



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**SEDE SUR:
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"**

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE VACUNAS SOBRE EL
DESARROLLO DE ANTICUERPOS ANTI-HLA DE NOVO**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA:
LUIS EDUARDO MORALES BUENROSTRO**

**TUTOR DE TESIS
DR RICARDO CORREA ROTTER**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:
DR. GERARDO GAMBA AYALA
DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA**

México, D.F.

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LUIS EDUARDO MORALES BUENROSTRO
Alumno de Doctorado en Ciencias Médicas

DR. RICARDO CORREA ROTTER
Jefe del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Tutor Principal

DR. GERARDO GAMBA AYALA
Unidad de Fisiología Molecular
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

DR. JULIO GRANADOS ARREOLA
Departamento de Trasplantes
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición SZ
Comité Tutorial

DRA. FLORENCIA VARGAS VORÁCKOVÁ
Responsable de la Unidad Operativa Sede Sur
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

DR. LUIS F. USCANGA DOMÍNGUEZ
Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| I. MARCO TEORICO..... | 2 |
| I.1.- Introducción..... | 2 |
| I.2.- Aspectos históricos | 2 |
| I.3.- El complejo mayor de histocompatibilidad y los antígenos HLA-MICA. | 4 |
| I.4.- Papel de los antígenos HLA y MICA en la presentación antigénica y generación de anticuerpos | 6 |
| I.5.- Métodos para medición de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA..... | 10 |
| I.6.- Implicaciones clínicas de los anticuerpos anti-HLA y anti-MICA..... | 15 |
| I.7.- ¿Es posible la generación de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA por vías diferentes a la aloinmunización?..... | 17 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 21 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 22 |
| IV. HIPÓTESIS..... | 23 |
| V. OBJETIVOS..... | 24 |
| VI. METODOLOGÍA..... | 25 |
| a) Diseño..... | 25 |
| b) Población de este estudio..... | 25 |
| c) Grupos de estudio..... | 25 |
| d) Lugar de realización..... | 25 |
| e) Periodo de tiempo..... | 25 |
| f) Tiempo de seguimiento de cada paciente..... | 26 |
| g) Criterios de inclusión..... | 26 |
| h) Criterios de exclusión..... | 27 |
| i) Criterios de eliminación..... | 27 |
| j) Tamaño de la muestra..... | 27 |
| k) Variables..... | 28 |
| l) Definición de variables..... | 29 |
| m) Procedimientos..... | 35 |
| VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 40 |
| VIII. RESULTADOS | 41 |
| IX. DISCUSIÓN..... | 59 |
| X. CONCLUSIONES..... | 63 |
| XI. ANEXOS..... | 64 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 65 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Tabla I.1.- Polimorfismo de algunos genes del sistema HLA para el año 2010..... | 4 |
| Tabla I.2.- Técnicas para detección de anticuerpos y algunas de sus características | 15 |
| Tabla VIII.1.- Características demográficas e historia de exposición a factores alosenibilizantes para los 4 grupos..... | 42 |
| Tabla VIII.2.- Número y proporción de pacientes que desarrollaron anticuerpos <i>de novo</i> en cada grupo, por tipo de anticuerpo..... | 43 |
| Tabla VIII.3.- Número y proporción de pacientes que con anticuerpos preformados en cada grupo, por tipo de anticuerpo..... | 44 |
| Tabla VIII.4.- Prevalencia de anticuerpos anti-HLA para cada especificidad clase I y clase II..... | 54 |
| Tabla VIII.5.- Epítopes identificados en donadores sanos..... | 55 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura I.1.- Genes del sistema HLA..... | 5 |
| Figura I.2.- Número de alelos para genes clase I y II del HLA a través del tiempo... | 5 |
| Figura I.3.- Procesamiento de los antígenos en la célula presentadora de antígenos y su acoplamiento a las moléculas clase I y II del HLA..... | 7 |
| Figura I.4.- Estructura de las moléculas MIC, de las moléculas clase I y II del HLA, así como detalles de la presentación antigénica..... | 8 |
| Figura I.5.- Formación de anticuerpos..... | 9 |
| Figura I.6.- Interpretación de la prueba con CDC y CDC-AHG..... | 11 |
| Figura I.7.- Principios generales de la prueba de ELISA, CF y Luminex..... | 12 |
| Figura VI.1.- Ensayo de absorción de anticuerpos..... | 39 |
| Figura VIII.1.- Comportamiento de los AcHLA <i>de novo</i> clase I y clase II posterior a la aplicación de la vacuna en sujetos sanos y pacientes con IRCT..... | 46 |
| Figura VIII.2.- Comportamiento de los AcHLA <i>de novo</i> clase I y clase II posterior a la aplicación de la vacuna en pacientes trasplantados..... | 47 |
| Figura VIII.3.- Comportamiento de los AcMICA <i>de novo</i> posterior a la aplicación de la vacuna en pacientes con IRCT y trasplantados..... | 48 |
| Figura VIII.4.- Comportamiento de los AcHLA durante los 6 meses de seguimiento en un paciente sano..... | 50 |
| Figura VIII.5.- Selección de los sujetos donadores sanos..... | 51 |
| Figura VIII.6.- Prevalencia de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA por intensidad y tipo..... | 52 |
| Figura VIII.7.- Prevalencia de AcHLA clase I y II por intensidad de fluorescencia..... | 53 |
| Figura VIII.8.- Comparación de prevalencias de AcHLA entre México y Los Ángeles. | 56 |
| Figura VIII.9.- Comparación de prevalencias de AcHLA entre Mexicanos y Japoneses. | 57 |

RESUMEN

Efecto de la aplicación de vacunas sobre el desarrollo de anticuerpos anti-HLA *de novo*

Introducción. Para buscar factores sensibilizantes diferentes a los tradicionales, se propuso determinar si la vacuna vs influenza induce el desarrollo de AcHLA y AcMICA en diferentes grupos de pacientes y conocer la prevalencia de dichos anticuerpos en sujetos sanos no alosensibilizados.

Material y Métodos. Estudio de 2 partes: Parte 1: se determinó la presencia y desarrollo *de novo* de AcHLA y AcMICA en 3 grupos de pacientes que recibieron la vacuna contra influenza: A) 42 adultos sanos, B) 40 pacientes con IRCT y C) 25 receptores de trasplante renal (RTR). Se agregó un grupo control de adultos sanos que rechazaron la vacuna: D) 22 controles. Se tomaron 8 muestras de suero: previo a la vacunación, a la semana y mensualmente hasta completar 6 meses. Parte 2: se buscó la prevalencia de dichos anticuerpos en sujetos masculinos no alosensibilizados. Todas las muestras fueron analizadas con Labscreen Single Antigen® mediante Luminex. Se utilizó Chi cuadrada para variables categóricas y T de Student o ANOVA de 1 vía para las variables continuas. Realizamos análisis multivariado con regresión logística. Se consideró significativa una $P < 0.05$.

Resultados. Parte 1: La proporción de anticuerpos *de novo* fue mayor en los pacientes con IRCT y RTR, con 2.4%, 17.5%, 20% y 0% para los grupos A, B, C y D, respectivamente, al igual que los anticuerpos preformados en 67%, 78%, 88% y 27% para esos mismos grupos. La presencia de anticuerpos preformados fue el único factor predictor del desarrollo de anticuerpos *de novo*. Parte 2: Hasta en 84% de los sujetos no alosensibilizados se encontró al menos un anticuerpo positivo.

Conclusiones. Es factible el desarrollo de AcHLA y AcMICA *de novo* tras un estímulo externo diferente a los antígenos HLA, aunque no todos los casos pueden ser adjudicados a la vacuna. La prevalencia de anticuerpos “naturales” es muy alta en población general y esto sugiere que existen otros factores alosensibilizantes diferentes a los tradicionalmente aceptados.

I. MARCO TEORICO

I.1.- Introducción

No cabe duda que el mejor tratamiento de la insuficiencia renal crónica terminal es el trasplante renal, sin embargo, no todos los pacientes tienen acceso a un trasplante y aquellos que logran trasplantarse con frecuencia tienen antecedente de múltiples transfusiones debido a la anemia renal, han tenido un trasplante previo o son mujeres con uno o más embarazos previos, factores que favorecen el desarrollo de anticuerpos dirigidos contra antígenos leucocitarios humanos (HLA) y contra la proteína A relacionada al complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MICA por sus siglas en inglés de Major histocompatibility complex –MHC- class I chain-relates protein A). En el peor de los escenarios, cuando estos anticuerpos están dirigidos contra antígenos HLA que tiene el potencial donador, puede producir una prueba cruzada positiva a pesar de tener compatibilidad ABO, lo cual contraindicaría el trasplante si no se hace nada para eliminar dichos anticuerpos. Por otro lado, si se generan después del trasplante pueden producir daño agudo y/o crónico que reducirá la vida útil del injerto.

I.2.- Aspectos históricos

Al final de los años 1930's, los genes ligados al MHC fueron identificados en modelos de ratón por Gorer¹ y Snell².

En 1952, Dausset y Rappaport describieron la molécula HLA mediante el estudio de pacientes aloinmunizados³.

En 1964, el Dr. Paul I. Terasaki desarrolló y mostró las ventajas de la técnica de microlinfotoxicidad para las pruebas cruzadas desplazando a las pruebas basadas en leucocitos

totales (que utilizaba cantidades mayores de suero y células), prueba que hasta el momento actual es el estándar de oro para la compatibilidad donador-receptor previo a trasplante renal y donde una prueba positiva habla de presencia de anticuerpos en el receptor dirigidos contra especificidades antigénicas presentes en los linfocitos del donador, principalmente antígenos HLA⁴.

En 1966, Kissmeyer-Nielsen y Terasaki, casi simultáneamente, enfatizaron el rol de la “inmunidad humoral” en la génesis del rechazo hiperagudo.

En 1967, Dausset y Rappaport mostraron la correlación entre antígenos HLA compartidos entre donador-receptor y supervivencia del injerto (determinada por los eventos de rechazo agudo), sentando las bases para la asignación de órganos basado en el número de antígenos compartidos. Tonegawa en 1978, sugirió que la respuesta humoral era determinada genéticamente⁵.

La rápida expansión y disponibilidad de bases de datos que contienen las secuencias del ADN y diversas proteínas, aunado a la accesibilidad a herramientas de mapeo y análisis comparativos de secuencias, han permitido la identificación de genes homólogos y descripción de nuevas familias de genes en una escala masiva^{6,7}. Por consiguiente, antígenos no clásicos o antígenos menores han sido estudiados con mayor profundidad, como es el caso de los antígenos MICA descritos por Bahram en 1994⁸ y que paulatinamente han cobrado importancia por las implicaciones clínicas del desarrollo de anticuerpos contra MICA en trasplante de órganos sólidos⁹.

Otros anticuerpos contra antígenos menores están siendo explorados ante el hecho de que pacientes con evidencia de pérdida del injerto temprana, secundaria a daño mediado por anticuerpos o en el contexto de trasplante de médula ósea con HLA idénticos que desarrollan enfermedad de injerto contra el huésped, no muestran anticuerpos anti-HLA (AChLA) o anti-MICA

(AcMICA) detectables¹⁰. Sin embargo, hasta el momento solo hay métodos de laboratorio comercialmente disponibles para medir AcHLA y AcMICA.

I.3.- El complejo mayor de histocompatibilidad y los antígenos HLA

Los genes del MHC son, con mucho, los más polimórficos en el genoma humano y se localizan en el cromosoma 6. Estos genes codifican los antígenos de superficie celular conocidos comúnmente como moléculas clase I, clase II y clase III del MHC. En humanos, los antígenos clase I clásicos (o antígenos MHC-Ia) son las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C, pero también existen los no clásicos (o antígenos MHC-Ib) como el HLA-E, HLA-F y HLA-G, moléculas con bajo nivel de polimorfismo y muy baja expresión celular comparados con los antígenos clásicos. Por otro lado, los antígenos clase II clásicos incluyen a las moléculas HLA-DP (A y B), HLA-DQ (A y B) y HLA-DR (A y B) (Figura I-1). En el contexto del laboratorio de histocompatibilidad para trasplante renal, inicialmente solo se tipificaban las moléculas HLA-A y HLA-B, pero poco después se introdujeron las moléculas HLA-DR. Actualmente se pueden tipificar el HLA-C, -DQ y -DP, pero varía de laboratorio a laboratorio⁹. Estos antígenos son muy polimórficos (Tabla I-1), de tal manera que se han identificado múltiples alelos y siguen incrementándose con el paso del tiempo (Figura I.2)¹¹.

Tabla I.1.- Polimorfismo de algunos genes del sistema HLA para el año 2010.

| CLASE I | No. Alelos | CLASE II | No. Alelos | MIC | No. Alelos |
|----------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------|-------------------|
| HLA-A | 1519 | HLA-DRA | 3 | MICA | 73 |
| HLA-B | 2069 | HLA-DRB(1-9) | 966 | MICB | 31 |
| HLA-C | 1016 | HLA-DQA1 | 35 | | |
| HLA-E | 10 | HLA-DQB1 | 144 | | |
| HLA-F | 22 | HLA-DPA1 | 28 | | |
| HLA-G | 46 | HLA-DPB1 | 145 | | |

Figura I.1.- Genes del sistema HLA.

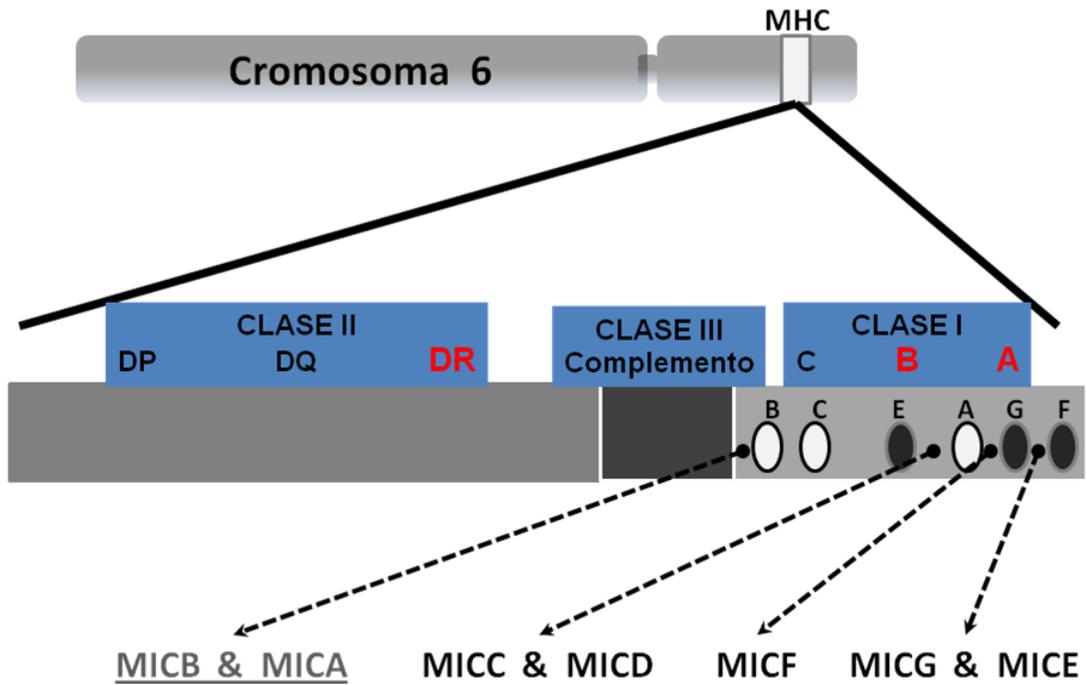
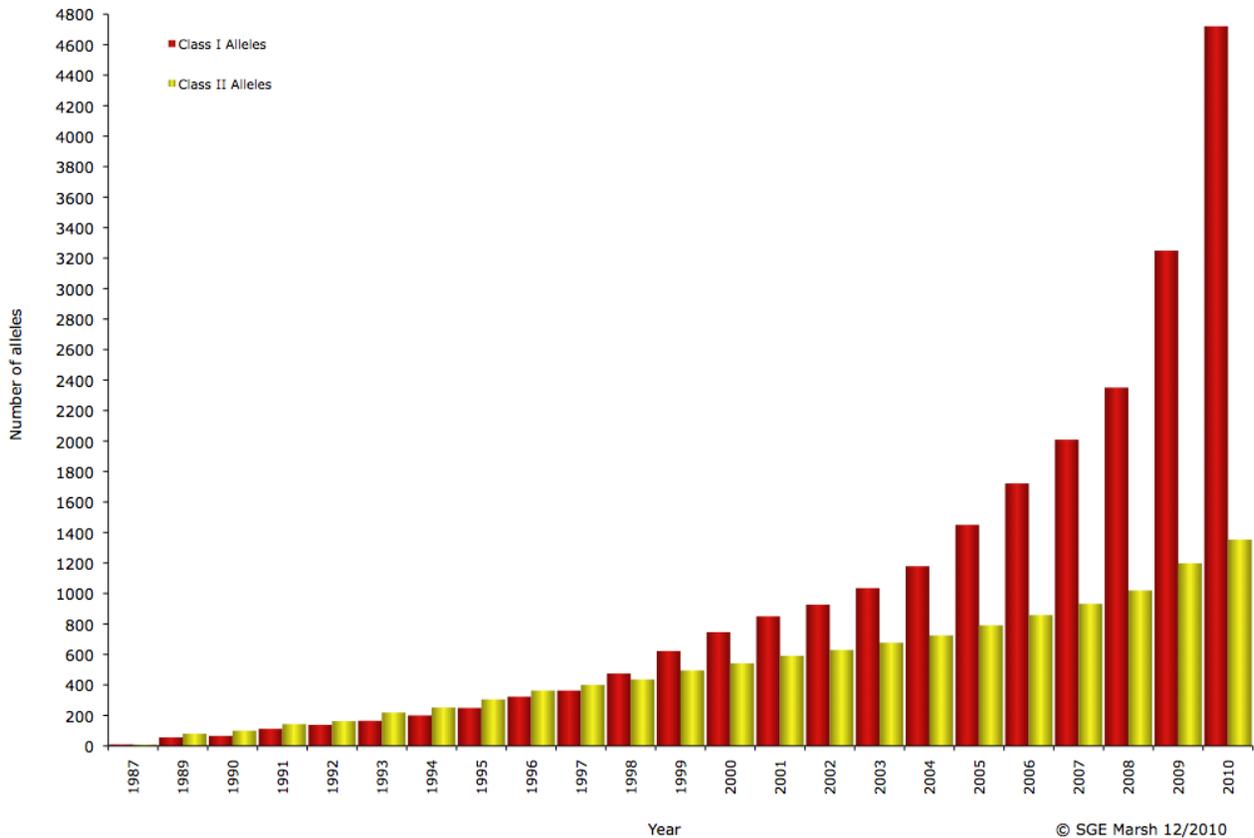


Figura I.2.- Número de alelos para genes clase I y II del HLA a través del tiempo.



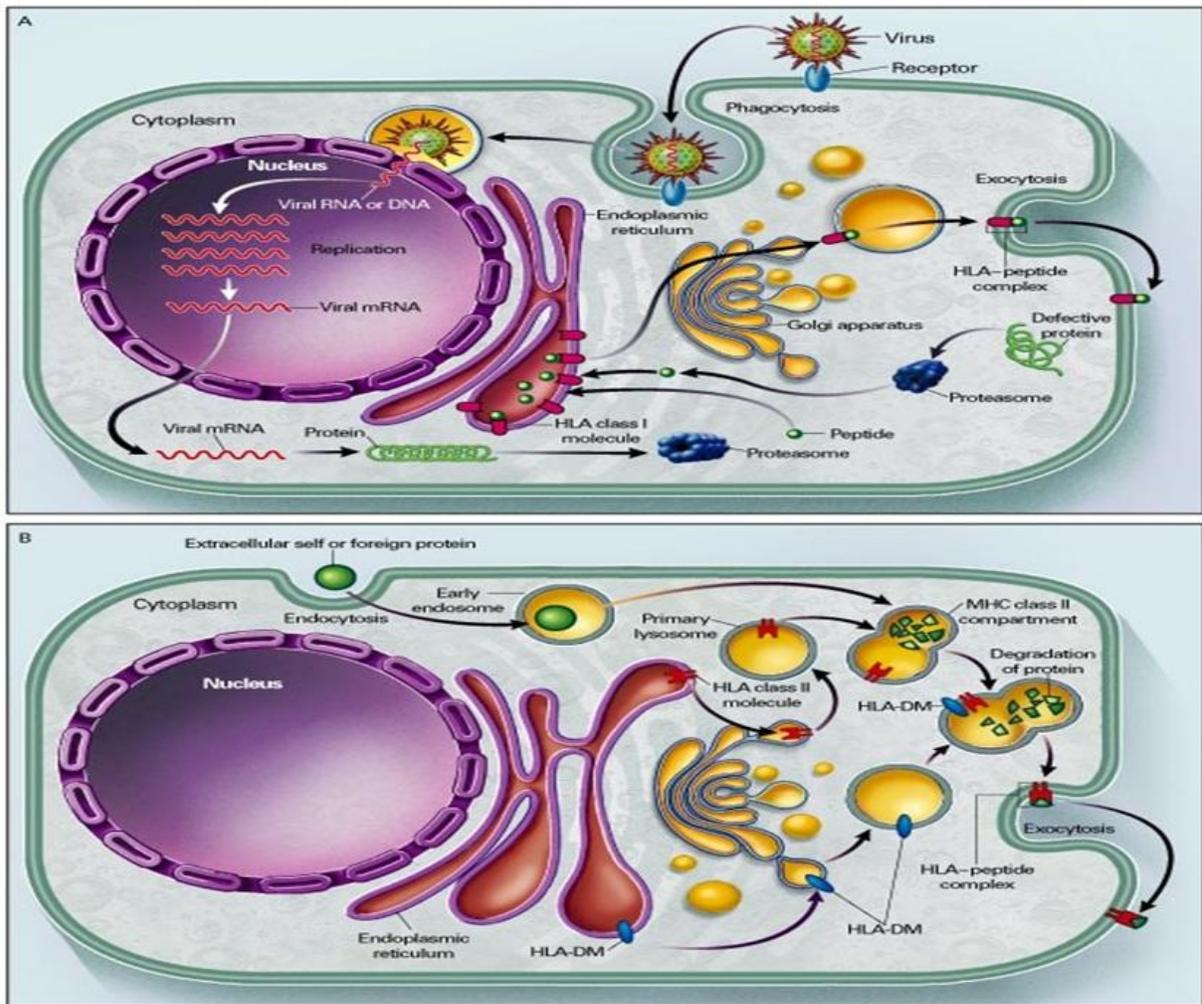
Esta gran variabilidad tiene implicaciones claras para el área de trasplantes. Esta diversidad de polimorfismos de los antígenos del MHC hace que la probabilidad de que un potencial receptor de trasplante renal encuentre un donador “no relacionado” con los mismos alelos HLA sea menor de 1:1'000,000¹².

I.4.- Papel de los antígenos HLA y MICA en la presentación antigénica y generación de anticuerpos

Cuando una partícula potencialmente sensibilizante ingresa al organismo de un humano (como un germen, o en caso de alosensibilización serían células nucleadas humanas que expresan antígenos HLA en su superficie), la célula presentadora de antígenos –CPA- (células profesionales encargada de presentar el antígeno a las células del sistema inmunológico, cuyo representante principal es la célula dendrítica), procesará en su interior al antígeno en cuestión. Dicho procesamiento es diferente si están participando las moléculas del MHC clase I o clase II. Para las clase I, el germen o antígeno es fagocitado por la CPA, se procesan con ayuda del proteosoma celular, donde son degradados a pequeños péptidos que pasan al retículo endoplásmico donde se llevará a cabo el acoplamiento con las moléculas del MHC y finalmente migrar a la superficie celular donde será expuesta. En el caso de las moléculas clase II, el germen o antígeno se traslada al interior de la CPA por endocitosis y con ayuda de enzimas lisosomales serán degradados a pequeños péptidos dentro del mismo endosoma, donde se acoplarán a las moléculas del MHC clase II para finalmente unirse el endosoma a la membrana celular y de esta manera exponerse en su superficie (Figura I.3), que será tomado por las moléculas del MHC localizadas en la superficie de la célula y que son las encargadas de presentárselo al receptor de células T (TCR). Este receptor

reconocerá a los aminoácidos de los péptidos extraños y a las moléculas HLA que lo están presentando. Los genes del MHC, determinan los arreglos en el locus del TCR y de esta manera determina el espectro de antígenos que pueden ser reconocidos en la vida de un individuo. Cada TCR es muy específico para una secuencia particular de aminoácidos en un péptido antigénico⁹.

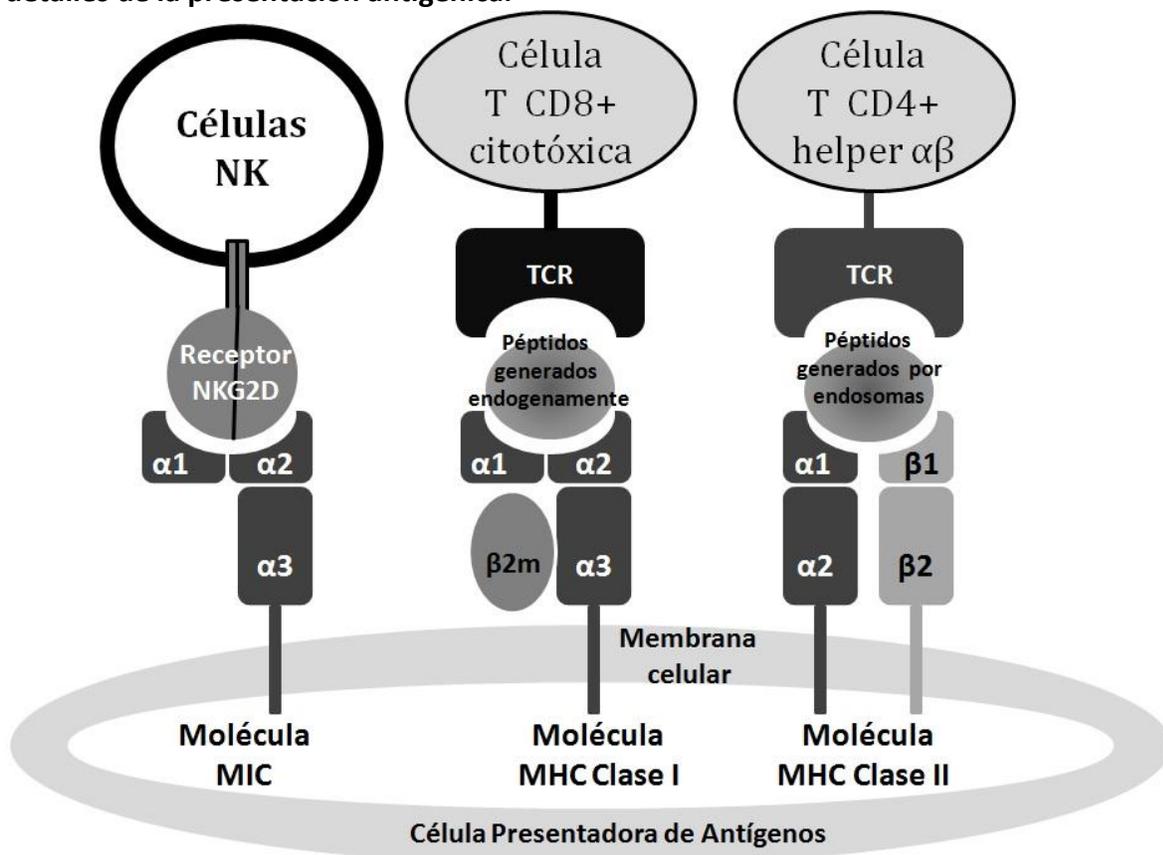
Figura I.3.- Procesamiento de los antígenos en la célula presentadora de antígenos y su acoplamiento a las moléculas clase I y II del HLA.



Como se puede observar en la Figura I.4, la estructura de las moléculas MIC y HLA clase I y II difieren. La diferencia principal es que la molécula HLA clase II tiene 2 cadenas (α y β), cada una con dos dominios extracelulares, dos transmembranales y dos colas intracitoplasmática, mientras

que la molécula clase I y MIC, tienen una sola cadena (α) con tres dominios extracelulares, un dominio transmembranal y una sola prolongación intracitoplasmática; estas últimas difieren en el hecho de que las moléculas clase I contienen una molécula de $\beta 2$ microglobulina. Las moléculas MIC no presentan antígeno sino que se unen al receptor de las células NK (NKG2D) de manera directa para activarla⁹.

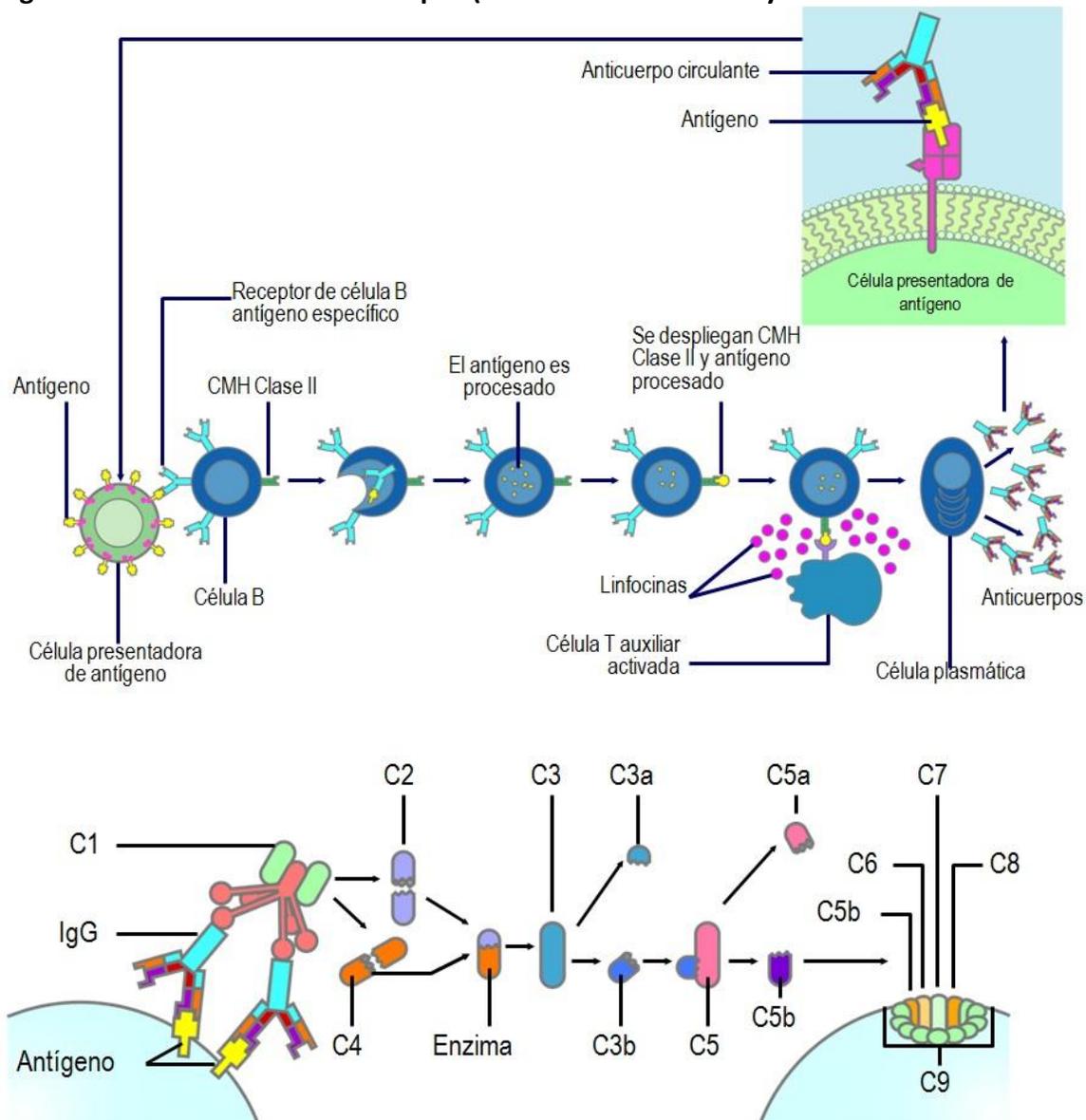
Figura I.4.- Estructura de las moléculas MIC, de las moléculas clase I y II del HLA, así como detalles de la presentación antigénica.



Sin embargo, como lo muestra la Figura I.5, la célula B también puede ser activada ya sea por citocinas liberadas por estas células T o NK activadas o directamente por la CPA, dando lugar a una producción de anticuerpos “antígeno-específicos”. De hecho, el linfocito B utiliza su “anticuerpo-receptor” para ligar un antígeno correspondiente, el cual engloba y procesa. Esto

activa la transformación de la célula B en una célula plasmática que produce millones de copias del mismo anticuerpo “antígeno-específico”. Estos anticuerpos circulan en el torrente sanguíneo en búsqueda de más antígenos a los que se unen. Sin embargo, estos anticuerpos no pueden destruir, por sí mismos, a un organismo invasor o una célula extraña, pero sirven de marcaje para que otras células del sistema inmune lo hagan o que se agregue el complemento y este forme perforaciones en el citoplasma de esa célula extraña a través del complejo de ataque del complemento.

Figura I.5.- Formación de anticuerpos (tomada de Jeanne Kelly. National Cancer Institute.2004).



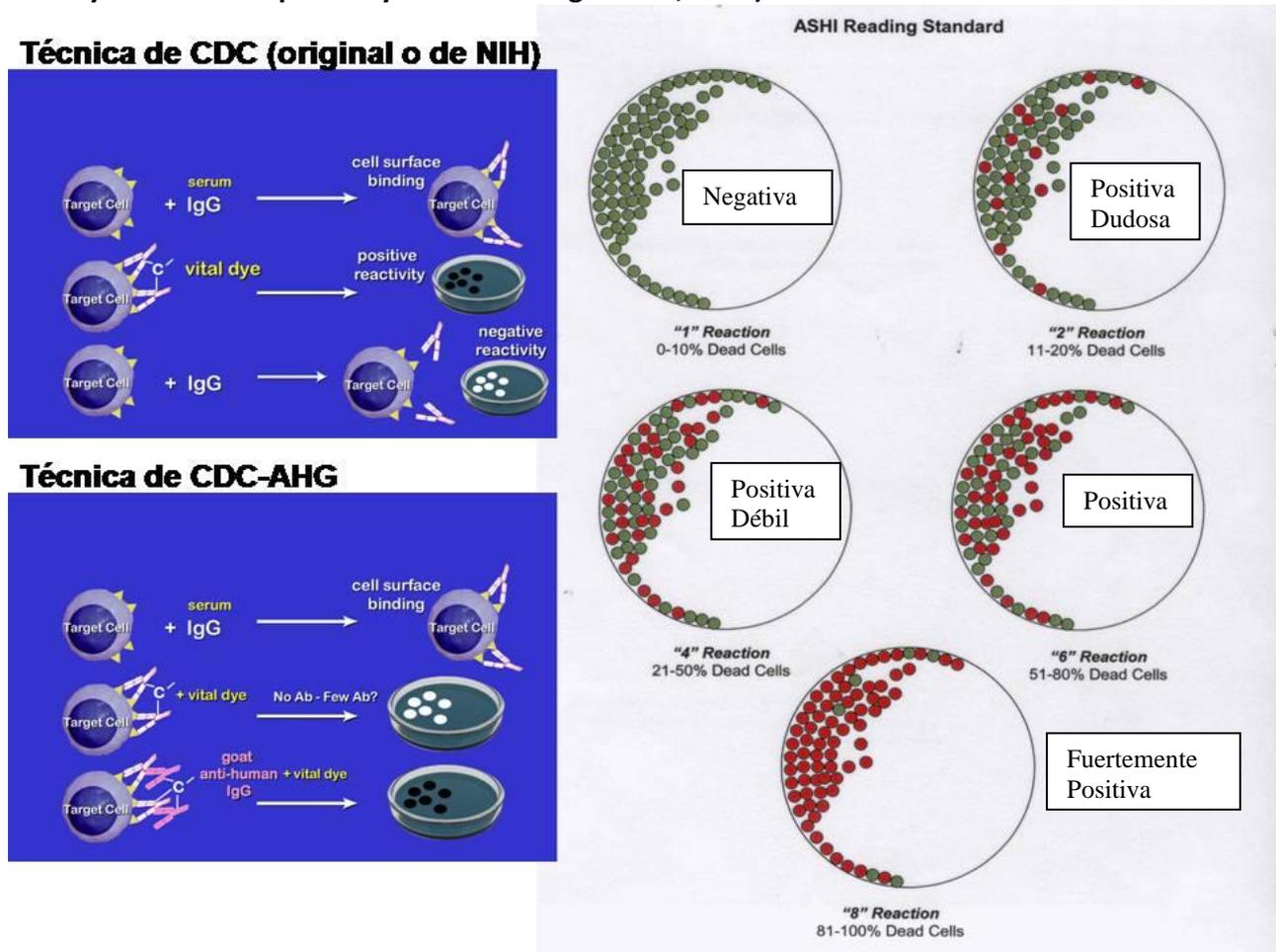
I.5.- Métodos para medición de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA

Existen 4 técnicas de laboratorio para la detección de anticuerpos anti-HLA y que en orden cronológico de aparición en el mercado y de su sensibilidad para detectar los anticuerpos son: 1) Método por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), 2) Método de ELISA, 3) Método por citometría de flujo (CF) y 4) Método por técnica de Luminex¹³.

Desde que se iniciaron las pruebas cruzadas en la década de los 60's, utilizando leucocitos totales, para posteriormente dar paso al uso de linfocitos con la técnica propuesta por Terasaki, dichas pruebas lo que hacen es detectar anticuerpos del potencial receptor dirigidos contra antígenos presentes en la superficie de la célula (ya sean HLA o no HLA, ambos "donador-específicos")⁴. Adicionalmente, podemos conocer el espectro de anticuerpos que tiene ese potencial receptor, al analizar su suero contra un panel de linfocitos cuyos antígenos son conocidos y expresar en término de porcentaje, el grado de sensibilización respecto a ese panel (%PRA, panel de anticuerpos reactivos, por sus siglas en inglés). Estas técnicas denominadas citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), posteriormente se modificaron para mejorar su sensibilidad, agregando inmunoglobulina humana (CDC-AHG). Brevemente, para esta técnica se requieren 2 ml de suero del receptor y 2-5 ml de sangre del donador, de donde mediante técnica de Ficoll se separará el "botón" de linfocitos por densidades. Después de homogeneizar la concentración de linfocitos a 2,000 células x mL, se toma un mL y se mezcla con un mL del suero a analizar (de haber anticuerpos donador-específico se unirán a los linfocitos), después de incubar por 30 minutos se agrega complemento de conejo (para CDC-AHG se agregó antes inmunoglobulina) y se incuba por 60 minutos (se une al complejo antígeno-anticuerpo y forma el complejo de ataque para finalmente destruir al linfocito). Finalmente se agrega eosina (para diferenciar las células vivas

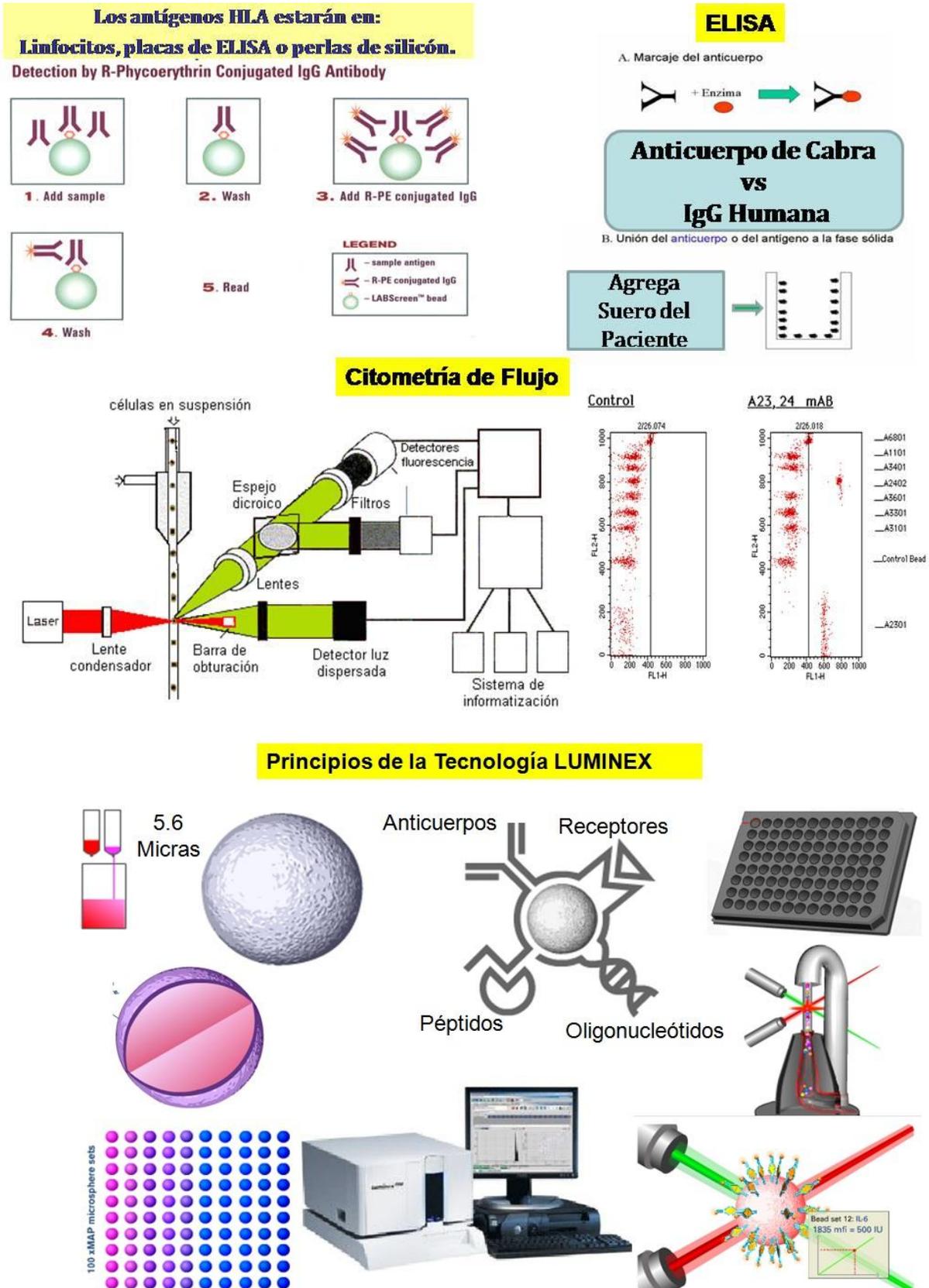
de las lisadas) y se fija con formol para proceder a la lectura. La reacción se clasifica según el porcentaje de células lisadas (Figura I.6). Cabe señalar que esta técnica también se usa para tipificación HLA de un sujeto, para lo cual se usan sueros previamente conocidos con un anticuerpo específico y en este caso para considerar una reacción positiva se requiere el 20% de lisis¹³.

Figura I.6.- Interpretación de la prueba cruzada por CDC y CDC-AHG (tomada de la American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, ASHI).



Las pruebas de CDC, ELISA, CF y Luminex siguen los mismos principios generales como se observa en la Figura I.7; los antígenos HLA y/o MICA estarán en la superficie de linfocitos (CDC y CF), en las placas de ELISA o sobre microesferas de silicón (CF y Luminex), se agrega suero, un anticuerpo secundario contra IgG humana con marcaje y después de lavados, se hace la lectura¹⁴.

Figura I.7.- Principios generales de la prueba de ELISA, Citometría de Flujo y Luminex.



En el método de ELISA, los antígenos purificados se encuentran fijados al fondo de los “pocillos” de la placa de ELISA, se aplica el suero a analizar, después de incubación y lavados, se aplica el anticuerpo secundario que tiene agregado una enzima que servirá como marcador; después de nueva incubación y lavado, se agrega el sustrato que degrada la enzima y que será captado por el lector de ELISA (Figura I.7)^{13,14}.

Para la citometría de flujo se puede utilizar tanto células que pueden ser linfocitos (para medir AcHLA), monocitos (para medir AcMICA) o microesferas de látex recubiertas de antígenos HLA y/o MICA purificados mediante tecnología recombinante. A diferencia del ELISA, el marcaje del anticuerpo secundario será con materiales fluorescentes como ficoeritrina y mediante un lector se medirá la intensidad de la luminiscencia (Figura I.7)^{13,14}.

Con el Luminex solo se pueden utilizar microesferas de látex cubiertas de antígenos purificados. Las microesferas tienen en su interior una combinación de dos colorantes, cuya concentración permite diferenciar hasta 100 microesferas diferentes. Cada una tendrá diferentes antígenos en su superficie, de tal manera que el lector reconocerá mediante un láser de que microesfera se trata (y el software especializado sabrá que antígenos corresponde) y el segundo láser medirá la luminiscencia (Figura I.7). La ventaja de esta técnica es que se pueden incubar con cada suero hasta 100 microesferas (dígase antígenos o combinación de antígenos) diferentes y se pueden leer hasta 96 muestras en una sola placa (94 sueros diferentes con sus respectivos controles negativo y positivo), con lo que se ahorra mucho tiempo. Como dato adicional, Luminex tiene una exactitud en el volumen de suero analizado de $\pm 5\%$, exactitud de la clasificación de las microesferas de $>80\%$, puede trasladar muestra a la siguiente lectura en menos de 0.9% y detecta 1000 fluorocromos de ficoeritrina por microesfera.^{13,14,15,16,17}

Cabe señalar que estos métodos que utilizan antígenos purificados suelen tener 3 tipos diferentes de reactivos: 1) Escrutinio o tamizaje.- es la más económica porque utiliza menos microesferas o pocillos de ELISA y en cada uno se combina hasta 18 antígenos diferentes (eso sí, de manera separada los clase I y clase II). 2) Para %PRA o de fenotipo.- En esta prueba de costo intermedio, cada microesfera o pocillo de ELISA semeja el fenotipo de una célula, es decir, combina 6 antígenos clase I (2 de locus A, 2 de locus B y 2 de locus C) o 6 antígenos clase II (2 de locus DR, 2 de locus DQ y 2 de locus DP). 3) De antígeno único o “Single Antigen”.- En la cual cada microesfera o pocillo contiene un solo antígeno ya sea de clase I o clase II. Si bien, el número total de antígenos explorados es parecido, en los 2 primeros no podemos saber con certeza contra cual antígeno está dirigido el anticuerpo dado que existen varios combinados, mientras que con “single antigen” se conoce perfectamente la especificidad de los anticuerpos¹⁸.

Lo que suele hacerse en gran parte de los laboratorios a nivel internacional es que cada uno selecciona la técnica que mejor se adapte a su laboratorio, ya sea por la capacitación de su personal o por el equipamiento al momento de iniciar con esas pruebas. Por otro lado, independientemente de la técnica utilizada, por cuestión de costos, los sueros pretrasplante se analizan para conocer el %PRA ya que con el valor de %PRA se establece grado de riesgo inmunológico. Para otro tipo de mediciones o seguimiento postrasplante, suele usarse pruebas de escrutinio y solo si salen positivas se corre el “Single Antigen”. Pero indudablemente que para estudios como el presente, si queremos conocer con certeza que anticuerpos se generaron, se debe utilizar el método más sensible (Luminex) y con la prueba de “Single Antigen”.

En la Tabla I.2 se muestran algunas características. Aquellos métodos que usan superficie celular detectarán antígenos HLA y No-HLA presentes en la misma, pero solo aquellos con

capacidad de fijar complemento. Aquellos como ELISA, citometría de flujo y luminex que usan antígenos purificados, solo detectarán los antígenos HLA y/o MICA en cuestión, pero pueden detectar anticuerpos con y sin capacidad de fijar complemento. Si bien, los anticuerpos que nos interesan son los IgG (en sus 4 variantes, fijen o no fijen complemento), se pueden detectar IgA e IgM si se cambia el anticuerpo secundario (normalmente es una IgG de carnero anti-IgG humana). Ahora bien, los métodos que usan superficie celular siempre detectarán anticuerpos de interés clínico y específicos del donador (o donante de esas células) pero solo aquellos que fijan complemento, mientras que aquellos que usan antígenos purificados pueden detectar anticuerpos específicos e inespecíficos, que fijan y no fijan complemento, es decir, tiene una mayor capacidad de detección, pero puede ser que detecte anticuerpos que no tengan significancia clínica.

Tabla I.2.- Técnicas para detección de anticuerpos y algunas de sus características.

| TÉCNICA DE LABORATORIO | SUPERFICIE UTILIZADA | TIPO DE PRUEBA | | | | |
|----------------------------|--|----------------|----------|------|------------------|---------------------|
| | | Prueba Cruzada | Tamizaje | %PRA | “Single Antigen” | MICA |
| CDC y CDC-AHG | Membrana celular | +++ | - | + | - | - |
| ELISA | Placas de ELISA | - | + | + | + | + |
| CITOMETRIA DE FLUJO | Membrana celular y Microesferas de látex | ++ | + | + | ++ | Debe usar Monocitos |
| LUMINEX | Microesferas de látex | - | + | + | +++ | +++ |

I.6.- Implicaciones clínicas de los anticuerpos anti-HLA y anti-MICA en trasplante renal

En la actualidad y a pesar de una prueba cruzada negativa entre el donador y el receptor, la mayoría de centros de trasplantes hacen una búsqueda dirigida de anticuerpos anti-HLA (AcHLA) mediante la determinación de Panel de Anticuerpos Reactivos y que se expresa en porcentaje (%PRA). La sensibilidad de esta prueba, permite documentar la presencia de anticuerpos IgG

contra diversas especificidades antigénicas HLA Clase I y Clase II. Recientemente, se ha logrado desarrollar tecnología que además de anticuerpos anti-HLA, detecten anticuerpos dirigidos contra la molécula MICA, sobre todo con técnica de ELISA¹⁹ y con Luminex²⁰. Cabe señalar que debido a que las moléculas MICA no se expresan en linfocitos, no se puede detectar por CDC o CDC-AHG; sin embargo, esta molécula se expresa en monocitos, por lo que es factible separarlos por citometría de flujo para hacer pruebas cruzadas con monocitos y entonces detectar los anticuerpos anti-MICA con técnicas basadas en membrana celular.

La presencia de AcHLA y AcMICA preformados antes del trasplante,^{21,22} al igual que aquellos desarrollados *de novo* postrasplante,^{23,24,25,26} han sido asociados con un peor pronóstico del injerto renal. Los estudios muestran una asociación de estos anticuerpos con rechazo agudo,^{27,28,29,30} rechazo crónico^{31,32} y con una disminución en la sobrevida del injerto renal.^{30,33,34,35} Actualmente, no hay duda que cuando los AcHLA están dirigidos contra los antígenos presentes en el injerto se incrementa el riesgo de complicaciones inmunológicas y la pérdida del injerto,^{36,37,38} sin embargo, también los anticuerpos que no son específicos contra dichos antígenos juegan un papel importante en la agresión inmunológica del injerto.^{39,40,}

En nuestro Instituto realizamos un estudio transversal en una cohorte de pacientes receptores de trasplante renal (RTR) con injerto funcional, encontrando una prevalencia de anticuerpos anti-HLA del 22%. La presencia de estos anticuerpos no tuvo asociación con el grado de función renal, sin embargo, debemos tomar en cuenta que se trataba de una cohorte de supervivientes y desconocemos si aquellos que perdieron el injerto tenían anticuerpos anti-HLA.⁴¹ Sin embargo, al darle seguimiento durante más de 2 años a este mismo grupo de pacientes, fue evidente que aquellos que tenían AcHLA y simultáneamente AcMICA tuvieron mayor deterioro de

la función renal medida tanto por creatinina sérica como por tasa de filtrado glomerular⁴² y menor sobrevida del injerto⁴³, comparado con aquellos pacientes que solo tenían AcHLA, solo tenían AcMICA o no tenían anticuerpos detectables, lo que habla de un efecto aditivo.

I.7.- ¿Es posible la generación de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA por vías diferentes a la aloinmunización?

Históricamente ha sido aceptado que la única vía para que un individuo presente AcHLA es que haya sido aloinmunizado mediante transfusiones de productos sanguíneos, trasplantes de tejidos o embarazos; es decir, mediante la exposición de un sujeto a células humanas que expresan en su superficie antígenos HLA y/o MICA. Sin embargo, trabajos previos de nuestro grupo han hecho evidente el desarrollo de AcHLA *de novo* postrasplante dirigidos contra especificidades diferentes a las presentes en el injerto, aún sin haber sido transfundidos durante la cirugía.⁴⁴ Adicionalmente, otros estudios han mostrado la presencia de AcHLA inespecíficos en pacientes con pérdida del injerto asociados a rechazo agudos.⁴⁵

Otro motivo para sospechar que hay otras vías de sensibilización es que cuando se analizan pacientes multitransfundidos⁴⁶ o pacientes en lista de espera para trasplante renal de donador fallecido⁴⁷, dichos pacientes presentan una gran cantidad de anticuerpos dirigidos contra una variedad de especificidades más allá de lo esperado para los antígenos prevalentes en esa población y de donde eventualmente pertenece la fuente de sensibilización (de ahí deberían haber salido los donadores de sangre o del órgano previo para segundos trasplantes).

Motivados por esa interrogante, desde enero del 2004 iniciamos un estudio prospectivo que incluyó a todos los RTR sometidos a trasplante en 2004 y 2005, para conocer el

comportamiento de los anticuerpos anti-HLA durante el primer año postrasplante y su efecto sobre la función e histología del injerto renal al año de seguimiento. Para tal efecto, se hicieron determinaciones del %PRA antes del trasplante, así como a las 2 semanas y mensualmente hasta completar un año postrasplante, con biopsia del injerto al momento del trasplante y al año. Los resultados mostraron que 21/29 (72%) de los RTR que tenían PRA negativo pretrasplante, desarrollaron AchLA *de novo* durante el primer año de seguimiento y solo en 5 de ellos estaban dirigidos contra los antígenos presentes en el injerto. Por otro lado, el comportamiento del %PRA fue muy inconstante, ya que la mayoría de pacientes mostraban %PRA muy diferente en cada medición e incluso con periodos negativos. En este estudio, el tener un %PRA negativo se asoció con histología normal en la biopsia del injerto al año de seguimiento. No hubo asociación entre desarrollo de AchLA y deterioro de la función renal⁴⁴. Dentro de este mismo estudio, se analizó el comportamiento de la respuesta inmune celular mediante la cuantificación de la subpoblación de células T reguladoras, encontrando que dicha subpoblación era menor cuando se generaban los AchLA.⁴⁸

Después de analizar los resultados de estos estudios y tomando en cuenta que la generación de AchLA en contra de especificidades diferentes a las presentes en el injerto es un fenómeno que no ha sido esclarecido, surgió la pregunta de si ¿algunos estímulos antigénicos diferentes a antígenos HLA podrían inducir la formación de AchLA y/o AcMICA como parte de una respuesta inespecífica? Para intentar responder esta pregunta, la realizamos un estudio clínico,⁴⁹ que incluyó 20 sujetos adultos voluntarios, trabajadores de la salud (10 hombres y 10 mujeres), sin enfermedades autoinmunes o tratamiento inmunosupresor y que tuvieran el antecedente de por lo menos una aplicación de vacuna contra el VHB. Como estímulo antigénico se aplicaron 20 mcg

de vacuna recombinante vs VHB y la prueba de intradermoreacción con PPD. La determinación de AcHLA Clase I y Clase II se realizó antes del estímulo antigénico (BASAL), en la semana 1, 4 y 7 posteriores al estímulo antigénico mediante LABScreen PRA para LUMINEX[®]. Solo una mujer tenía un PRA clase I de 31% en la muestra basal y no se modificó a la semana, el resto de individuos tuvieron un 0% de PRA basal y a la semana. Para la semana 4, 8/20 sujetos desarrollaron AcHLA *de novo* ($p=0.004$) y en la semana 7, se agregó otro sujeto, mientras que dos negativizaron los AcHLA. A todos los sujetos se les tipificó el HLA y se confirmó que eran aloanticuerpos y no autoanticuerpos. Adicionalmente, se realizó prueba de linfocitotoxicidad con el suero de los sujetos positivos y en 6/9 se corroboró capacidad de citotoxicidad mediada por complemento, por lo que no deja duda que se trataban de AcHLA. No se encontró asociación entre desarrollo de AcHLA e historia de transfusiones, embarazos, género, uso de fármacos, historia de cirugías, respuesta al PPD o a la vacuna vs VHB. Tampoco hubo correlación entre nivel de PRA y los títulos de AcAgs del VHB o tamaño de induración postaplicación del PPD. Los resultados obtenidos demostraron que puede haber generación de AcHLA (aloanticuerpos) en individuos expuestos a estímulos antigénicos distintos a moléculas HLA (como vacunas y/o PPD) y que no corresponde a una respuesta anamnésica sino a una respuesta primaria dado el tiempo de aparición de dichos anticuerpos. Una de las limitantes de este estudio, a pesar de que se analizaron las muestras con Luminex, fue que se utilizó el reactivo LABScreen PRA donde las microesferas de látex contienen 6 antígenos diferentes y solo se analizaron con Single Antigen (microesferas con un solo antígeno) las muestras positivas, por lo que no se puede descartar del todo que hubiera anticuerpos a niveles bajos desde la muestra basal y que no fueran detectados con la prueba utilizada; adicionalmente, los sueros fueron analizados en tiempos diferentes para un mismo paciente lo que pudiera explicar

algo de su variabilidad. Por otro lado, solo incluimos sujetos sanos de tal manera que los datos no se pueden extrapolar a la población blanco que nos interesa como son los pacientes con insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) en lista de espera de trasplante renal o los pacientes ya trasplantados.

Esto motivó el desarrollo del presente estudio, con el objeto de determinar si la vacuna contra influenza (que se aplica cada año a pacientes con IRCT y trasplantados), induce el desarrollo de AcHLA y AcMICA tanto en población sana, como población con insuficiencia renal crónica terminal (potenciales receptores de trasplante renal) y pacientes trasplantados, además de conocer su comportamiento a lo largo de 6 meses. Pero todo esto quedaría incompleto si no conocemos la prevalencia de dichos anticuerpos en la población general, ya que de corroborarse su existencia en sujetos sanos, explicaría el hallazgo o formación de anticuerpos inespecíficos en pacientes trasplantados. Hay que recordar que otros tipos de anticuerpos (sobretudo en autoinmunidad, que es una situación diferente) se pueden encontrar hasta en un 7% de la población general sin que haya evidencia de enfermedad, como anticuerpos antinucleares, anti-DNA, anti-fosfolípidos, entre otros, por lo que no sería tan extraño que un porcentaje similar de sujetos sanos tuvieran algún tipo de anticuerpo anti-HLA y/o anti-MICA.

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Está demostrado que cuando los AchLA *de novo* están dirigidos contra los antígenos presentes en el injerto son más factibles las complicaciones inmunológicas y la pérdida del injerto, sin embargo, también los anticuerpos que no son específicos contra dichos antígenos juegan un papel importante en la agresión inmunológica del injerto. La experiencia obtenida hasta el momento tanto en nuestro centro como por otros grupos dedicados al trasplante renal, muestra que gran parte de los pacientes RTR desarrollarán AchLA y AcMICA inespecíficos en el periodo postrasplante sin que conozcamos él o los estímulos que dieron lugar a su desarrollo.

Si bien, el estudio que dio paso al desarrollo del presente, mostró que la aplicación de la vacuna vs VHB y PPD pueden originarlos, será interesante determinar si otras vacunas producen el mismo efecto en distintos grupos de población, especialmente los pacientes con insuficiencia renal (población potencialmente trasplantable) y los pacientes trasplantados con un injerto funcional, ya que están sujetos a la aplicación de vacunas de manera periódica.

Adicionalmente, el determinar la prevalencia de anticuerpos “naturales” anti-HLA y anti-MICA en población sana sin historia de aloinmunización, vendría a fortalecer la información generada con el estudio clínico de las vacunas, cualquiera que fuere el resultado, dado que tendríamos de donde partir para interpretar los resultados de este y futuros estudios.

Por lo anterior, las preguntas que se planteó contestar con este estudio fueron:

¿La aplicación de vacuna contra influenza es capaz de inducir el desarrollo de AchLA y AcMICA?

¿Existen AchLA y AcMICA naturales en la población general sin historia de aloinmunización y cuál es su prevalencia?

III JUSTIFICACIÓN.

A la luz de los estudios conocidos hasta el momento, queda claro que la presencia de AchLA y AcMICA desde la etapa pretrasplante, así como su generación *de novo*, están asociados a un peor pronóstico del injerto renal, debido a su asociación con un mayor riesgo de rechazo agudo, rechazo crónico y menor sobrevida del injerto. Esta asociación es más importante si los anticuerpos están dirigidos contra especificidades antigénicas presentes en el injerto.

Los resultados obtenidos en nuestro Instituto, muestran que otros estímulos antigénicos (en este caso la vacuna vs VHB y el PPD) son capaces de inducir la generación de AchLA en población sana. Sin embargo, no sabemos si esto será reproducible con otras vacunas.

También se desconoce si lo anterior es aplicable a la población de pacientes con insuficiencia renal o con trasplante renal y si dichos estímulos serán capaces de producir anticuerpos dirigidos contra especificidades antigénicas presentes en el injerto.

En caso de demostrarse que es posible la generación de AchLA y AcMICA, se deberán tomar medidas encaminadas a definir la conducta que se deberá de seguir respecto a la vacunación de la población trasplantada o potencialmente trasplantable, sobre todo si en los trasplantados se pudieran generar anticuerpos donador específicos que son los de peor pronóstico.

Por otro lado, es de vital importancia conocer si existen AchLA “naturales” en la población general y de ser así, caracterizarlos, ya que esto modificaría la clasificación de riesgo inmunológico que usamos previo al trasplante e incluso, modificaría las estrategias de asignación de órganos que utilizan algunos países, donde incluso se llegan a descartar algunos potenciales receptores de trasplante para recibir un órgano basados en su perfil de anticuerpos.

IV HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo:

1. Los pacientes sometidos a la aplicación de vacuna contra influenza desarrollarán AcHLA y/o AcMICA *de novo* post-vacunación en 30% o más de los casos.
2. La prevalencia de AcHLA en sujetos sin historia de alosensibilización será menor o igual al 10%.

Hipótesis Nula:

1. La aplicación de la vacuna contra influenza a los pacientes producirá AcHLA y/o AcMICA *de novo* post-vacunación en menos del 30% de los casos.
2. La prevalencia de AcHLA en sujetos sin historia de alosensibilización será mayor del 10%.

V OBJETIVOS

Objetivo Primario:

- Conocer si la aplicación de la vacuna contra Influenza puede generar AcHLA y/o AcMICA *de novo* tanto en población sana como en pacientes con insuficiencia renal y pacientes trasplantados.

Objetivos secundarios:

- Conocer el comportamiento de los AcHLA y AcMICA durante un periodo de 6 meses.
- Establecer la prevalencia de anticuerpos anti-HLA en población sin historia de aloinmunización.

VI METODOLOGÍA

El presente trabajo se conforma de 2 partes independientes pero a su vez complementarias.

a) Diseño. Parte 1) Es un estudio clínico de asociación causal, prospectivo, abierto, no aleatorizado con grupo control sin intervención. **Parte 2)** Adicionalmente se realizó un estudio de prevalencia que es transversal, observacional y descriptivo.

b) Población de este estudio. Parte 1) Sujetos a quienes se les aplicó la vacuna contra influenza dentro del Instituto y un grupo de voluntarios sanos sin historia de aloinmunización y que rechazaron la aplicación de la vacuna. **Parte 2)** Para el estudio de prevalencia se tomó sujetos del género masculino sanos, donadores de sangre del Instituto.

c) Grupos de estudio (aplica solo a Parte 1): Se formaron 4 grupos de poblaciones diferentes, tres de ellos recibieron la vacuna contra influenza y se formaron de la siguiente manera: 1) Población sana o sin enfermedades relevantes conocidas, 2) Pacientes con insuficiencia renal sin trasplante y 3) Trasplantados renales. 4) Sujetos sanos sin historia de aloinmunización y que no recibieron la vacuna contra influenza (de hecho se les ofreció y la rechazaron).

d) Lugar de realización. Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral en colaboración con el Departamento de Trasplantes, Epidemiología Hospitalaria y el Banco de Sangre. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, D.F. México. Todas las muestras fueron procesadas por el alumno de doctorado en: Terasaki Foundation Laboratory: 11570 W. Olympic Blvd. Los Ángeles, CA. USA. 90064.

e) Período de tiempo. Marzo del 2007 a febrero del 2009.

f) Tiempo de seguimiento de cada paciente (solo aplica a Parte 1). Para fines de observar el efecto de la vacuna fue suficiente el seguimiento durante 1 mes y para ver el comportamiento de los anticuerpos se siguieron durante 6 meses.

g) Criterios de inclusión:

Para los grupos que recibieron la vacuna contra influenza (Parte 1):

- Mayores de 18 años.
- Pacientes que tienen expediente clínico en el Instituto o sujetos sanos que laboran dentro del mismo.
- Que su lugar de residencia sea dentro del área urbana de esta ciudad.
- Aquellos que aceptaron su inclusión en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

Para el grupo control sin vacuna (Parte 1):

- Mayores de 18 años.
- Sujetos sanos que laboran dentro del mismo.
- Sin historia de eventos de aloinmunización.
- Que hayan rechazado la aplicación de la vacuna por decisión propia.
- Que su lugar de residencia sea dentro del área urbana de esta ciudad.
- Que acepten su inclusión en el estudio y firmen el consentimiento informado.

Para establecer la prevalencia (Parte 2):

- Mayores de 18 años.
- Sujetos sanos, donadores de sangre del Instituto.
- Masculinos.
- Sin historia de trasplantes de órganos y/o tejidos.
- Sin historia de transfusiones o cirugías mayores.
- Que acepten su inclusión en el estudio y firmen el consentimiento informado.

h) Criterios de exclusión.

- Quienes hayan recibido otra vacuna dentro de los 6 meses previos a la vacuna actual.

Solo parte 1:

- Aquellas personas que recibieron más de una vacuna simultáneamente.
- Aquellos en quienes fuera predecible una falta de cumplimiento a las citas para las evaluaciones y toma de muestras.

i) Criterios de eliminación.

- Para los pacientes de la parte 1, quienes no completen las primeras 3 visitas (1 mes de seguimiento).
- Para el estudio de prevalencia se eliminaron los casos donde el escrutinio infeccioso mostrara la presencia de una infección subclínica.

j) Tamaño de la muestra.

Dado que el objetivo principal es ver el efecto de la vacuna sobre el desarrollo de AcHLA, se utilizó una fórmula para proporciones pareadas o para un estudio antes-después. En el estudio piloto que hicimos previamente en sujetos sanos, observamos que después de la vacuna, el 45% desarrolló AcHLA *de novo*. Para fines de este estudio y dado que incluiremos población inmunocomprometida, nuestra hipótesis es que por lo menos el 30% de los sujetos desarrollará AcHLA *de novo*. Con un intervalo de confianza del 95% y un poder del 80% nos da un tamaño de muestra mínimo de 24 pares (en este caso 24 pacientes antes y después de la vacuna). Cabe señalar que se calculó este número para cada uno de los grupos a estudiar.

k) Variables.

Variable dependiente: AcHLA y AcMICA (pre-vacunación y en cada determinación), tipos y título de AcHLA y AcMICA presentes, AcHLA y AcMICA *de novo*, capacidad de linfocitotoxicidad de los AcHLA.

Variables independientes: Edad, género, historia de transfusiones, número de transfusiones, tiempo desde la última transfusión, historia de embarazos, número de embarazos, número de abortos, tiempo desde el último embarazo, historia de cirugías, número y tipo de cirugías, historia de vacunación (contra hepatitis A y B, influenza, neumococo, tétanos, sarampión/rubéola), tiempo de la última vacuna (para cada una), número y motivo de hospitalizaciones desde los 6 meses previos a su ingreso al estudio y durante todo el estudio, número y tipo de infecciones de los 6 meses previos hasta el final de estudio, embarazos durante el estudio, cirugías durante el estudio, tipo de medicamentos que toma desde los 6 meses previos y hasta el final del estudio, muerte.

VARIABLES ADICIONALES PARA LOS PACIENTES CON IRCT: tiempo en terapia sustitutiva, tipo de diálisis, cambio de modalidad de TS durante el estudio, enfermedad renal original, comorbilidad, uso de esteroides y otros inmunosupresores previo al estudio.

VARIABLES ADICIONALES PARA LOS PACIENTES TRASPLANTADOS: tiempo desde el trasplante, tipo de donador, número de trasplante, creatinina sérica, tasa de filtrado glomerular estimada a su ingreso al estudio, eventos de rechazos agudo previos y durante el estudio.

I) Definición de variables.

| <i>VARIABLE</i> | <i>DEFINICIÓN</i> | <i>TIPO DE VARIABLE</i> | <i>UNIDAD DE MEDICIÓN</i> |
|-----------------|--|-------------------------|---|
| AcHLA | Positividad para presencia de AcHLA obtenida mediante "Single Antigen" para clase I y/o clase II. | Nominal | Dicotómica: Positivo o Negativo |
| AcMICA | Positividad para presencia de AcMICA obtenida mediante "Single Antigen" para MICA. | Nominal | Dicotómica: Positivo o Negativo |
| Tipo de AcHLA | Especificidad HLA contra la cual está dirigido el AcHLA obtenida mediante el análisis de "Single Antigen" para clase I y clase II. | Nominal | Nombre de las especificidades antigénicas del AcHLA |

| | | | |
|--|--|--------------------------|--|
| Tipo de AcMICA | Especificidad MICA contra la cual está dirigido el AcMICA obtenida mediante el análisis de "Labscreen-Single Antigen" para MICA. | Nominal | Nombre de las especificidades antigénicas del AcMICA |
| AcHLA <i>de novo</i> | Aparición de AcHLA no existentes antes de la vacuna, corroborados por prueba de "single antigen". | Nominal | Dicotómica: Sí o No |
| Capacidad de linfocitotoxicidad de los AcHLA | Capacidad de lisis celular de los AcHLA determinada mediante prueba de linfocitotoxicidad. | Nominal | Dicotómica: Sí o No |
| Edad | Tiempo transcurrido desde su nacimiento hasta el momento de inclusión al estudio. | Cuantitativa continua | Años |
| Genero | Condición orgánica que distingue al hombre de la mujer. | Nominal | Masculino Femenino |
| Historia de transfusiones | Antecedente de haber recibido una transfusión de hemoderivados. | Nominal | Dicotómica: Sí o No |
| Número de transfusiones | Número de transfusiones de hemoderivados. | Cuantitativa continua | Número de unidades |
| Tiempo desde la | Tiempo en meses desde la última | Cuantitativa | Meses |

| | | | |
|---------------------------------|---|--------------------------|------------------------|
| última transfusión | transfusión de hemoderivados | continua | |
| Historia de embarazos | Antecedente de embarazos | Nominal | Dicotómica: Sí o No |
| Número de embarazos | Número de embarazos, independientemente de su desenlace | Cuantitativa continua | Número de embarazos |
| Número de abortos | Número de abortos | Cuantitativa continua | Número de abortos |
| Tiempo desde el último embarazo | Tiempo en meses entre el desenlace del último embarazo y su ingreso al estudio. | Cuantitativa continua | Meses |
| Historia de cirugías | Antecedente de cirugía mayor. | Nominal | Dicotómica: Sí o No |
| Número de cirugías | Número de cirugías mayores a las que ha sido sometido. | Cuantitativa continua | Número de cirugías |
| Tipo de cirugía | Nombre de la cirugía a la que fue sometido. | Nominal | Nombre de la cirugía |
| Historia de | Referencia de haber recibido alguna de las siguientes vacunas: a | Nominal | Nombre de cada |

| | | | |
|------------------------------|--|-----------------------|--|
| vacunación | hepatitis A y B, influenza, neumococo, tétanos, sarampión/rubéola y otras. | | una de las vacunas |
| Tiempo de la última vacuna | Tiempo desde la última dosis de cada vacuna. | Nominal | Meses |
| Número de hospitalizaciones | Número de hospitalizaciones desde los 6 meses previos a su ingreso al estudio y durante todo el estudio | Cuantitativa continua | Número de hospitalizaciones |
| Motivo de hospitalizaciones | Motivo principal o más importante que motivó la hospitalización, desde los 6 meses previos a su ingreso al estudio y durante todo el estudio | Nominal | Motivo principal de la hospitalización |
| Número de infecciones | Número de infecciones desde los 6 meses previos hasta el final de estudio | Cuantitativa continua | Número de episodios de infecciones |
| Tipo de infecciones | Diagnóstico final del proceso infeccioso. | Nominal | Nombre del diagnóstico |
| Tipo de medicamentos que usa | Nombre de los medicamentos que usó desde los 6 meses previos y hasta el final del estudio | Nominal | Nombre de los medicamentos |

| | | | |
|--|--|--------------------------|---|
| Muerte | Caso de muerte corroborada. | Nominal | Dicotómica: Sí o No |
| Tiempo en terapia sustitutiva | Número de meses en terapia sustitutiva al momento de su ingreso al estudio. | Cuantitativa continua | Número de meses |
| Tipo de diálisis | Tipo de diálisis que recibe al momento de su ingreso al estudio: diálisis peritoneal o hemodiálisis. | Nominal | Diálisis peritoneal o Hemodiálisis |
| Cambio de modalidad de Terapia sustitutiva | El paso entre diálisis peritoneal a hemodiálisis o trasplante renal. | Nominal | Dicotómica: Sí o No |
| Enfermedad renal original | Nombre de la enfermedad que lo llevó a IRCT. | Nominal | DM, HTA, ERPAD, Glomerulonefritis, gota, otras. |
| Comorbilidad | Enfermedades ya conocidas y reportadas en el expediente. | Nominal | Nombre de la(s) enfermedad(es) |
| Uso de esteroides previo | Historia de uso de esteroides de manera crónica previo al ingreso. | Nominal | Dicotómica: Sí o No |

| | | | |
|--------------------------------------|--|--------------------------|---------------------------|
| Uso de inmunosupresores previo | Historia de uso de inmunosupresores diferentes a esteroides de manera crónica previo al ingreso. | Nominal | Dicotómica: Sí o No |
| Tiempo desde el trasplante | Tiempo desde el día del trasplante hasta el ingreso al estudio | Cuantitativa continua | Meses |
| Tipo de donador | Indica si el donador fue vivo o cadavérico. | Nominal | Donador Vivo o cadavérico |
| Número de trasplante | Se refiere al número de órganos que ha recibido. | Cuantitativa continua | Número |
| Creatinina sérica | Nivel sérico de creatinina | Cuantitativa continua | mg/dl. |
| Tasa de filtrado glomerular estimada | Tasa de filtrado glomerular estimada por fórmula del MDRD. | Cuantitativa continua | mL/min. |
| Rechazo agudo | Si ha tenido eventos de rechazo agudo corroborados por biopsia antes o durante el estudio. | Nominal | Dicotómica: Sí o No |
| Número de rechazos agudos | Cantidad total de rechazos agudos | Cuantitativa continua | Número de rechazos agudos |

m) Procedimientos.

Reclutamiento de pacientes. Parte 1: En el Instituto se cuenta con una unidad de vacunación para adultos, a donde acuden todos los pacientes o personal del Instituto para recibir las vacunas correspondientes. Adicionalmente, un equipo del departamento de Epidemiología Hospitalaria hace campañas de vacunación entre los trabajadores del instituto, pasando por todas las áreas de trabajo del hospital a vacunarlos, sobre todo para Influenza. Los pacientes que corresponden a los 3 grupos que recibieron la vacuna contra influenza fueron reclutados por un miembro del equipo, que permanecía gran parte del tiempo en la unidad de vacunación y otro miembro que acompañaba al personal de Epidemiología a los diferentes Departamentos del Instituto. Los voluntarios que rechazaron la aplicación de la vacuna corresponden principalmente a personal de los Departamentos de Nefrología y Trasplantes, de los cuales se tenía conocimiento que no deseaban vacunarse y se complementó con otros voluntarios de otros departamentos detectados por el personal de epidemiología durante la campaña de vacunación.

Parte 2: Para cubrir el objetivo de establecer la prevalencia de anticuerpos anti-HLA en población general, se reclutaron sujetos sanos, aceptados como donadores de sangre, sin historia de factores alosensibilizantes y del género masculino (para eliminar toda posibilidad de alosensibilización por un “microaborto” que hubiera pasado desapercibido).

Invitación al estudio y firma del consentimiento informado. Fase 1: Antes de su vacunación se les explicaba el estudio y de aceptar, se les tomaba las muestras basales en ese momento, previa firma del consentimiento. **Fase 2:** En el caso de los donadores de sangre, se les invitaba en ese momento y de aceptar, se solicitaba firmar el consentimiento informado y la muestra era tomada inmediatamente después de la línea de la sangría (muestra única).

Maniobra (estímulo antigénico), solo Parte 1. Como estímulo antigénico se utilizó la aplicación de la vacuna contra influenza, indicada por los médicos tratantes o por la campaña de vacunación contra Influenza que hace el Instituto para cada temporada de invierno.

Seguimiento de los pacientes. Las visitas de seguimiento se llevaron a cabo en el departamento de trasplantes donde el investigador principal u otro miembro del equipo, además de recolectar las muestras, interrogaban a los sujetos para obtener información de las variables a medir durante el seguimiento incluyendo la exposición a factores alosensibilizantes, cambio de tratamiento e infecciones. En caso de faltar a sus citas, cualquier persona del equipo participante se encargaba de localizar a los participantes y reprogramar su cita.

Determinación de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA. En caso de varias muestras del mismo paciente como la Parte 1 del estudio, todas las muestras correspondientes a cada paciente fueron analizadas en un mismo momento (misma placa para minimizar la posibilidad de variabilidad dependiente del método) siguiendo las instrucciones del fabricante, primero con LABScreen® Mixed (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, USA), que se utiliza como escrutinio para la detección simultánea de AchLA Clase I, Clase II y MICA. Las muestras que resultaron positivas se evaluaron después con LABScreen® Single Antigen (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, USA), para determinar las especificidades vs antígenos Clase I, Clase II y MICA. Posteriormente y ante la posibilidad de falsos negativos se decidió analizar todas las muestras con LABScreen® Single Antigen, donde cada microesfera de látex está recubierta con un antígeno HLA determinado. Esta prueba que es más sensible y específica determinó cuales muestras eran positivas. De manera breve, 20 µL del suero del sujeto a examinar se agregó a 5 µL de las microesferas de Labscreen Mixed o Single Antigen® cubiertas con antígenos HLA clase I (LS1A01, A02 y A03 lote 8), clase II (LS2A01 lote 4) o MICA

(MICA beads lote 2), se incubaron en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente y después lavadas 3 veces con solución búfer. Después se agregó 100 µL del anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina (anticuerpo secundario) y se incubó por 30 minutos sin exposición a la luz y a temperatura ambiente. Después del enjuague final (2 lavados con solución búfer), las muestras fueron leídas con el equipo de Luminex LABScan®100 flow analyzer (LUMINEX xMAP®, Luminex Corporation, Austin, Texas, USA). Cada grupo de microesferas incluye microesferas sin recubrimiento que funcionan como control negativo. Las placas para lectura en el equipo Luminex pueden incluir hasta 94 sueros, además de un suero control negativo y otro control positivo.

Cuando se observó un valor muy alto del control negativo, las muestras fueron pretratadas con ADSORB OUT® (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, USA), ensayo basado en la utilización de micropartículas tratadas con una solución bloqueadora para eliminar cualquier material inespecífico (no anticuerpos) contenido en el suero y que se puede unir a las microesferas de látex utilizadas por este método, en caso de estar presente, minimizando la posibilidad de error.

Interpretación de resultados. Los valores de luminiscencia generados a partir del equipo lector de Luminex (LABScan®100) se analizaron utilizando el software HLA Visual® versión 2.2.0 (One Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA). Los valores de luminiscencia que corresponden a la media truncada para “single antigen” fueron obtenidos desde archivos generados por el analizador de flujo (archivos *.csv) y se ajustaron para los controles negativos usando la formula: [(Luminiscencia de la microesfera # de la muestra X – Luminiscencia de la microesfera sin recubrimiento de la muestra X) – (Luminiscencia de la microesfera # del suero control negativo – Luminiscencia de la microesfera sin recubrimiento del suero control negativo)].

Se consideraron positivas para la presencia de un anticuerpo específico solo aquellas muestras con luminiscencia mayor de 500 para dicha especificidad, después de su normalización con los controles negativos. Se consideró que se trataba de un anticuerpo *de novo* cuando la luminiscencia normalizada de la muestra basal fuera menor de 250 y el incremento fuera mayor o igual a 3 veces su valor basal. Las muestras que sugerían anticuerpos *de novo* fueron analizadas de manera repetida en 3 ocasiones diferentes, promediando sus valores. Solo aquellas en que los valores fueron consistentes se tomaron como positivas.

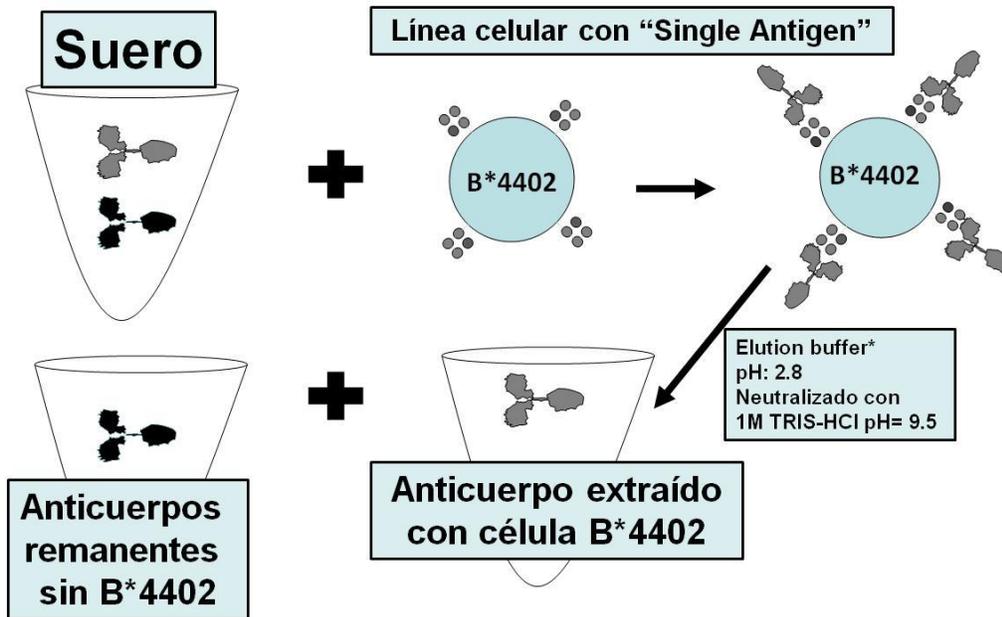
Ensayo de absorción de anticuerpos. Para confirmar la existencia y especificidad de los anticuerpos y dado que presentaron niveles tan bajos para ser detectados con Citometría de Flujo, se utilizó este ensayo que consiste en utilizar líneas celulares modificadas mediante ingeniería genética y que expresan en su superficie un solo antígeno HLA recombinante, que correspondía a las especificidades de los AChLA *de novo*. En caso de no contar con líneas celulares de una especificidad, se utilizaron microesferas con esas especificidades antigénicas (One Lambda Inc). El objetivo es eliminar mediante esas células o microesferas, una buena parte de los anticuerpos del suero, lo que confirmaría su existencia y especificidad. Brevemente, 40 μ L de suero (diluido 1:3) fue mezclado con 3 a 5 x 10⁶ células (o 0.5 x 10⁶ microesferas) e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó para tomar el suero sobrenadante y analizarlo al mismo tiempo que el suero del mismo paciente sin tratamiento. Una reducción de por lo menos el 40% de los anticuerpos, da por hecho la existencia y especificidad del anticuerpo (Figura I.8).

Tipificación de los antígenos HLA. Para la parte 1 del estudio: los casos con anticuerpos *de novo* positivos, fueron tipificados para identificar sus antígenos HLA con el fin de descartar que se trataran de autoanticuerpos. De igual manera, en la parte 2 del estudio, a todos los sujetos se les

tomo una muestra de sangre en papel filtro que se guardó para la extracción del DNA; los casos que resultaron positivos para anticuerpos anti-HLA o anti-MICA, se ordenaron con un número progresivo y mediante un sistema computarizado se hizo una selección aleatoria de una muestra de 30 sujetos (muestra por conveniencia, dado los altos costos que esto representa), para tipificar sus antígenos HLA y descartar que se trataran también de autoanticuerpos.

La tipificación se realizó mediante la extracción de DNA (a partir de leucocitos de sangre periférica o papel filtro como se mencionó antes), utilizando la técnica LABType SSO® (One Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Figura VI.1.- Ensayo de absorción de anticuerpos.



Citotoxicidad. Para probar si los anticuerpos detectados tenían capacidad citotóxica, se realizó la prueba de linfocitotoxicidad, donde se utilizaron células con asignación antigénica HLA conocidas. El resultado se expresa con los siguientes valores: 1= 0 a 10% de células lisadas (negativo), 2=Lisis celular del 11 a 20%, 4= lisis celular del 21 a 50%, 6= lisis celular del 51 a 80% y 8=lisis celular del 81 a 100%. A partir de una calificación de 2 se consideró positivo para citotoxicidad (ver Figura I.6).

VII ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva de acuerdo al nivel de medición de las variables, apoyados en medidas de proporción, de tendencia central y de dispersión. Las variables continuas fueron evaluadas con la prueba *Z de Kolmogorov-Smirnov* para determinar el tipo de distribución. Aquellas con distribución normal se reportaron como medias y desviación estándar, mientras que las variables con distribución anormal y las de tiempo, se expresan en mediana con valores límites mínimo y máximo. Para comparación intragrupo de proporciones antes y después utilizamos χ^2 de *McNemar*. En caso de comparar proporciones entre 2 grupos usamos χ^2 de *Pearson* con corrección de Yates o *Prueba exacta de Fisher* en caso de valores esperados menores a 5. Para comparación de las variables continuas entre 2 grupos aplicamos *T de Student*, mientras que para comparar 3 o más grupos, utilizamos *ANOVA de 1 vía* en caso de variables continuas de distribución normal. Para correlación se utilizó la prueba de *Pearson* o la de *Spearman* según la distribución de las variables. Realizamos análisis multivariado con *regresión logística* buscando factores asociados a la formación de anticuerpos *de novo*. Se tomó como significativa una $p < 0.05$.

VIII RESULTADOS

PARTE 1: EFECTO DE LA VACUNACIÓN CONTRA INFLUENZA SOBRE LA FORMACIÓN DE ANTICUERPOS

Características generales de la población de estudio. De los 107 pacientes que recibieron la vacuna contra influenza, el 100% completó las 3 primeras muestras (1 mes de seguimiento) que era mandatorio para su permanencia en el estudio. Para los meses 2, 3, 4, 5 y 6, se alcanzó un cumplimiento del 93%, 92%, 89%, 85% y 79% respectivamente. Mientras que para los 22 controles sanos no aoinmunizados, el 100% completó los 2 primeros meses y para los meses subsecuentes tuvimos un cumplimiento del 91%.

En la tabla 1 se muestran las características demográficas, así como los principales factores de riesgo para alosensibilización, para los 4 grupos. Cabe señalar que reportamos el antecedente de cirugía mayor ante la probabilidad de que los pacientes hayan sido transfundidos durante la misma sin haber sido informados o que no recuerden ese hecho.

En esa misma tabla podemos observar que los pacientes del grupo B y C son de mayor edad que el resto de sujetos y en todos los grupos hay un predominio del género femenino, siendo más importante en el grupo A, lo que va de la mano con una mayor frecuencia de embarazos y abortos para los grupos señalados, mientras que las transfusiones fueron más comunes en aquellos pacientes ya trasplantados o con insuficiencia renal terminal como era de esperarse. Cabe recordar que los sujetos del grupo control sin vacuna fueron seleccionados de manera que no hubiera el antecedente de aoinmunización lo cual se refleja claramente en la tabla.

Tabla VIII.1.- Características demográficas e historia de exposición a factores alosensibilizantes para los 4 grupos.

| | Grupo A | Grupo B | Grupo C | Grupo D |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | Sanos | IRC | TR | Controles |
| | n=42 (%) | n=40 (%) | n=25 (%) | n=22 (%) |
| Edad años (Media ± DE)* | 35.8 ± 10.5 | 47.0 ± 12.7 | 38.6 ± 10.8 | 24.3 ± 2.3 |
| Género Femenino ** | 36 (85.7) | 31 (77.5) | 17 (68.0) | 12 (54.5) |
| Embarazos Previos * | 21 (50.0) | 17 (42.5) | 8 (32.0) | 0 |
| Abortos Previos | 9 (21.4) | 4 (10.0) | 4 (16.0) | 0 |
| Transfusiones * | 1 (2.4) | 12 (30.0) | 20 (80.0) | 0 |
| Antecedente de Cirugías * | 22 (52.4) | 29 (72.5) | 25 (100) | 0 |

IRC= Insuficiencia Renal Crónica, TR=Trasplante Renal, DE=Desviación Estándar.

*p<0.001 ** p<0.05

Desarrollo de anticuerpos *de novo*. En la tabla 2 se muestra el número y porcentaje de pacientes que desarrollaron AchLA o AcMICA *de novo* para los 4 grupos, separados para el tipo de anticuerpo. Es evidente que los pacientes trasplantados y con IRC fueron los más reactivos, desarrollando anticuerpos de algún tipo el 20% y 17.5% respectivamente, mientras que solo el 2.4% (1 caso) de los sanos vacunados desarrollaron AchLA clase II y ninguno de los sujetos control.

Ensayo de absorción de anticuerpos. En los casos en los que se realizó la absorción de anticuerpos (realizado para los AchLA), se observó una disminución de los niveles de anticuerpos respecto del suero normal, lo cual apoya que si se trataba de AchLA dirigidos contra esas especificidades.

Búsqueda de autoanticuerpos. A los casos que formaron AcHLA *de novo* se les tipificó los antígenos HLA, descartando la presencia de autoanticuerpos. Dado que el método comercial para tipificar MICA estaba en periodo de prueba aún, no nos fue posible tipificarlos, por lo que no se pudo esclarecer este punto para los AcMICA. Cabe señalar a nuestro favor que los métodos de detección de ambos anticuerpos son específicos para anticuerpos IgG, mientras que los autoanticuerpos suelen ser de tipo IgM.

Tabla VIII.2.- Número y proporción de pacientes que desarrollaron anticuerpos *de novo* en cada grupo, por tipo de anticuerpo.

| Especificidad de los | Grupo A | Grupo B | Grupo C | Grupo D |
|----------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------|
| Anticuerpos <i>De Novo</i> | Sanos | IRC | TR | Controles |
| | n=42 (%) | n=40 (%) | n=25 (%) | n=22 (%) |
| AcHLA clase I | 0 | 3 (7.5 %) | 2 (8.0 %) | 0 |
| AcHLA clase II | 1 (2.4 %) | 0 | 1 (4.0 %) | 0 |
| AcHLA I & II | 0 | 0 | 1 (4.0 %) | 0 |
| AcMICA | 0 | 4 (10.0 %) | 1 (4.0 %) | 0 |
| Total De Novo* | 1 (2.4 %) | 7 (17.5 %) | 5 (20.0 %) | 0 |

IRC= Insuficiencia Renal Crónica, TR=Trasplante Renal. *p=0.016

Anticuerpos preformados. Como se muestra en la tabla 3, encontramos anticuerpos preformados (es decir, desde la primera muestra y antes de aplicarles la vacuna) en la mayoría de pacientes trasplantados o con IRC. Sin embargo, de manera inesperada, más del 60% de los pacientes sanos vacunados también tenían anticuerpos preformados (no en todos los casos explicables por

aloimmunización previa). Pero más sorprendente aún fue el encontrar anticuerpos preformados en el 27% de los controles sanos sin historia de exposición a aloantígenos. Llama la atención que en los 3 grupos que tenían historia de aloimmunización predominara la presencia de AcHLA mientras que en los controles sin historia de sensibilización predominó la presencia de AcMICA. Las especificidades antigénicas de los anticuerpos preformados son muy variadas, prácticamente se cubrieron todas ellas en algún caso y algo a resaltar es que en más de la mitad de los casos, los niveles de fluorescencia rebasan las 1000 unidades y entre un 20 a 40% de los casos alcanzan niveles mayores a 5000, sobre todo en los controles sanos no sensibilizados.

Tabla VIII.3.- Número y proporción de pacientes que con anticuerpos preformados en cada grupo, por tipo de anticuerpo. Los pacientes podían tener más de un tipo de anticuerpo simultáneamente.

| Tipos de Anticuerpos | Grupo A | Grupo B | Grupo C | Grupo D |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | Sanos | IRC | TR | Controles |
| | n=42 (%) | n=40 (%) | n=25 (%) | n=22 (%) |
| Preformado HLA I * | 21 (50.0 %) | 24 (60.0 %) | 17 (68.0 %) | 2 (9.1 %) |
| Preformado HLA II * | 8 (19.1 %) | 9 (22.5 %) | 16 (64.0 %) | 1 (4.5 %) |
| Preformado MICA | 17 (40.5 %) | 11 (27.5 %) | 6 (24.0 %) | 5 (22.7 %) |
| Total Preformado | 28 (66.7 %) | 31 (77.5 %) | 22 (88.0 %) | 6 (27.3 %) |

IRC= Insuficiencia Renal Crónica, TR=Trasplante Renal. *p<0.001

Comportamiento de los AcHLA y AcMICA *de novo*. En las figuras 1 a 3, mostramos para cada caso considerado positivo las especificidades antigénicas contra las que estaban dirigidos los anticuerpos, así como los niveles de fluorescencia alcanzados para dichos anticuerpos y el comportamiento durante todo su seguimiento. En dicha figuras podemos observar que de los 8 casos que desarrollaron AcHLA, la mitad alcanzaron niveles de fluorescencia por debajo de 1,000 unidades y la otra mitad si bien rebasó ese límite, no pasó de 2,200 unidades de fluorescencia, correspondiendo 3 de 4 casos de este grupo a pacientes trasplantados. Otro hecho relevante es que solo 3 casos (todos ellos trasplantados) desarrollaron los anticuerpos en los 2 primeros meses postvacunación, mientras que el resto los desarrolló después del tercer mes. Finalmente, las especificidades contra las cuales se generaron anticuerpos fueron muy variadas, algunas dirigidas contra antígenos raros en población mexicana y en la mayoría de los casos desarrollaron AcHLA dirigidos contra solo 1 o 2 especificidades.

A diferencia de los casos con desarrollo de AcHLA, aquellos 5 casos que desarrollaron AcMICA, 4 corresponden a pacientes con IRCT y solo 1 caso a trasplantados. En la figura 3 se observa como 4 de los 5 casos desarrollaron los anticuerpos desde los primeros 2 meses postvacunación, es decir más tempranos que los AcHLA y alcanzaron niveles mayores. En la mayoría observamos menos de 3 anticuerpos diferentes. Otra diferencia relevante con los AcHLA es que los AcMICA no muestran descenso relevante de sus niveles de fluorescencia durante su seguimiento.

Figura VIII.1.- Comportamiento de los AchLA *de novo* clase I y clase II posterior a la aplicación de la vacuna en sujetos sanos y pacientes con IRCT.

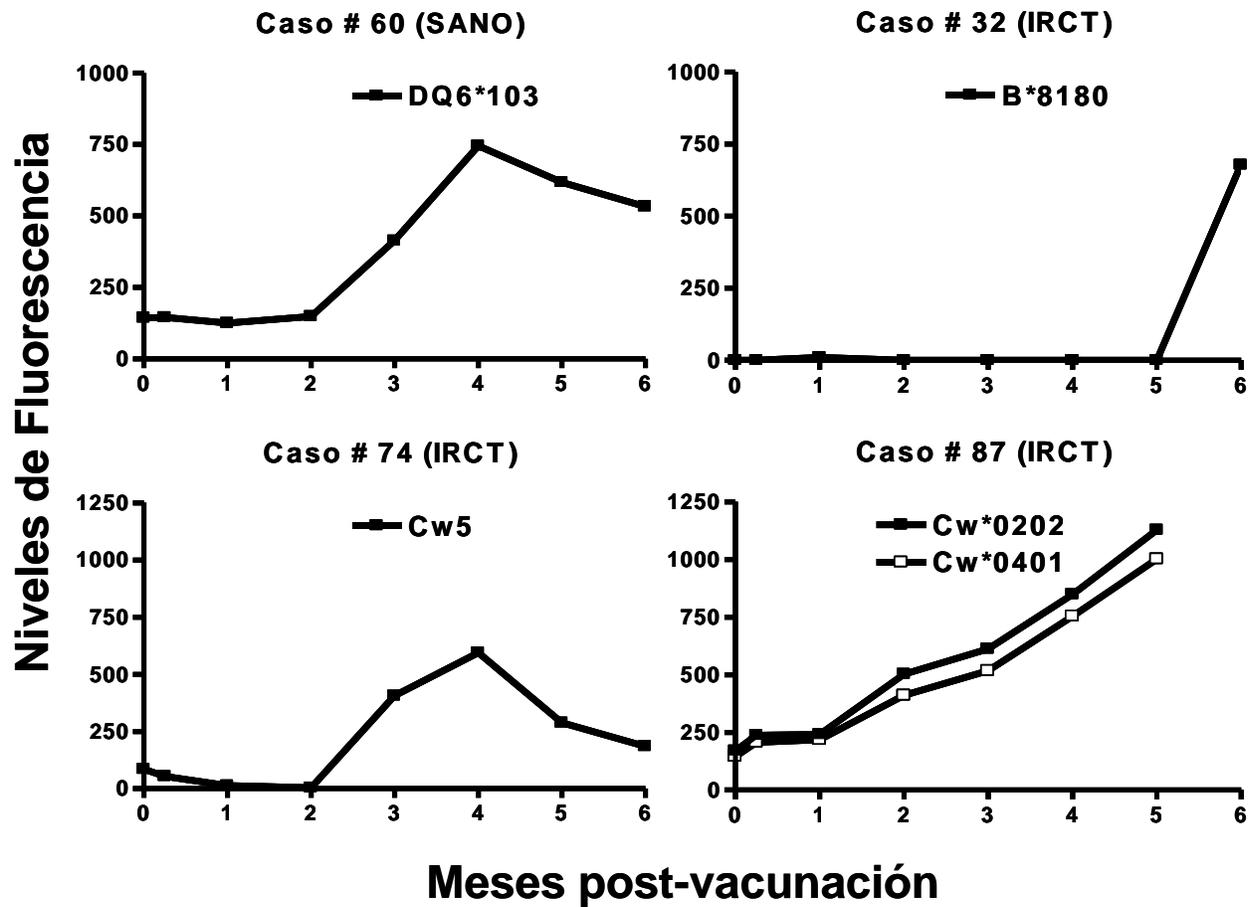


Figura VIII.2.- Comportamiento de los AchLA *de novo* clase I y clase II posterior a la aplicación de la vacuna en pacientes trasplantados.

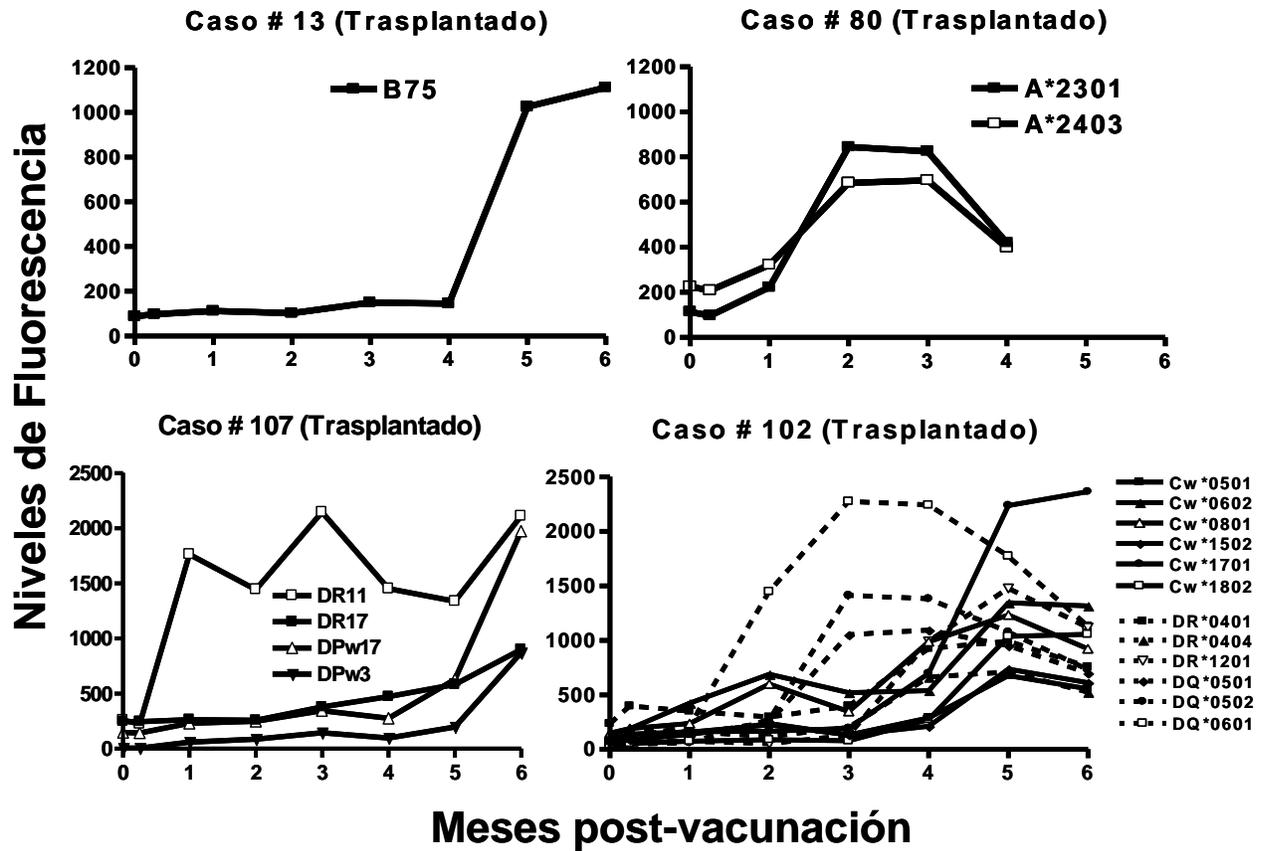
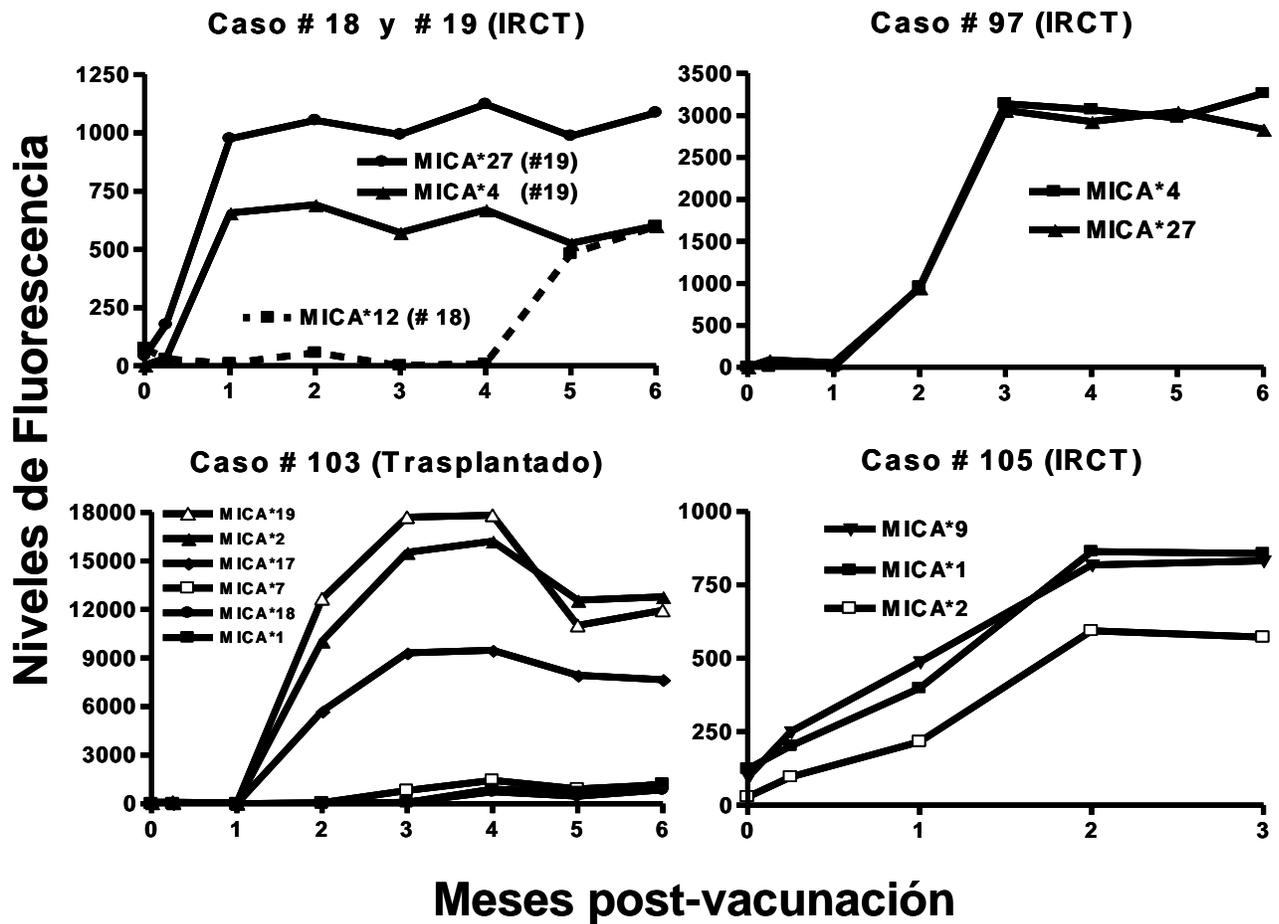
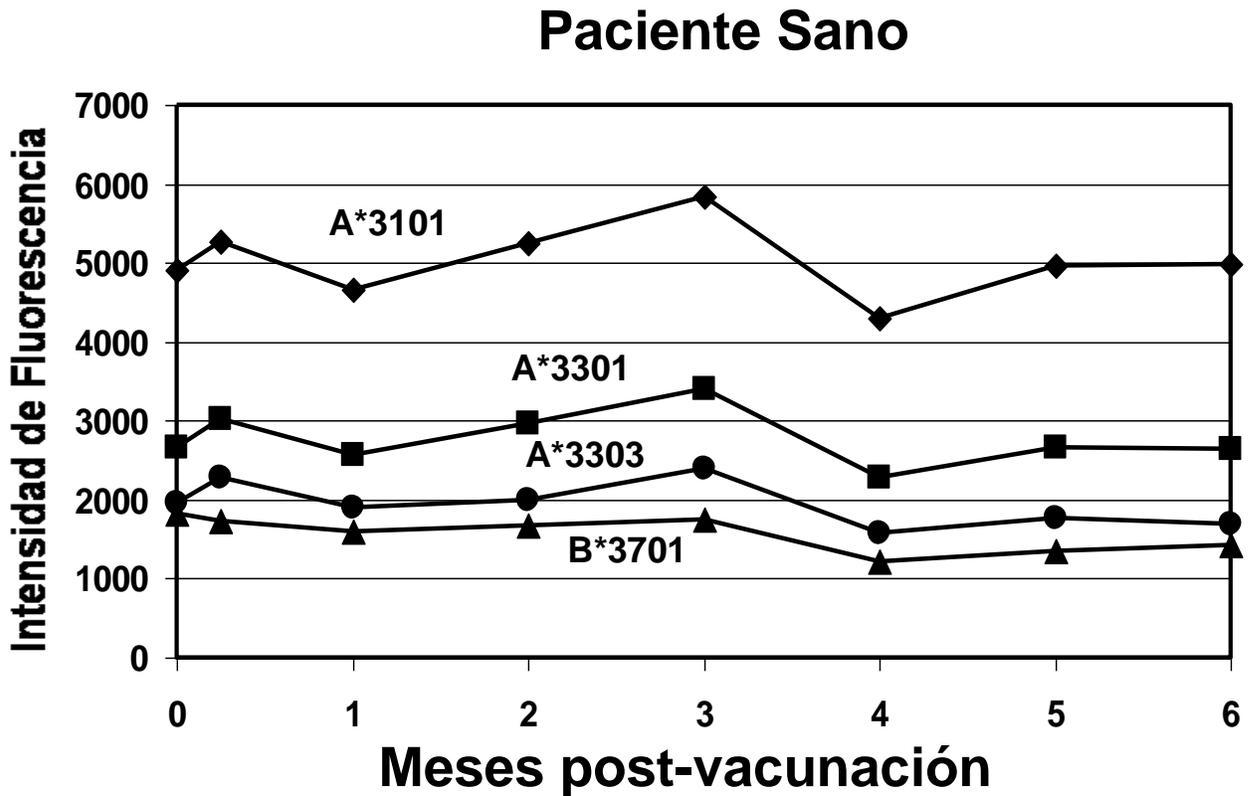


Figura VIII.3.- Comportamiento de los AcMICA *de novo* posterior a la aplicación de la vacuna en pacientes con IRCT y trasplantados. A diferencia del desarrollo de AchLA, los AcMICA aparecen en los primeros 2 meses postvacunación.



Comportamiento de los AcHLA y AcMICA preformados a lo largo de 6 meses. Algo importante a definir en este estudio era lo que pasaría con los anticuerpos detectados de manera basal o preformados, de tal manera que se pueda establecer si los mismos anticuerpos detectados inicialmente pueden persistir a través del tiempo o si son cambiantes debido a estímulos diferentes. Para este efecto, analizamos cada uno de los casos incluidos en el estudio y algo que fue muy claro es que dichos pacientes en general persisten con el mismo perfil de anticuerpos. Hay que recordar que entre especificidades clase I y clase II suman más de 150 especificidades diferentes y eso dificulta el análisis numérico. Sin embargo, agrupando todas las muestras de cada caso, uno puede claramente ver como el patrón de anticuerpos de cada paciente funciona prácticamente como una huella digital, es decir, es muy particular para cada caso e incluso permite diferenciar uno de otro (en casos positivos). La figura 4 muestra un ejemplo de lo antes dicho. Mostramos un caso de un sujeto sano con cuatro especificidades diferentes. En dicha figura se puede observar como a través de esos 6 meses no se agrega ni se elimina ningún anticuerpo y solo hay pequeñas variaciones en los niveles de fluorescencia.

Figura VIII.4.- Comportamiento de los AcHLA durante los 6 meses de seguimiento en un paciente sano.



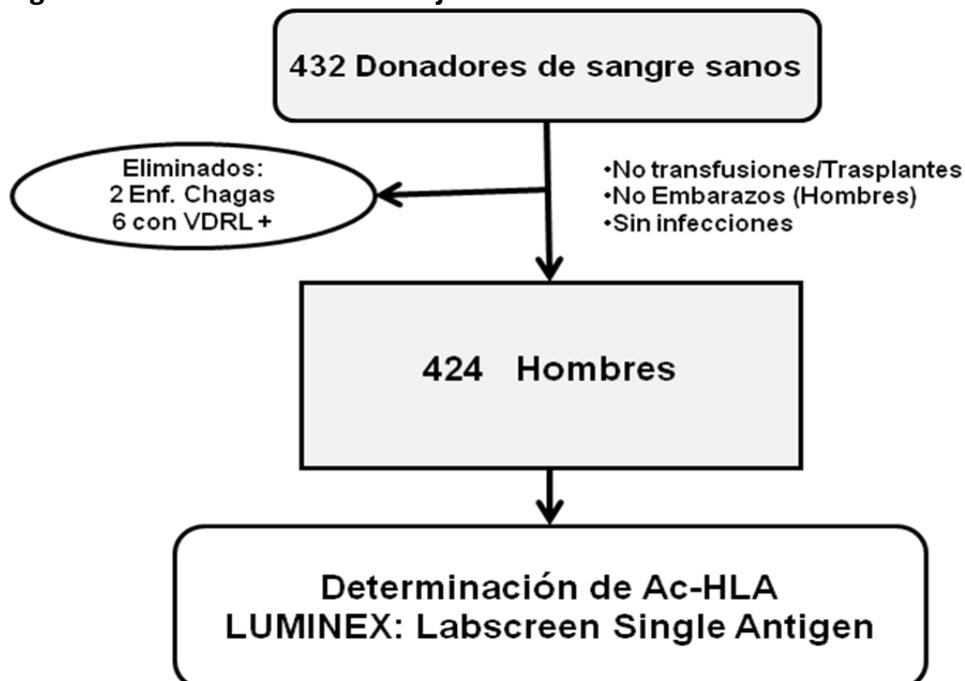
Factores asociados con el desarrollo de anticuerpos. Analizamos detalladamente los posibles factores asociados con el desarrollo de anticuerpos *de novo*, incluyendo los factores sensibilizantes tradicionales, el uso de medicamentos varios, infecciones durante el seguimiento, sin embargo, el único factor de riesgo independiente fue el tener anticuerpos preformados que habla de un sujeto con alta capacidad de aloreactividad.

PARTE 2. PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-HLA EN POBLACIÓN SIN HISTORIA DE ALOINMUNIZACIÓN.

Características generales de la población de estudio. Se recolectaron un total de 432 muestras de sujetos aparentemente sanos, que cumplieron con los criterios de inclusión: mayores de 18 años, género masculino, sin historia de trasplante de órganos o tejidos, sin antecedente de transfusiones, cirugía mayor o inmunizaciones en los 6 meses previos. De manera importante, se seleccionaron solo aquellos sin evidencia de infección activa y que no tomaran ningún medicamento.

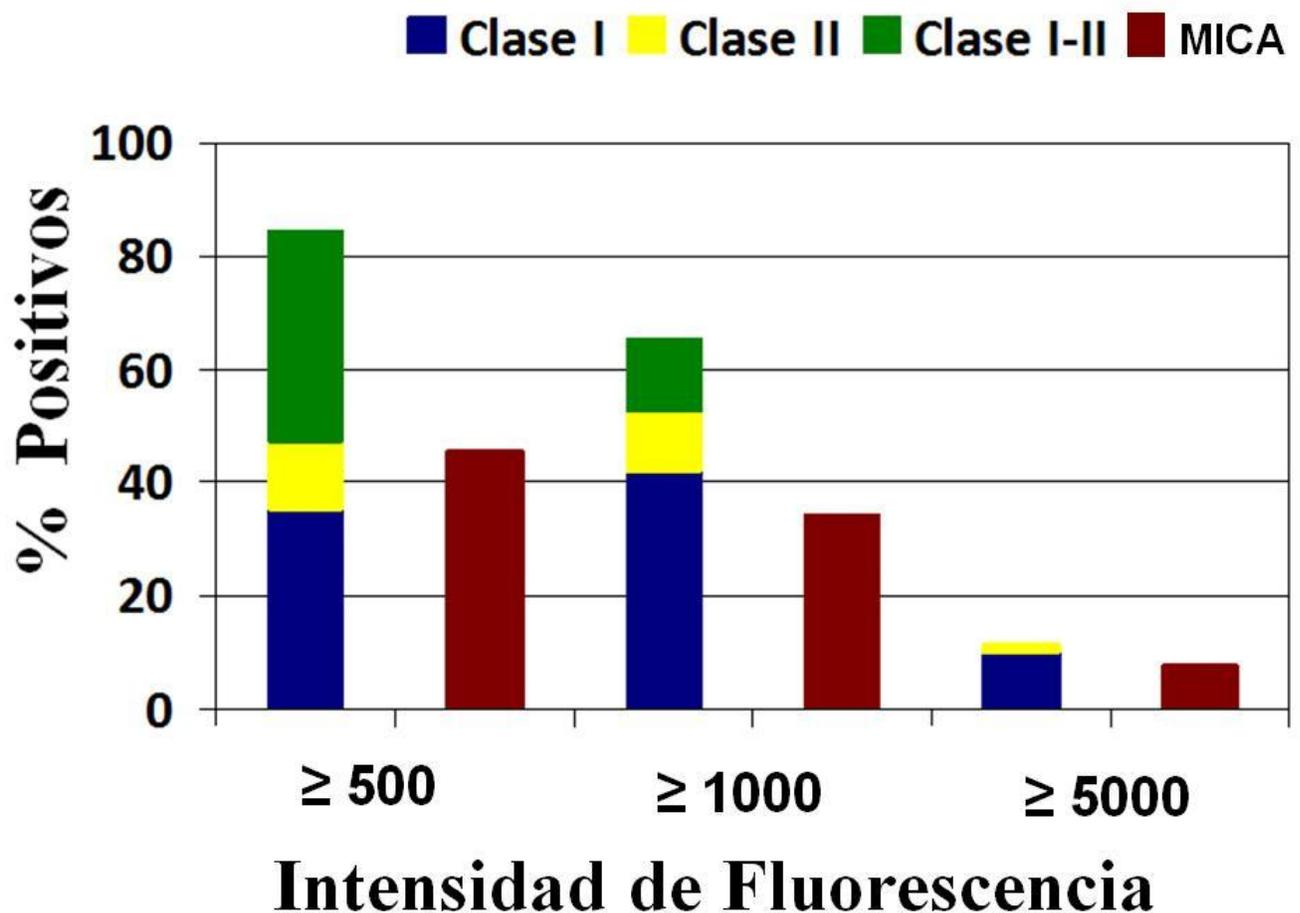
Cabe señalar que se excluyeron 8 sujetos, debido a que en los estudios microbiológicos de su sangre se encontraron 6 con VDRL positivo y 2 con ELISA positivo para enfermedad de Chagas. De tal manera que se estudiaron un total de 424 sujetos masculinos con edad promedio de 32 ± 8 años, el 100% sin historia de exposición a factores alosensibilizantes (Figura VIII.5).

Figura VIII.5.- Selección de los sujetos donadores sanos.



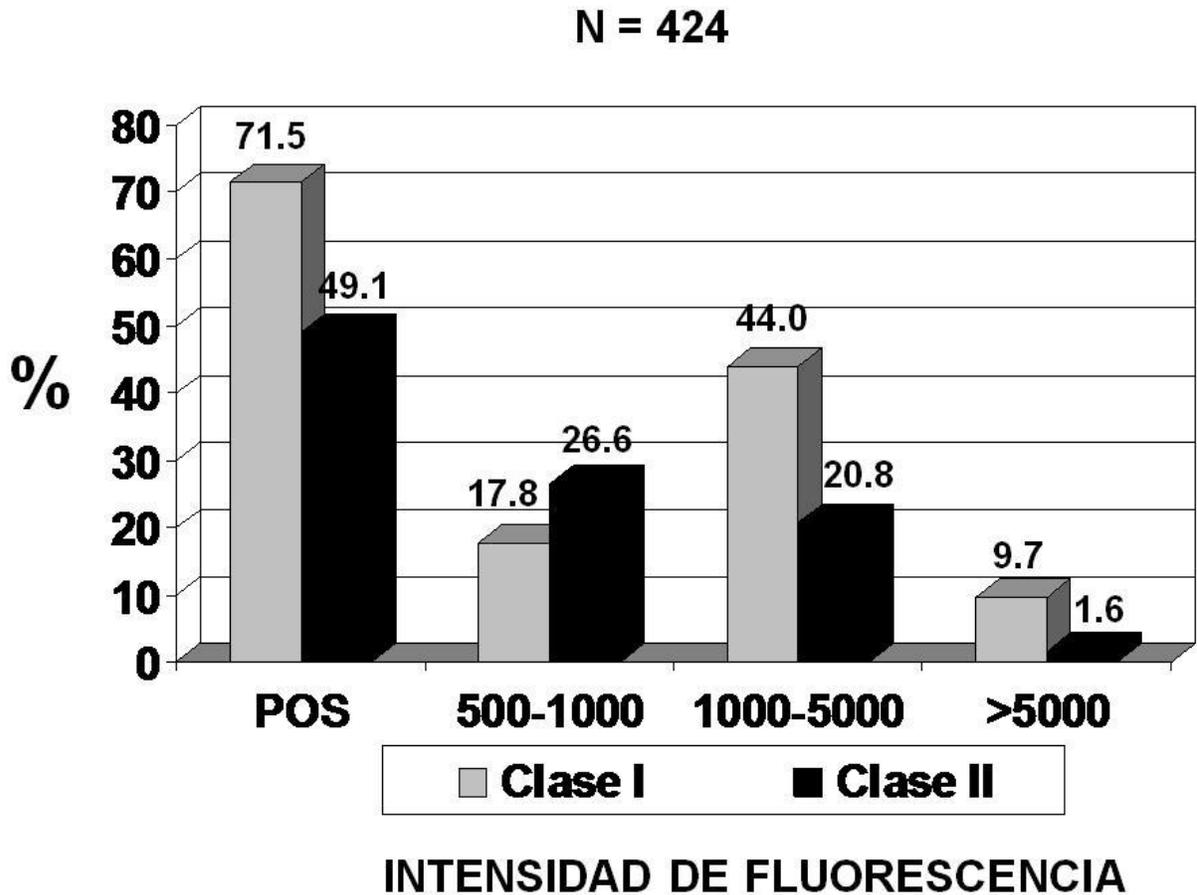
Prevalencia de Anticuerpos anti-HLA y anti-MICA. Sorprendentemente, este estudio demostró que el 84.4% de los hombres sanos evaluados tenían niveles de fluorescencia por encima de 500 unidades para anticuerpos dirigido contra al menos una especificidad antigénica clase I o II. El 63% tuvo niveles de fluorescencia por arriba de 1,000 unidades (niveles ya muy significativos) y hasta un 11.5% con niveles por encima de 5,000 unidades. El 45.6% presentaron AcMICA mayores a 500 unidades, el 34% >1000 unidades y 7.8% >5000 unidades(Figura VIII.6).

Figura VIII.6.- Prevalencia de anticuerpos anti-HLA y anti-MIA por intensidad y tipo.



Visto de otra manera, la frecuencia de AcHLA clase I fueron en general mayor que los clase II, con excepción del grupo de 500-1000 de intensidad de fluorescencia (Figura VIII.7).

Figura VIII.7.- Prevalencia de AcHLA clase I y II por intensidad de fluorescencia.



En la Tabla VIII.4 se describe la proporción de pacientes con AcHLA para cada una de las especificidades antigénicas clase I y clase II (se muestran solo las que tuvieron prevalencias por encima del 3%). Es sorprendente que algunas de ellas lleguen hasta el 20.5% de positividad en población sana sin historia de alosensibilización y que no es nada despreciable la cantidad de especificidades clase I y clase II con prevalencias por arriba del 5% de la población estudiada.

Cabe señalar que una tercera parte de los individuos estudiados tenía anticuerpos contra solo una o dos especificidades clase I y II, mientras que 2/3 partes de la población tenía múltiples anticuerpos positivos, siendo 34 el máximo de anticuerpos presentes en un solo paciente.

suero la reducción del que se extrajo sin modificar mucho los otros presentes. En los pacientes con niveles de fluorescencia mayores de 1,000 se pudo realizar dicho procedimiento. Cabe señalar que este mismo procedimiento de “absorción-extracción” se utiliza para identificar epítopes que de manera común identifican como blanco uno o más anticuerpos. Esto último se ha tomado como modelo para explicar la gran variedad de anticuerpos que genera un individuo aún sin haber sido expuesto necesariamente a todos esos antígenos. En la tabla VIII.5 mostramos los epítopes identificados en los donadores sanos.

Tabla VIII.5.- Epítopes identificados en donadores sanos.

| Especificidades HLA | Frecuencia (N) | Epitope ID | Posición del Aminoácido |
|------------------------|----------------|------------|-------------------------|
| A*3002 | 20 | None | |
| A*8001 | 8 | 29 | 56E+ |
| B*1512 (B76) | 8 | 240 | 163L+166D/+ |
| A*1102 | 4 | 30 | 19K |
| B*1516 (B63) | 4 | 409 | 43P+62R+65R |
| B*2705 | 1 | 406 | 65Q+69A+80T/+ |
| A*3001, A*3002, A*3101 | 1 | 31 | 56R |
| Cw*1701 | 6 | New | 143S |
| B*8201 | 5 | New | 162D |
| A*2501 | 3 | New | 76E+90D/+ |
| A*3401, A*3402 | 3 | New | (22I) |
| B*4501 | 3 | New | (9H)+167S |
| A*0203 | 2 | New | 127K+149T/142T+149T/+ |
| A*3101 | 2 | New | 62Q+73I |
| A*4301 | 2 | New | 62L+163R/+ |
| A*6602 | 2 | New | 149T+163E/+ |
| A*3101, A*3301, A*3303 | 2 | New | 73I |
| Cw*0303 (Cw9) | 2 | New | 91R |
| A*0101 | 1 | New | 158V+163R/+ |
| A*7401 | 1 | New | 2R |
| A*0101, A*8001 | 1 | New | 65R+167G |
| A*6602, B*4001(B60) | 1 | New | (97R)+131R+163E |
| B*6701 | 1 | New | 69A+158T/ |

Como se muestra en la tabla, había algunos epítopes ya previamente identificados, pero en nuestras muestras se pudo identificar muchos otros, que de hecho se muestra la lista completa en otra publicación⁵⁰.

Medidas adicionales para tener certeza de los resultados y probar reproducibilidad. Hay dos grandes fabricantes de reactivos para detección de AchLA por Luminex, One Lambda Inc (que son los que usamos y aquí mostramos) y TEPNEL. Por ende, nos dimos a la tarea de repetir los estudios ahora con los reactivos de TEPNEL, obteniendo resultados semejantes (no idénticos porque varía en las especificidades antigénicas según el fabricante), pero fue claro que una gran cantidad de sujetos sanos tenían reacción positiva independientemente del reactivo utilizado.

Como los sueros fueron enviados desde México a Los Ángeles, surgió la duda de si en algún momento se contaminaron las muestras y eso diera la reactividad positiva, por lo que estudiamos otras poblaciones: voluntarios del laboratorio en Los Ángeles (todos americanos sanos) -ver Figura VIII.8-, miembros de un club Japonés que (Japoneses cuyo lugar de residencia era Japón pero temporalmente estaban en USA) –Figura VIII.9-, un grupo de originarios del Norte de la India que eran vegetarianos estrictos desde la infancia y que temporalmente radicaban en Los Ángeles y finalmente unas muestras de cordón umbilical que nos enviaron desde Italia.

Figura VIII.8.- Comparación de prevalencias de AchLA entre México y Los Ángeles.

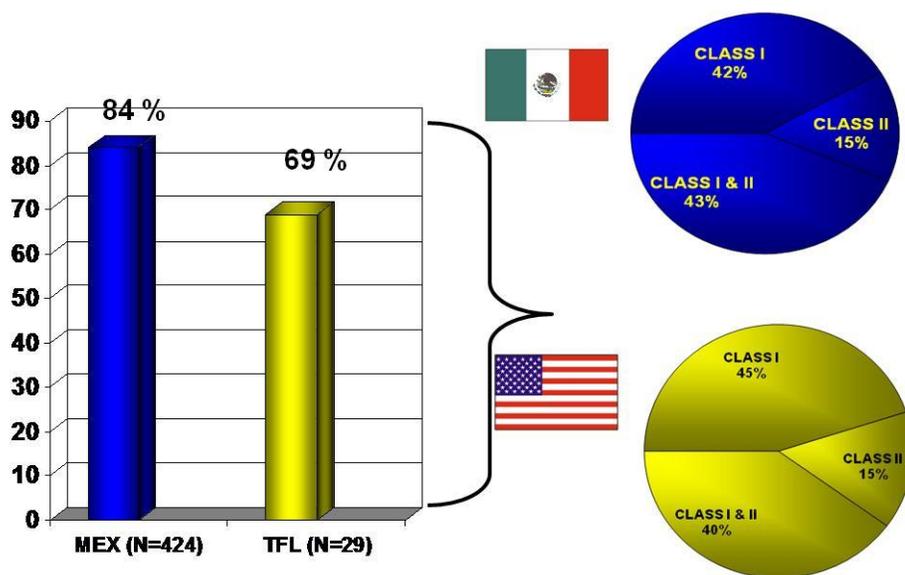
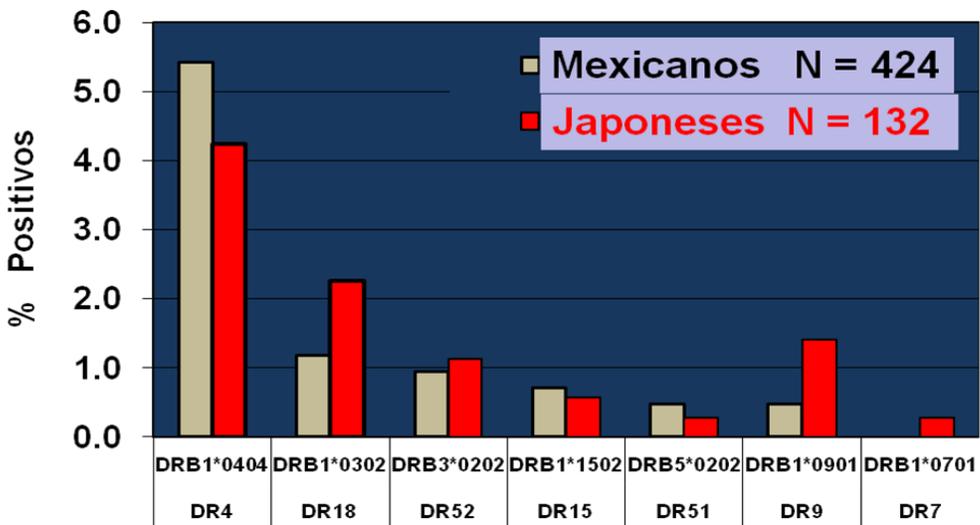
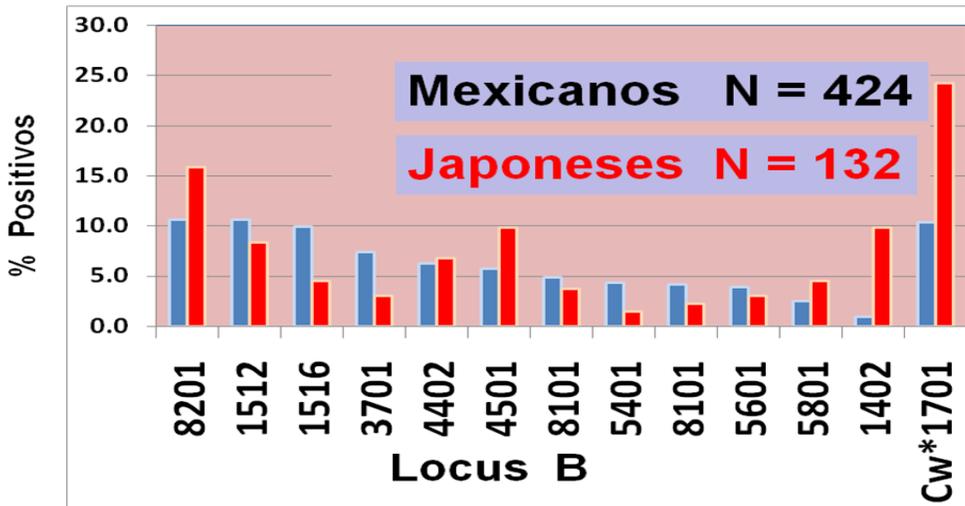
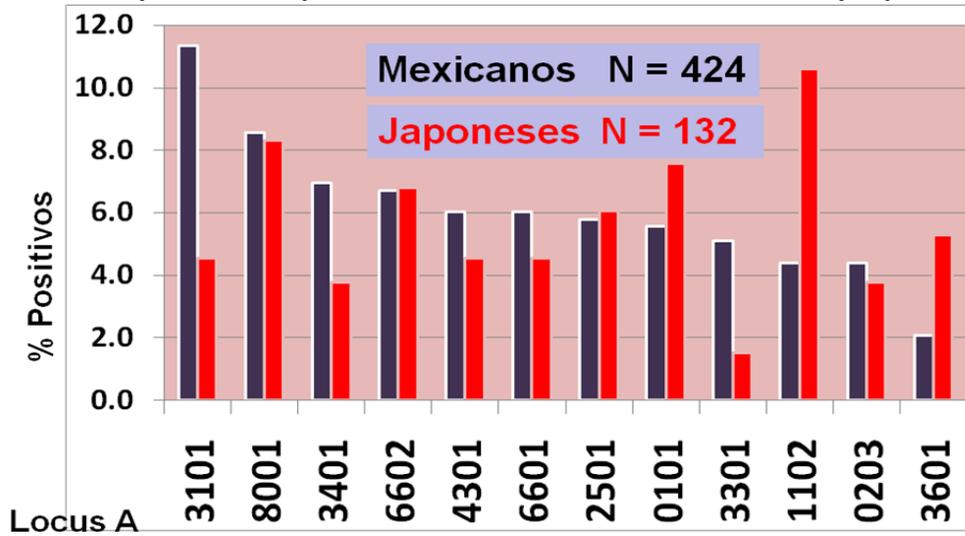


Figura VIII.9.- Comparación de prevalencias de AchLA entre Mexicanos y Japoneses.



Como se puede ver en las figuras VIII.8 y 9, la frecuencia de AcHLA positivos en diferentes poblaciones: Mexicanos, nativos de EE.UU. y Japoneses es muy similar. Lo mismo fue para los pocos originarios de la India y la sangre de cordón umbilical de recién nacidos de Italia. De estos resultados, además de ver la reproducibilidad del método, lo interesante es que se puede analizar poblaciones con entornos muy diferentes, hábitos alimenticios radicalmente diferentes y con el análisis del cordón umbilical vemos que puede haber posiblemente transferencia de madre a hijo desde in útero.

IX DISCUSION

Tradicionalmente es reconocido que para un antígeno específico hay un anticuerpo específico, aunque en la práctica diaria al igual que múltiples reportes en la literatura, vemos que una gran proporción de pacientes receptores de trasplante renal desarrollan AchLA dirigidos contra especificidades que no se encuentran en el injerto y que no pueden ser explicados claramente,^{44,45} sin embargo, se ha visto que aún la presencia de AchLA inespecíficos confieren mayor riesgo para pérdida del injerto con relación directa a la cantidad de dichos anticuerpos.^{35,40,45}

Tratando de explicar el origen de estos anticuerpos, realizamos un estudio previo, en el cual encontramos que 9 de 20 individuos sanos que recibieron la vacuna contra hepatitis B con o sin aplicación del PPD, desarrollaron AchLA *de novo* medidos mediante %PRA.⁴⁹ Roddy y cols.⁵¹, también encontraron positividad del %PRA en el 35% de un pequeño grupo de pacientes con cáncer que recibieron un anticuerpo murino (sin quimerismo con anticuerpo humano), pero en ese mismo reporte ellos no encontraron cambios en sujetos sanos que recibieron la vacuna contra hepatitis B. La diferencia con nuestro grupo es que para ellos fue la primera aplicación de la vacuna y en nuestro casos fue refuerzo, además que nosotros aplicamos adicionalmente PPD, lo que puede ser un estímulo más potente.

En el presente estudio elegimos la vacuna contra influenza dado que las guías internacionales indican que sujetos con IRCT y trasplantados deben recibirla anualmente. Adicionalmente, decidimos elegir pacientes en los que el desarrollo de AchLA y/o AcMICA tendrían consecuencias potencialmente deletéreas, como son los pacientes trasplantados con riñón funcional y pacientes con IRCT, grupo que potencialmente podría trasplantarse y que son

considerados como inmunosuprimidos por su enfermedad. Adicionalmente, debíamos tener un grupo de sujetos sanos o con enfermedades que no comprometen el sistema inmune pero que también recibieran la vacuna, con el fin de comparar la respuesta en diferentes situaciones clínicas y de inmunosupresión. En esta ocasión elegimos un grupo control de sujetos completamente sanos y sin historia de aloinmunización, que rechazaron la aplicación de la vacuna por diferentes motivos. También decidimos seguirlos por 6 meses para ver el comportamiento de los anticuerpos (algo no explorado hasta ese momento), sobre todo para identificar si los anticuerpos *de novo* son persistentes o desaparecen a través del tiempo ante la falta de estímulo antigénico permanente.

Los resultados muestran varias cosas de interés. En apoyo a nuestro estudio previo y al de Roddy, ya comentados previamente, se demostró que en ausencia de aloantígenos, es posible la generación de AcHLA y AcMICA, si bien estos últimos tuvieron una relación temporal con la aplicación de la vacuna, el hecho de que no sea así para la mayoría de AcHLA, hace suponer que existen diversos estímulos antigénicos para su producción además de la posible participación de la vacuna. Esto lejos de ir en detrimento del estudio, apoya nuestra teoría de que es posible que un individuo genere AcHLA y AcMICA sin que necesariamente haya contacto con células humanas como tradicionalmente se estipula. Estos anticuerpos *de novo* mostraron descenso por debajo de las 500 unidades de fluorescencia en solo 2 casos, mientras que el resto de los casos persistieron positivos durante su seguimiento. Cabe señalar que al igual que nuestro estudio previo, la gran diversidad de especificidades de los anticuerpos encontrados hace poco probable la posibilidad de que se trate de reacción cruzada con alguna molécula de la vacuna.

Simultáneamente a nuestro estudio, Danziger-Isakov et al⁵², realizaron un estudio parecido, donde estudiaron a 30 sujetos sanos, 8 con trasplante renal, 9 con trasplante pulmonar quienes

recibieron la vacuna contra influenza y a 20 sujetos sanos sin vacunación como controles. Les midieron respuesta humoral (midiendo AcHLA mediante %PRA) y respuesta celular mediante ELISPOT (mide secreción de interferón por células T activadas) al tiempo 0, 2, 4 y 12 semanas post inmunización. Solo 2 de los 30 sanos vacunados desarrollaron AcHLA *de novo*, aunque solo lo diagnosticaron con incremento del %PRA, que en nuestra experiencia se puede modificar fácilmente e idealmente se debe corroborar con “single antigen”, lo cual no se realizó.

Por otro lado, algo inesperado en nuestro estudio fue que aún en la población sin historia de exposición a factores alosensibilizantes, encontramos una alta proporción de pacientes con anticuerpos preformados y que aún para los tres primeros grupos, es más alto de lo esperado.

Sin embargo, ante este hallazgo y a la incapacidad de descartar que dada la alta frecuencia de mujeres en todos los grupos, haya habido la posibilidad de microabortos no percibidos por los sujetos de estudio (comentario de varios expertos nacionales e internacionales que conocieron el trabajo previo con vacuna de hepatitis B), decidimos hacer un estudio transversal en 424 hombres adultos sanos, donadores de sangre, sin historia de aloinmunización, a los cuales realizamos determinación de AcHLA con Single Antigen mediante Luminex. Encontramos que el 84% tenía AcHLA dirigidos por lo menos a una especificidad antigénica, corroborando que no eran autoanticuerpos.⁵³ A estos anticuerpos los denominamos como “naturales” ya que no podemos demostrar su patogenicidad. Esto viene a explicar los hallazgos descritos en nuestro estudio y refuerzan en conjunto, el hecho de que existen otros estímulos antigénicos aún no esclarecidos que inducen la generación de estos anticuerpos.

Por supuesto esto tiene que ver con el uso de métodos tan sensibles como la tecnología Luminex¹³⁻¹⁷, capaz de detectar anticuerpos no detectados incluso en las pruebas cruzadas por

citometría de flujo. Este método poco a poco se ha convertido en el preferido para detección de AcHLA y AcMICA en los diferentes laboratorios de trasplantes. A este respecto, podemos señalar que gran parte de los anticuerpos *de novo* tuvieron niveles de fluorescencia por debajo de 1000 unidades, lo que los hace indetectables por otro método incluyendo citometría de flujo, por lo que hubo necesidad de emplear otros métodos a nuestro alcance como la absorción de los mismos, para corroborar su presencia y especificidad.

Este estudio, tiene implicaciones claras en el área de trasplantes. Debemos recordar que gran parte de los anticuerpos preformados, incluso de la población control al igual que en nuestro estudio de donadores sanos, presenta niveles altos de anticuerpos (por encima de 5000 unidades), niveles en los que las pruebas cruzadas por citometría de flujo serían positivas y quizás hasta por el método de CDC. Por otro lado, en algunos centros europeos se está utilizando las pruebas cruzadas virtuales⁵⁴ que consiste en asignar los órganos de donador cadavérico a los pacientes que no tengan anticuerpos dirigidos contra especificidades del donador y que fueron detectados previamente con Luminex, o son designados como “antígenos indeseables” con el mismo fin⁵⁵. Para este caso en particular, podrían descartarse algunos receptores potenciales solo por tener anticuerpos inespecíficos que posiblemente sean de los llamados “naturales”, aún sin haber sido sometidos a una prueba cruzada tradicional que confirme que ese receptor deba ser eliminado.

Definitivamente hay muchos aspectos que habrá que definir en estudios posteriores como son, la especificidad de la IgG detectada, dado que algunos subtipos no fijan complemento y podrían tener menos patogenicidad e implicaciones clínicas en trasplantes. También se deberá aclarar cuál es el nivel de luminiscencia adecuado para dar como positivos a los anticuerpos; por lo anterior, las aportaciones del presente estudio tienen implicaciones importantes en la clínica.

X CONCLUSIONES

En este estudio demostramos que es factible la formación de anticuerpos *de novo* en diferentes poblaciones aún bajo esquemas de inmunosupresión aparentemente adecuados. Para el caso de AcMICA hay una relación temporal más estrecha con respecto a la vacunación, pero en lo que respecta a los AcHLA, por la relación temporal no pueden ser adjudicados a la vacuna. En ningún caso hubo mediación de antígenos HLA y/o MICA. El análisis multivariado mostró como único factor predictor del desarrollo de anticuerpos *de novo*, la presencia de anticuerpos preformados lo que sugiere que se trata de pacientes muy reactivos inmunológicamente.

Adicionalmente, hasta el 84% de la población sana puede tener algún tipo de anticuerpo anti-HLA/anti-MICA “natural”, es decir, sin aloinmunización previa, lo que refuerza el hecho de que existen otras vías de sensibilización contra antígenos HLA y MICA. Falta esclarecer el impacto clínico que tendrán dichos anticuerpos.

XI ANEXOS

a) Cronograma.

Documentación bibliográfica: Enero/2006 hasta el final del estudio.

Revisión y aprobación interna del protocolo: Junio-octubre/2006.

Revisión y aprobación externa del protocolo: Noviembre/2006-febrero/2007.

Revisión y aprobación por el comité de ética: Octubre/2006.

Recolección de datos: Desde la aprobación del comité de ética.

Análisis de resultados: Continuo durante el estudio y el final al momento de completar los grupos de estudio.

Presentación del trabajo terminado: Enero-Febrero/2009.

b) Aspectos éticos. Este estudio cumple con todos los puntos señalados en los convenios internacionales sobre investigación en humanos. Se respetará la confidencialidad de la información. Fue aprobado por el Comité de Ética de esta Institución, además de que se solicitó el consentimiento informado de cada paciente.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Gorer PA. The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br J Exp Pathol* 1936; 17: 42-50.
- ² Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet* 1948; 49: 7-103.
- ³ Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol* 1958; 20: 156-66.
- ⁴ Terasaki PI, Mandell M, van de Water J, Edginton TS. Human blood lymphocyte cytotoxicity reaction with allogenic antisera. *Ann NY Acad Sci* 1964; 120: 332-4.
- ⁵ Hakim NS, Papalouis VE. History of organ and cell transplantation. Covent Garden (London): Imperial Collage Press; 2003.
- ⁶ Band MR, Larson JH, Rebeiz M, et al. An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Res* 2000; 10: 1359-68.
- ⁷ Larson JH, Rebeiz MJ, Stiening CM, Windish RL, Beever JE, Lewin HA. MHC class I-like genes in cattle, MHCLA, with similarity to genes encoding NK cell stimulatory ligands. *Immunogenetics* 2003; 55: 16-22.
- ⁸ Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 6259-63.
- ⁹ Morales-Buenrostro LE, Alberú J. Anti-major histocompatibility complex class I-related chain A antibodies in organ transplantation. *Transplantation Rev* 2008; 22: 27-38.
- ¹⁰ Milosevic S, Bachnick B, Karim K, et al. Identification of MHC II-restricted minor histocompatibility antigens after HLA-identical stem-cell transplantation. *Transplantation* 2010; 90: 1030-5.
- ¹¹ <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/intro.html>. Accesada el 18 de febrero de 2011.

-
- ¹² Collins RW. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *Eur J Immunogenet* 2004; 31: 105-14.
- ¹³ American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Editors. The ASHI Laboratory Manual, fourth edition. New Jersey, 2010.
- ¹⁴ Schlaf G, Pollok-Kopp B, Manzke T, Schurat O, Altermann W. Novel solid phase-based ELISA assays contribute to an improved detection of anti-HLA antibodies and to an increased reliability of pre- and post-transplant crossmatching. *NDT plus* 2010; 3: 527-38.
- ¹⁵ Colombo MB, Haworth SE, Poli F, et al. Luminex technology for anti-HLA antibody screening: evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72: 465-71.
- ¹⁶ Tait BD, Hudson F, Cantwell L, et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14: 247-54.
- ¹⁷ Tait BD, Hudson F, Brewin G, Cantwell L, Holdsworth R. Solid phase HLA antibody detection technology--challenges in interpretation. *Tissue Antigens* 2010; 76: 87-95.
- ¹⁸ <http://www.onelambda.com> accesado el 23 de febrero de 2011.
- ¹⁹ Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, Zou Y, Stastny P. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol* 2000; 61: 917-24.
- ²⁰ Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, et al. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum Immunol* 2006; 67: 230-7.

-
- ²¹ Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, et al. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 324-31.
- ²² Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, Soderstrom K. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2002; 74: 268-77.
- ²³ Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 2003; 75: 1034.
- ²⁴ McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 319.
- ²⁵ Terasaki P. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 665.
- ²⁶ Mao Q, Terasaki PI, Cai J, et al. Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am J Transplant* 2007; 7: 864-71.
- ²⁷ Fernandez-Fresnedo G, Pastor JM, López-Hoyos M, Ruiz JC, Zubimendi JA, Gonzalez-Cotorruelo J, et al. Relationship of donor-specific class-I anti-HLA antibodies detected by ELISA after kidney transplantation on the development of acute rejection and graft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 990.
- ²⁸ Supon P, Constantino D, Hao P, Cagle L, Hahn A, Conti DJ, Freed BM. Prevalence of donor-specific anti-HLA antibodies during episodes of renal allograft rejection. *Transplantation* 2001; 71: 577.
- ²⁹ Panigrahi A, Gupta N, Siddiqui JA, et al. Post transplant development of MICA and anti-HLA antibodies is associated with acute rejection episodes and renal allograft loss. *Hum Immunol* 2007; 68: 362-7.

-
- ³⁰ Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med* 2007; 357: 1293-300.
- ³¹ Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, et al. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 1106.
- ³² Nanni-Costa A, Scolari MP, Iannelli S, Buscaroli A, D'Argangelo GL, Brando B, et al. The presence of posttransplant HLA-specific IgG antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay correlated with specific rejection pathologies. *Transplantation* 1997; 63: 167.
- ³³ Schonemann C, Groth J, Leverenz S, May G. HLA class I and class II antibodies. Monitoring before and after kidney transplantation and their clinical relevance. *Transplantation* 1998; 65: 1519.
- ³⁴ Mizutani K, Terasaki P, Rosen A, Esquenazi V, Miller J, Shih RNJ, et al. Serial ten-years follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant* 2005; 5: 2265.
- ³⁵ Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant* 2007; 7: 408-15.
- ³⁶ Pelletier RP, Hennessy PK, Adams PW, VanBuskirk AM, Ferguson RM, Orosz CG. Clinical significance of MHC-reactive alloantibodies that develop after kidney or kidney-pancreas transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2: 134.
- ³⁷ Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, Lassman C, Wilkinson AH, Kendrick E, et al. Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. *Transplantation* 2005; 79: 591.

-
- ³⁸ Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant* 2009; 9: 2532-41.
- ³⁹ Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, Tsai A, Lei HY. All chronic rejection failures of kidney transplants preceded by development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002; 74: 1192.
- ⁴⁰ Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Muérete A, et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2804.
- ⁴¹ Morales-Buenrostro LE, Buzo-Romero JM, de Leo C, López M, Ortiz-Arroyo VM, Pérez-Garrido J et al. Prevalence of HLA antibodies and its impact on graft function in a group of kidney transplant recipients: a cross sectional study. *Transplant Proc* 2006; 38: 899-902.
- ⁴² Morales-Buenrostro LE, Rodríguez-Romo R, de Leo C, et al. HLA and MICA antibodies: further evidence of their impact on graft loss two years after their detection. In: Terasaki P, editor. *Clinical transplant 2006*. Los Angeles, CA, USA. Terasaki Foundation Laboratory; 2007: 207-18.
- ⁴³ Morales-Buenrostro LE, Rodríguez-Romo R, de Leo-Cervantes C, et al. Evidence on the role of HLA and MICA antibodies in renal graft loss. *Gac Med Mex* 2008; 144: 315-22.
- ⁴⁴ Alberú J, de Leo C, Uribe-Urbe N, Vilatoba M, Trinidad S, Pérez-Garrido J, Rodríguez-Romo RM, Castelán N, Ramírez-González JB, Granados-Arriola J, Morales-Buenrostro LE. Is there a correlation between post-transplant *de novo* anti-HLA antibodies, kidney graft biopsy at 1-yr, and graft function? *Am J Transplant* 2006; 6 (suppl): 777 (Abstract # 2147).

-
- ⁴⁵ Mao Q, Terasaki PI, Cai J, El-Awar N, Rebellato L. Analysis of HLA class I specific antibodies in patients with failed allografts. *Transplantation* 2007; 83: 54.
- ⁴⁶ Idica A, Sasaki N, Hardy S, Terasaki P. Unexpected frequencies of HLA antibody specificities present in sera of multitransfused patients. *Clin Transpl* 2006: 139-59.
- ⁴⁷ Idica A, Sasaki N, Hardy S, Terasaki P. Unexpected frequencies of HLA antibody specificities in the sera of pre-transplant kidney patients. *Clin Transpl* 2006: 161-70.
- ⁴⁸ Crispín JC, Vargas-Rojas MI, Carrasco G, de Leo C, Morales-Buenrostro LE, Alcocer-Varela J, Alberú J. Behavior of regulatory T cells in kidney transplant recipients. A longitudinal study. *Am J Transplant* 2006; 6(suppl):403(Abstract # 997).
- ⁴⁹ Alberú J, Morales-Buenrostro LE, de Leo C, Vargas-Rojas MI, Marino-Vázquez LIA, Crispín JC. A non-allogeneic stimulus triggers the production of de novo HLA antibodies in healthy adults. *Transpl Immunol* 2007; 18: 166.
- ⁵⁰ El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, Sasaki N, Morales-Buenrostro LE, et al. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol* 2009; 70: 844-53.
- ⁵¹ Roddy M, Clemente M, Poggio ED, Bukowski R, Thakkar S, Waxenecker G, et al. Heterogeneous alterations in human alloimmunity associated with immunization. *Transplantation* 2005; 80: 297.
- ⁵² Danziger-Isakov L, Cherkassky L, Siegel H, et al. Effects of influenza immunization on humoral and cellular alloreactivity in humans. *Transplantation* 2010; 89: 838-44.
- ⁵³ Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberú J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008; 86: 1111.

⁵⁴ Bingaman AW, Murphey CL, Palma-Vargas J, Wright F. A virtual crossmatch protocol significantly increases access of highly sensitized patients to deceased donor kidney transplantation.

Transplantation 2008; 86: 1864.

⁵⁵ Zachary AA, Montgomery RA, Leffell MS. Defining unacceptable HLA antigens. *Curr Opin Organ*

Transplant 2008; 13: 405.