independientes y/o emplear versiones recombinantes poliméricas de anti-RhD para lograr una formulación monoclonal que tenga las propiedades profilácticas de la IgRh. De hecho, una mezcla de veinticinco anticuerpos recombinantes anti-RhD ha sido desarrollada recientemente¹²⁰ y

utilizada en ensayos clínicos,¹²¹ como terapia en pacientes Rh(+) que padecen trombocitopenia inmune y a los que no se les ha extirpado el bazo, de la cual se han obtenido resultados similares a los producidos por el tratamiento con anti-RhD policlonal.¹²² Es la impresión de los autores que en la actualidad se dispone del material monoclonal y de la información y conocimiento suficiente para, utilizados estos de la manera adecuada, formular una mezcla de humAb anti-RhD con propiedades profilácticas de la aloinmunización a RhD similares a las que exhibe la IgRh.

Referencias

1. Flegel, W. A., Wagner, F. F. Blutgruppen: Alloantigene auf Erythrozyten. En: Transfusionsmedizin, 2003. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, eds.: Berlin: Springer. pp. 145-85.
2. Westhoff, C. M. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion*. 2004; 44: 1663-73.
3. Soupene E, King N, Feild E, Liu P, Niyogi KK, Huang C-H, Kustu S. Rhesus expression in a green alga is regulated by CO₂. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2002; 99: 7769-73.
4. Endeward, V., Cartron, J. P., Ripoche, P., Gros, G. RhAG protein of the Rhesus complex is a CO₂ channel in the human red cell membrane. *Faseb J.*, 2008; 22: 64-73.
5. Callebaut, I., Dulin, F., Bertrand, O., Ripoche, P., Mouro, I., Colin, Y., Mornon, J. P., Cartron, J. P. Hydrophobic cluster analysis and modeling of the human Rh protein three-dimensional structures. *Transfusion Clin Biol.*, 2006; 13: 70-84.
6. Bruce, L. J., Beckmann, R., Leticia, Ribeiro, M., Peters, L. L., Chasis, J. A., Delaunay, J., Mohandas, N., Anstee, D. J. and Tanner, M. J. A. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood*, 2003; 101: 4180-8.
7. Burton, N. M., Anstee, D. J. Structure, function and significance of Rh proteins in red cells. *Current Opinion Hematol.* 2008; 15: 625-30.
8. Marini, A. M., Matassi, G., Raynal, V., Andre, B., Cartron, J. P., Cherif-Zahar, B. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat Genet.*, 2000; 26: 341-4.
9. Bruce, L. J., Guizouarn, L., Burton, N. M., Gabillat, N., Poole, J., Flatt, J. F., Brady, R. L., Borgese, F., Delaunay, J., Stewart, G. W. The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. *Blood*, 2009; 113: 1350-7.
10. Moore, S., Green, C. The identification of specific Rhesus-polypeptide-blood-group-ABH-active-glycoprotein complexes in the human red-cell membrane. *Bioch J.*, 1987; 244: 735-41.
11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/systems_alleles&system=rh
12. <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>
13. Mason, D. et al. CD antigens 2002. *Blood*, 2002; 99: 3877-80.
14. Apoil, P. A., Blancher, A. Rh gene evolution in primates: study of intron sequences. *Mol Biol Evol.*, 2000; 17: 127-36.
15. Wagner, F. F., Flegel, W. A. RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. *Blood*, 2002; 99: 2272-3.
16. Flegel, W. A. The genetics of the Rhesus blood group system. *Dtsch Arztebl.*, 2007; 104(10): A 651-7.
17. Van Kim, C. L., Colin, Y., Cartron, J. P. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev.*, 2006; 20: 93-110.
18. Westhoff, C. M. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex. *Seminars in Hematol.*, 2007; 44: 42-50.
19. Daniels, G. L, et al. ISBT committee on terminology for red blood cell surface antigens: Macao report. *Vox Sang.*, 2009; 96: 153-6.
20. Mattila, P. S., Seppala, I. J. T., Eklund, J., Makela, O. Quantitation of immunoglobulin classes and subclasses in anti-Rh(D) antibodies. *Vox Sang.*, 1985; 48: 350-6.

21. Urbaniak, S. J. Alloimmunity to RhD in humans. *Transfusion Clin Biol.*, 2006; 13: 19-22.
22. Poole, J., Daniels, G. Blood Group Antibodies and Their Significance in Transfusion Medicine. *Transfusion Med Rev.*, 2007; 21: 58-71.
23. Scott, M. Section 1A: Rh serology Coordinator's report. *Transfusion Clin Biol.*, 2002; 9: 23-9.
24. Wagner, F. F., Flegel, W. Review: The molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematol.*, 2004; 20: 23-36.
25. Flegel, W. A. Molecular genetics of RH and its clinical application. *Transfusion Clin Biol.*, 2006; 13: 4-12.
26. Liu, W., Avent, N. D., Jones, J. W., Scott, M. L., Voak, D. Molecular configuration of Rh D epitopes as defined by site-directed mutagenesis and expression of mutant Rh constructs in K562 erythro leukemia cells. *Blood*, 1999; 94: 3986-96.
27. Scott, M. Rh serology-Coordinator's report. *Transfusion Clin Biol.*, 1996; 3: 333-7.
28. Flegel, W. A. The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfusion*, 2007; 5: 50-7.
29. Von Zabern, I., Wagner, F. F., Moulds, J. M., Moulds, J. J., Flegel, W. A. D category VI: a group of clinically relevant and phylogenetically diverse partial D. *Transfusion*, 2013. doi: 10.1111/trf.12145 (Epub ahead of print).
30. Diamond, L. K., Blackfan, K. D., Baty, J. M. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the newborn. *J Pediatr.*, 1932; 1: 269-309.
31. Hawksley, J. C., Lightwood, R. A contribution to the study of erythroblastosis: icterus gravis neonatorum. *Quart J Med.*, 1934; 3: 155-209.
32. Gilmour, J. R. Erythroblastosis fetalis. *Arch Dis Child*, 1944; 19: 1-25.
33. Bourgeois, L. Observations diverses, sur le aterilité, perte de fruit, foecondité, accouchements, et maladies des femmes, et enfants nouveaux naiz. 1609. Paris: Abraham Saugrain.
34. Darrow, R. R. Icterus gravis (erythroblastosis) neonatorum. An examination of etiologic considerations. *Arch Pathol.*, 1938; 25: 378-417.
35. Levine, P., Burnham, L., Katzin, W. M., Vogel, P. The role of isoimmunization in the pathogenesis of erythroblastosis fetalis. *Am J Obstet Gynecol.*, 1941; 42: 925-37.
36. Villegas Cruz, D., Durán Menéndez, R., Alfonso Dávila, A., López De Roux, M., Cortina, L., Vilar Carro, M., Orbeal Aldama, L. Enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad ABO. *Rev Cubana Pediatr.*, 2007; 79(4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475312007000400002&lng=es.
37. Mollison, P. L., Engelfriet, C. P., Contreras, M. *Blood transfusion in clinical medicine*, 9th Ed. Blackwell Science, Oxford, UK. 1997.
38. Stern, K., Goodman, H. S., Berger, M. Experimental isoimmunization to hemo-antigens in man. *J Immunol.*, 1961; 87: 189-98.
39. Contreras, M. The prevention of Rh haemolytic disease of the fetus and newborn - general background. *British J of Obstetrics and Gynaecol.*, 1998; 105: 7-10.
40. Bowman, J. M., Chown, B., Lewis, M., Pollock, J. M. Rh isoimmunisation during pregnancy: antenatal prophylaxis. *Can Med Assoc J.*, 1978; 118: 623-7.
41. Thornton, J. G., Page, C., Foote, G., Arthur, G. R., Tovey, L. A. D., Scott, J. S. Efficacy and long term effects of antenatal prophylaxis with anti-D immunoglobulin. *British Med J.*, 1989; 298: 1671-3.
42. Urbaniak, S. J. The scientific basis of antenatal prophylaxis. *British J Obstetrics & Gynaecol.*, 1998; 105:11-8.
43. Müller, S. P., Bartels, I., Stein, W., Emons, G., Gutensohn, K., Köhler, M., Legler, T. J. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion*, 2008; 48: 2292-301.
44. Finning, F., Martin., Daniels, G. The use of maternal plasma for prenatal RhD blood group genotyping. Capítulo 11 del libro "DNA and RNA profiling in human blood. Methods and Protocols". pp. 143-160. Editado por Peter Bugert. Humana Press, 2009.

45. Illanes, S., Soothill, P. Management of red cell alloimmunization in pregnancy: the non-invasive monitoring of the disease. *Prenatal Diagnosis*, 2010; 30: 668-73.
46. De Haas, M., van der Schoot, E. Prenatal screening. *ISBT Sci Series*, 2013; 8: 6-10.
47. Yu, X., Wagner, F. F., Witter, B., Flegel, W. A. Outliers in RhD membrane integration are explained by variant RH haplotypes. *Transfusion*, 2006; 46: 1343-51.
48. Pirelli, K. J., Pietz, B. C., Johnson, S. T., Pinder, H. L., Bellissimo, D. B. Molecular determination of RHD zigosity: predicting risk of hemolytic disease of the fetus and newborn related to anti-D. *Prenatal Diagnosis*, 2010; 30: 1207-12.
49. Moise, K. J., Argoti, P. S. Management and prevention of red cell alloimmunization in pregnancy: a systematic review. *Obstetrics & Gynecol.*, 2012; 120(5): 1132-9.
50. Crowther, C. A., Middleton, P., McBain, R. D. Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2013; 2: CD000020.
51. ACOG practice bulletin. Prevention of Rh D alloimmunization. Number 4, May 1999 (replaces educational bulletin Number 147, October 1990). Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. American College of Obstetrics and Gynecology. *Int J Gynaecol Obstet.*, 1999; 66: 63-70.
52. Liunbruno, G. M., D'Alessandro, A., Rea, F., Piccinini, V., Catalano, L., Calizzani, G., Pupella, S., Grazzini, G. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunisation. *Blood Transfusion*, 2010; 8(1): 8-16.
53. Insunza, A., Behnke, E., Carrillo, J. Enfermedad hemolítica perinatal: manejo de la embarazada RhD negativo. *Rev Chil Obstet Ginecol.*, 2011; 76(3): 188-206.
54. Sebring, E. S., Polesky, H. F. Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. *Transfusion*, 1990; 30: 344-57.
55. Pollack, W., Ascari, W. Q., Kochesky, R. J., O'Connor R. R., Ho, T. Y., Tripodi, D. Studies on Rh prophylaxis. I. relationship between doses of anti-Rh and size of antigenic stimulus. *Transfusion*, 1971; 11: 333-9.
56. Rodríguez Villanueva, J. Prevención de la aloinmunización materna con gammaglobulina anti-D. *Boletín SETS*, 2007; 9(2): 4-9.
57. Mazzi Gonzales de Prada, E., Crespo García, R., Canedo de Guzmán, B., Flores Lizarazu, E., Ramiro Quispe, E., Miranda Aguilar, C. Estudio de grupos sanguíneos y factor Rh en una población de La Paz, Bolivia. *Rev Soc Bol Ped.*, 2000. Vol 39 N° (1).
58. Salcedo, J., Rojas, P., Sánchez, C., Rocha, R., Escalera, J. C. Infección por Chagas y determinación de grupos sanguíneos en escolares de Tacopaya-Arque. *Revista del Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud de Univalle-Cochabamba*. Ed. Agosto 2004.
59. Linares, J. Prevención de la Incompatibilidad Rh. En: Zighelboim I. (Ed.) *Actualidades en reproducción humana y perinatología*. Zighelboim I. 1982, 399-418.
60. Prevención de la isoinmunización materna al antígeno RhD. *Salud Pública México*, 2004; 46(3): 193-201.
61. Reglamento a la Ley de Maternidad Gratuita y de Atención a la Infancia. Ministerio de Salud Pública de Ecuador. 12 de junio del 2002.
62. Enfermedad hemolítica perinatal. Control inmunohematológico y profilaxis. Recomendaciones para el equipo perinatal. Dirección de Maternidad e Infancia. Ministerio de Salud. Agosto 2010.
63. Ley Nacional de Sangre N° 22.990. Decreto Reglamentario N° 1338 30/09/04. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. República Argentina.
64. Normas Técnicas y Administrativas. Resolución 797/20135. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. República Argentina. Julio 3 de 2013.
65. Mollison, P. L., Hughes-Jones, N. C., Lindsay, M., Wessely, J. Suppression of primary Rh immunization by passively-administered antibody. Experiments in volunteers. *Vox Sang.*, 1969; 16: 421-39.
66. Hughes-Jones, N. C., Mollison, P. L., Veal, N. Removal of incompatible cells by the spleen. *British J. Haematol*, 1957; 3: 125-33.

67. Brinc, D., Denomme, G.A., Lazarus, A. H. Mechanism of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn: what can we learn from rodent models. *Current Opinion Hematol.*, 2009; 19: 488-96.
68. Gorman, J. G., Freda, V. J., Pollack, W. J., Robertson, J. G. Protection from immunization in Rh-incompatible pregnancies. A progress report. *Bull NY Acad Med.*, 1966; 42: 458-73.
69. Pollack, W., Gorman, J. G., Hager, H. J., Freda, V. J., Tripodi, D. Antibody-mediated immune suppression to the Rh factor: animal models suggesting mechanism of action. *Transfusion*, 1968; 8: 134-45.
70. Elson, C. J., Woodrow, J. C., Donohoe, T. A. Clearance of erythrocytes and the immune response. An experimental study. *Vox Sang.*, 1971; 20: 201-8.
71. Henry, C., Jerne, N. K. Competition of 19S and 7S antigen receptors in the regulation of the primary immune response. *J Exp Med.*, 1968; 128: 133-52.
72. Heyman, B. Regulation of antibody response via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu Rev Immunol.*, 2000; 18: 709-37.
73. Muta, T., Kurosaki, T., Misulovin, Z., Sánchez, M., Nussenzweig, C., Ravetch, J. F. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature*, 1994; 368:70-3.
74. Ravetch, J. V., Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol.*, 2001; 19: 275-90.
75. Karlsson, M. C. I., Wernersson, S., Díaz de Stahl, T., Gustavsson, S., Heyman, B. Efficient IgG mediated suppression of primary antibody responses in Fcγ receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1999; 96: 2244-9.
76. Kumpel, B., Elson, C. J. Mechanism of anti-D-mediated immunosuppression – a paradox awaiting resolution? *Trends in Immunol.*, 2001; 22:26-31.
77. Kumpel, B. M. On the immunologic basis of Rh immune globulin (anti-D) prophylaxis. *Transfusion*, 2006; 46: 1652-6.
78. Freedman, J., Massey, A., Chaplin, H., Monroe, M. C. Assessment of complement binding by anti-D and anti-M antibodies employing labelled antiglobulin antibodies. *British J Haematol.*, 1980; 45: 309-18.
79. Contreras, M., Mollison, P. L. Immunological complications of transfusion. *British Med J.*, 1990; 300: 173-6.
80. Mebius, R. E., Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.*, 2005; 5: 606-16.
81. Stott, L., Barker, R. N., Urbaniak, S. J. Identification of alloreactive T-cell epitopes on the Rhesus D protein. *Blood*, 2000; 96: 4011-9.
82. Hendrickson, J. E., Saakadze, N., Cadwell, C. M., Upton, J. W., Mocarski, E. S., Hillyer, C. D., Zimring, J. C. The spleen plays a central role in primary humoral alloimmunization to transfused mHEL red blood cells. *Transfusion*, 2009; 49: 1678-84.
83. Bowman, J. Rh-immunoglobulin: Rh prophylaxis. *Best Pract & Res Clin Haematol.*, 2006; 19: 27-34.
84. Kohler, G., Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*, 1975; 256: 495-7.
85. Glassy, M. C. Production methods for generating human monoclonal antibodies. *Human Antibodies & Hybridomas*, 1993; 4: 154-65.
86. Thompson, K. M., Hough, D. W., Maddison, P. D., Melamed, M. D., Hughes-Jones, N. C. The efficient production of stable, human monoclonal antibody-secreting hybridomas from EBV-transformed lymphocytes using the mouse myeloma X63-Ag8.653 as a fusion partner. *J Immunol Meth.*, 1986; 94: 7-12.
87. Montaña, R. F., Romano, E. L. Human monoclonal anti-Rh antibodies produced by human-mouse heterohybridomas express the Gal a(1-3) Gal epitope. *Human Antibodies and Hybridomas*, 1994; 5: 152-6.
88. Steinitz, M., Klein, G., Koskimies, S., Makel, O. EB-virus induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature*, 1977; 269: 420-2.
89. Siegel, D. L., Silberstein, L. E. Expression and characterization of recombinant anti-Rh(D) antibodies on filamentous phage: a model system for isolating human red blood cell antibodies by repertoire cloning. *Blood*, 1994; 83: 2334-44.

90. Hughes-Jones, N. C., Gorick, B. D., Bye, J. M., Finnern, R., Scott, M. L., Voak, D., Marks, J. D., Ouwehand, W. H. Characterization of human blood group scFv antibodies derived from a V gene phage-display library. *British J Haematol.*, 1994; 88: 180-6.
91. Dziegiel, M., Nielsen, L. K., Andersen, P. S., Blancher, A., Dickmeiss, E., Engberg, J. Phage display used for gene cloning of human recombinant antibody against the erythrocyte surface antigen, rhesus D. *J Immunol Meth.*, 1995; 182: 7-19.
92. Edelman, L., Margaritte, C., Chaabihi, H., Monchâtre, E., Blanchard, D., Cardona, A., Morin, F., Dumas, G., Petres, S., Kaczorek, M. Obtaining a functional recombinant anti-rhesus (D) antibody using the baculovirus-insect cell expression system. *Immunol.*, 1997; 91: 13-9.
93. Miescher, S., Zahn-Zabal, M., De Jesus, M., Moudry, R., Fisch, I., Vogel, M., Kobr, M., Imboden, M. A., Kragten, E., Bichler, J., Mermod, N., Stadler, B. M., Amstutz, H., Wurm, F. CHO expression of a novel recombinant IgG1 anti-Rh D antibody isolated by phage display. *British J Haematol.*, 2000; 111: 157-66.
94. Proulx, C., Boyer, L., St-Amour, I., Bazin, R., Lemieux, R. Higher affinity human D MoAb prepared by light -chain shuffling and selected by phage display. *Transfusion*, 2002; 42: 59-65.
95. Kumpel, B. M., Beliard, R., Brossard, Y., Edelman, L., de Haas, M., Jackson, D. J. et al. Section 1c. Assessment of the functional activity and IgG Fc receptor utilisation of 64 IgG Rh monoclonal antibodies. Coordinator's report. *Transfusion Clin Biol.*, 2002; 9: 45-53.
96. Kumpel, B. M. Efficacy of RhD monoclonal antibodies in clinical trials as replacement therapy for prophylactic anti-D immunoglobulin: more questions than answers. *Vox Sang.*, 2007; 93: 99-111.
97. Kumpel, B. M. Monoclonal anti-D for prophylaxis of RhD haemolytic disease of the newborn. *Transfusion Clin Biol.*, 1997; 4: 351-6.
98. Kumpel, B. M., Jackson, D. J. Characterization and functional activity of human Rh monoclonal antibodies. *Transfusion Clin Biol.*, 1996; 6: 453-8.
99. Armour, K. L., Parry-Jones, D. R., Beharry, N., Ballinger, J. R., Mushens, R., Williams, R. K., Beatty, C., Stanworth, S., Lloyd-Evans, P., Scott, M., Clark, M. R., Peters, A. M., Williamson, L. M. Intravascular survival of red cells coated with a mutated human anti-D antibody engineered to lack destructive activity. *Blood*, 2006; 107: 2619-26.
100. Nielsen, L. K., Green, T. H., Sandlie, I., Michaelsen, T. E., Dziegiel, M. H. In vitro assessment of recombinant, mutant immunoglobulin G anti-D devoid of hemolytic activity for treatment of ongoing hemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfusion*, 2008; 48: 12-9.
101. Rojas, R., Apodaca, G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cel Biol.*, 2002; 3: 1-12.
102. Montano, R. F., Penichet, M. L., Blackall, D. P., Morrison, S. L., Chintalacharuvu, K. R. Recombinant polymeric IgG anti-Rh: a novel strategy for development of direct agglutinating reagents. *J Immunol Meth.*, 2009; 340: 1-10.
103. Crawford, D. H., Teesdale, P. E., Contreras, M., Crusz, T. A. M., Harrison, J. F., Huehns, E. R. In Vivo Use of Human Monoclonal Anti-RhD Antibody. Abstracts of XX Congress of ISBT and BBTS, 1988: 270.
104. Kumpel, B. M., Goodrick, M. J., Pamphilon, D. H., Fraser, I. D., Poole, G. D., Morse, C., Standen, G. R., Chapman, G. E., Thomas, D. P., Anstee, D. J. Human Rh D monoclonal antibodies (BRAD-3 and BRAD-5) cause accelerated clearance of Rh D+ red blood cells and suppression of Rh D immunization in Rh D- volunteers. *Blood*, 1995; 86: 1701-9.
105. Smith, N. A., Ala, F. A., Lee, D., Love, E. M., Makar, Y. F., Pamphilon, D. H., Goodrick, M. J., Duguid, J. K., Kumpel, B. M., McNeill, D., Poole, G. D., Chapman, G. E., Thomas, D. P., Harman, C. T. A multi-centre trial of monoclonal anti-D in the prevention of Rh-immunisation of RhD- male volunteers by RhD+ red cells. *Transfusion Med.*, 2000; 10 (Suppl. 1): 8.
106. Béliard, R. Monoclonal antibodies to prevent alloimmunization: lessons from clinical trials. *Transfusion Clin Biol.*, 2006; 13: 58-64.

107. Olovnikova, N. I., Belkina, E. V., Drize, N. I., Lemeneva, L. N., Miterev Gyw, Nikolaeva, T. L., Chertkov, I. L. Fast clearance of Rhesus positive erythrocytes by monoclonal anti-Rhesus antibodies – insufficient condition for effective prevention of Rhesus sensitization. *J Exp Biol Med.*, 2000; 129: 77-81.
108. Chauhan, A. R., Bhattacharyya, M. S., Turakhia, N., Daftary, G.V. Efficacy and safety of monoclonal anti-D immunoglobulin in comparison with polyclonal anti-D immunoglobulin in prevention of Rho immunization. *J Assoc Physicians India*, 2002; 50:1341-2.
109. Miescher, S., Spycher, M. O., Amstutz, H., de Haas, M., Kliijer, M., Kalus, U. J., Radtke, H., Hubsch, A., Andresen, I., Martin, R. M., Bichler, J. A single recombinant anti-RhD IgG prevents Rhesus D immunization: association of RhD positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the Fc γ RIIA and IIIA genes. *Blood*, 2004; 103: 4028-35.
110. Crawford, D. H., Azim, T., Daniels, G. L., Huehns, E. R. Monoclonal antibodies to the Rh D antigen; in Cash JD (ed.) *Progress in Transfusion Medicine*. Edinburgh, UK, Churchill Livingstone, 1988; 3: 175-97.
111. Thomson, A., Contreras, M., Gorick, B., Kumpel, B., Chapman, G. E., Lane, R. S., Teesdale, P., Hughes-Jones, N. C., Mollison, P. L. Clearance of Rh D-positive red cells with monoclonal anti-D. *Lancet*, 1990; 336: 1147-50.
112. Urbaniak, S. J., Greiss, M. A., Perera, W. S., Inskip, M., Flowitt-Hill, D., Armstrong-Fisher, S. S., Templeton, G., Downing, I., Fraser, R., Carter, M. C., Prowse, C. V. Assessment of in vivo function of IgG1 and IgG3 monoclonal anti-D by clearance of Tc99 labelled autologous rhesus D positive red blood cells. *Transfusion*, 1998; 38 (Suppl.): 33S.
113. Olovnikova, N. I., Belkina, E. V., Berkovsky, A. L., Lemeneva, L. N., Nikolaeva, T. L., Chertkov, I. L. Monoclonal anti-D immunoglobulin for the prophylaxis of hemolytic disease of the newborn. *Int J Gynaecol Obstet.*, 1994; 39: 3-6.
114. Cortey, A., Brossard, Y., Beliard, R., Bourel, D. Recommandations pour la pratique clinique. Prévention de l'allo-immunisation Rhésus-D feto-maternelle. *Perspectives. J Gynecol Obstet Biol Reprod.*, 2006; 35 (Suppl. 1): 1S119-1S122.
115. Chapman, G. E., Ballinger, J. R., Norton, M. J., Parry-Jones, D. R., Beharry, N. A., Cousins, C., Dash, C. H., Peters, A. M. The clearance kinetics of autologous RhD-positive erythrocytes coated ex vivo with novel recombinant and monoclonal anti-D antibodies. *Clin Exp Immunol.*, 2007; 150: 30-41.
116. Kumpel, B. M. In vivo studies of monoclonal anti-D and the mechanism of immune suppression. *Transfusion*, 2002; 9: 9-14.
117. Beliard, R., Waegemans, T., Notelet, D., Massad, L., Dhainaut, F., Romeuf, C. D., Guemas, E., Haazen, W., Bourel, D., Teillaud, J. L., Prost, J. F. A human anti-D monoclonal antibody selected for enhanced Fc γ RIII engagement clears RhD+ autologous red cells in human volunteers as efficiently as polyclonal anti-D antibodies. *British J Haematol.*, 2008; 141(1): 109-19.
118. Yver, A., Homery, M. C., Fuseau, E., Guemas, E., Dhainaut, F., Quagliaroli, D., Beliard, R., Prost, J. F. Pharmacokinetics and safety of roledumab, a novel human recombinant monoclonal anti-RhD antibody with an optimized Fc for improved engagement of Fc γ RIII, in healthy volunteers. *Vox Sang.*, 2012; 103: 213-222.
119. Díaz, D. Construcción y caracterización estructural y funcional de proteínas de fusión IgG-IgM con especificidad anti-RhG. Tesis de PhD. IVIC, 2009.
120. Frandsen, T. P. et al. Consistent manufacturing and quality control of a highly complex recombinant polyclonal antibody product for human therapeutic use. *Biotechnol & Bioengineering*, 2011; 108(9): 2171-81.
121. Robak, T. et al. Rozrolimupab, a mixture of 25 recombinant human monoclonal RhD antibodies, in the treatment of primary immune thrombocytopenia. *Blood*, 2012; 120(18): 3670-6.
122. Robak, T., Trelinski, J., Flensburg, M. F., Naested, H., Petersen, J. Rozrolimupab, a mixture of recombinant human monoclonal anti-D antibodies, for the treatment of primary immune thrombocytopenia – a review. *ISBT Science Series*, 2013; 8: 102-8.