



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI HLA EN  
PACIENTES EN PROTOCOLO DE TRASPLANTE DE  
CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS  
CON TRANSFUSIONES SANGUÍNEAS PREVIAS.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**PEDIÁTRA**

P R E S E N T A

**DRA. NATALI ROBLES ORDOÑEZ**

ASESOR DE TESIS  
Dra. Briceida López Martínez

COLABORADOR  
Dr. Rafael Gaytán Morales



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO  
FEDERICO GÓMEZ  
Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI HLA EN  
PACIENTES EN PROTOCOLO DE TRASPLANTE DE  
CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS  
CON TRANSFUSIONES SANGUÍNEAS PREVIAS.

T E S I S  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
PEDIÁTRA

P R E S E N T A

**DRA. NATALI ROBLES ORDOÑEZ**

Dra. Rebeca Gómez Chico Velasco  
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO  
ACADEMICO



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO  
FEDERICO GÓMEZ  
Instituto Nacional de Salud

Dra. Briceida López Martínez  
ASESOR DE TESIS

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
 FACULTAD DE MEDICINA  
 DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO  
 HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

PREVALENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI HLA EN  
 PACIENTES EN PROTOCOLO DE TRASPLANTE DE  
 CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS  
 CON TRANSFUSIONES SANGUÍNEAS PREVIAS.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**PEDIÁTRA**

P R E S E N T A

**DRA. NATALI ROBLES ORDOÑEZ**

ASESOR DE TESIS  
 Dra. Briceida López Martínez

COLABORADOR  
 Dr. Rafael Gaytán Morales



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO  
 FEDERICO GÓMEZ  
 Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D. F.



FEBRERO 2013

## INDICE

1. Antecedentes y marco teórico.....	5
1.1 Antecedentes	
1.2 Marco teórico	
2. Planteamiento del problema .....	11
3. Justificación .....	11
4. Objetivo general .....	12
5. Hipótesis .....	12
6. Características de los pacientes .....	12
6.1 Criterios de Inclusión	
6.2 Criterios de exclusión	
7. Metodología .....	12
8. Variables .....	12
9. Procesamiento de muestras .....	13
10. Resultados .....	18
11. Discusión y Conclusiones .....	21
12. Limitantes del estudio y consideraciones éticas .....	23
13. Referencias.....	24

## **1. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.**

### **1.1 Antecedentes**

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCH), antes conocido como trasplante de médula ósea es en la actualidad un procedimiento terapéutico, que con el tiempo ha tomado su lugar como una opción para padecimientos malignos, no malignos y metabólicos que antes no la tenían.<sup>1</sup>

Después de las primeras experiencias con el trasplante de médula ósea (TMO) realizado por el Dr. E. Donnall Thomas en la década de los 50, se inicia su expansión en la década de los 70, para experimentar un espectacular desarrollo en los años 80 y 90. En el año 2000 se realizaron cerca de 30 000 trasplantes en el mundo, de ellos el 70 % fueron autólogos y el 30 % alogénicos. La sangre periférica fue la fuente de progenitores hematopoyéticos en el 90 % de los trasplantes autólogos y en el 30 % de los alogénicos.<sup>2</sup>

En México, en enero del 2009 se realizó en Monterrey una reunión en la que se presentó la casuística del 2007 y 2008. El número total de trasplantes fue de 434, siendo las enfermedades que más frecuentemente se trasplantan; leucemia aguda linfoblástica (18%), mieloma múltiple (16%) y leucemia aguda mieloblástica 14%.<sup>3</sup>

El Trasplante de Células progenitoras Hematopoyéticas, es en la actualidad una modalidad terapéutica cada vez más utilizada alrededor del mundo en centros de atención a pacientes en edad Pediátrica como adultos.

Las indicaciones de Trasplante Hematopoyético son precisas, estas, incluyen una gran cantidad de padecimientos tanto oncológicos como no oncológicos.

El sistema HLA cumple fisiológicamente un importante rol en los fenómenos de presentación y reconocimiento antigénico<sup>4</sup>. Desde hace décadas se conoce su papel en los trasplantes, por lo que ha sido identificado en el hombre como complejo mayor de histocompatibilidad. Las moléculas del sistema HLA y sus anticuerpos se clasifican en clase I y clase II. El reconocimiento inmunológico del órgano trasplantado está vinculado a la distancia genética existente entre donante y receptor. Las diferencias en la dotación de antígenos HLA y la presencia de anticuerpos contra ellos inciden en la evolución del trasplante<sup>5</sup>. Existen diversos eventos inmunizantes como la transfusión sanguínea, el embarazo y el propio trasplante, que pueden promover la aparición de anticuerpos HLA. La presencia de anticuerpos (Ac) HLA en candidatos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas limita las posibilidades de injerto.

La ausencia de Ac HLA donante específicos se constata por una prueba cruzada (cross match) negativa. Por otro lado, la presencia de Ac HLA compromete la sobrevivencia del injerto a largo plazo<sup>6</sup> en el caso del trasplante renal resulta fundamental estudiar Ac HLA en todos los pacientes que entran al protocolo de trasplante.<sup>7</sup>

## **1.2 Marco teórico**

La supervivencia en un medio ambiente hostil, requiere de la capacidad de montar una respuesta inmune protectora, al mismo tiempo se esta evitando una reacción adversa del sistema inmune propio.

En muchas situaciones de enfermedad se pierde este control, ya sea comprometiendo la capacidad de responder a una agresión, o evitar la auto inmunidad, sin embargo existen factores exógenos que nos ponen en riesgo de facilitar el desequilibrio, y nos preparan a una respuesta no esperada ante una situación no planeada como es el estado inmune al momento de un trasplante alogénico.

La migración y localización de un antígeno están gobernadas por la capacidad o incapacidad de respuesta inmunológica contra infecciones, tumores, sistema propio o bien contra xeno injertos o alo injertos.

En ambas situaciones una respuesta inmune puede ser construida como un balance entre la reacción linfocitaria y la composición, calidad cinética y distribución del antígeno ya sea propio o extraño.

Características de la respuesta inmune.

El sistema inmune responde de manera similar contra microorganismos citopáticos letales y otros no citopáticos menos letales, pero con diferentes consecuencias.

Cuando se trata de un microorganismo citopático, con el objetivo de prevenir daño hacia las células del huésped, la respuesta inicial no especifica innata y después la especifica o adaptativa se movilizan para eliminar el agente agresor de una manera fácil y completa y sin considerar daño a los tejidos del huésped. La primera línea de defensa es mediada por interferones, macrófagos, células T y células NK, además los agentes infecciosos con epitopes repetidos y densamente dispuestos, o con un gran contenido de lipopolisacaridos, pueden inducir respuesta de células B, para la producción de anticuerpos sin necesidad de células T cooperadoras. Los mecanismos menos específicos o no específicos como el complemento las interleucinas y los macrófagos también pueden estar involucrados. La respuesta especifica tanto de células T como B son las que controlan de manera definitiva al microorganismo<sup>8</sup>

En contraste, en la respuesta ante microorganismos no citopáticos o menos citopáticos, puede ser conducida de manera que el huésped y el patógeno coexistan. Microorganismos intracelulares son inicialmente controlados por interleucinas producidas por células T citotóxicas, pero reconociendo los complejos que muestran las células propias, el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Como los microorganismos pueden no hacer daño, la respuesta inmune puede entonces no causarle daño tanto a tejido normal como infectado.

Reacciones de la respuesta inmune contra injertos.

En el caso de xenotrasplantes, el mecanismo predominante es la respuesta innata, incluyendo la destrucción celular dependiente de complemento, y otros mecanismos basados en la respuesta cruzada de anticuerpos naturales, provocando un rechazo hiper agudo.

Desde la década de los 50 ´s, Lawrence compara paso a paso, lo que sucede ante un rechazo de un aloinjerto, comparado con una reacción de hipersensibilidad retardada. En este tiempo se desconocía los mecanismos del CMH. Cuando se obtuvo esta información, fue obvio el equivalente fisiológico del rechazo con el mecanismo en caso de células infectadas<sup>9</sup>.

Debido a que los órganos linfoides son sitios críticos para la inducción de la respuesta contra todos los antígenos, el resultado de la reacción inmune, puede correlacionarse tanto con la ruta de diseminación y la eventual localización del antígeno.

En los aloinjertos, los primeros días después de trasplantado el órgano, células multilíneas, provenientes de la médula ósea, entre estas los leucocitos del donador (Leucocitos Pasajeros), constituyen de 1 al 20% de los mononucleares circulantes en el receptor, El porcentaje depende del órgano que fue trasplantado; es alto en el caso de hígado e intestino, y bajo en riñón y corazón. Estos mononucleares circulantes incluyen células progenitoras hematopoyéticas y células dendríticas, que viajan a los órganos linfoides del receptor y son reemplazadas por células similares del receptor que llegan al injerto. Después de aproximadamente dos semanas, se incrementa el número de leucocitos del donador que pueden ser detectados en otros tejidos, y para los tres meses, estos se encuentran en la mayoría de los tejidos no linfoides, como piel y corazón<sup>10</sup>.

La supresión del agotamiento clonal es un evento que fue invocado desde hace más de tres décadas, para explicar las observaciones después de experimentos clínicos en el área de trasplante de órganos, cuando la relación entre el huésped y el injerto fueron muy alteradas una vez que la terapia inmunosupresora fue discontinuada.

La hipótesis inicial, no fue ampliamente aceptada, por el pobre conocimiento de los leucocitos pasajeros. Estos leucocitos constituyen el principal componente inmunogénico de los aloinjertos compatibles, y un efecto de esto ha sido atribuido a la expresión de CMGH clase II, o a moléculas coestimuladoras como B7.

La rápida desaparición de los leucocitos del donador de los órganos y tejidos trasplantados, fue lograda por la destrucción selectiva por el sistema inmune del receptor. Después de que se demostró el evento de los Leucocitos pasajeros, se observó como la destrucción inmune se presentó tanto en sangre periférica como dentro del injerto.

Correlación clínica:

En el caso de los trasplantes, a diferencia de la infección, usualmente se presenta una doble reacción inmune: huésped contra injerto e injerto contra huésped. Estas respuestas pueden persistir lo suficiente para permitir una inducción a una mutua no respuesta. Esto ocurre de manera espontánea en los trasplantes entre gemelos idénticos. En el caso del Trasplante Hematopoyético, es necesario un umbral de inmunosupresión para evitar la destrucción aguda de los leucocitos en el trasplante hacia las células del huésped.

La mieloablación pre-trasplante hace al huésped susceptible de una agresión por parte de las células inmunes del donador. El control de este evento es uno de los principales objetivos de la inmunosupresión, y como la destrucción completa de los leucocitos del huésped no es posible, tras el trasplante estas células pueden estimular una respuesta a expensas de las células T maduras del donador<sup>11</sup>.

La alo sensibilización puede convertirse en una barrera extraordinaria al injerto en el Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos, debido a la predisposición de una respuesta inmune humoral por parte de las células del huésped hacia el injerto.<sup>12</sup>

A pesar de los conocimientos en cuanto a los diferentes puntos que disparan el rechazo de un injerto en el trasplante de órganos sólidos, en el caso de rechazo del injerto en el trasplante hematopoyético, es generalmente atribuido a la actividad citolítica anti células del donador por parte de las células T y células NK del huésped que sobreviven a la quimioterapia de condicionamiento. De cualquier modo, una reacción de rechazo mediada por anticuerpos después de un trasplante hematopoyético alogénico, puede ocurrir, ya sea por citotoxicidad mediada por anticuerpos por citotoxicidad mediada por complemento. Los anticuerpos pre formados al momento de la infusión de Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH), no afectan al injerto, en regímenes de condicionamiento estándar, y la inmunosupresión celular B o T, como estrategias moduladoras utilizadas en el periodo peri trasplante.

Aunque la plasmaféresis, las altas dosis de Inmunoglobulina intravenosa, y la esplenectomía, son comúnmente usadas en el trasplante de órganos sólidos para disminuir el rechazo mediado por anticuerpos, estas estrategias no han sido parte del condicionamiento en el TCPH.<sup>13</sup>

Todos los componentes de la sangre, incluyendo leucocitos, eritrocitos, plaquetas y suero, tienen un potencial de provocar la producción de anticuerpos anti HLA. Las excepciones a esta regla son las fracciones de proteína del plasma y la albúmina. Los Leucocitos, se han implicado como fuente que provoca sensibilización, ya que los productos para transfusión no leucoreducidos o filtrados, son más inmunogénicos que los productos filtrados o leucoreducidos, los cuales contiene un número menor de leucocitos de  $1-5 \times 10^6$  células por unidad.

En receptores no sensibilizados, productos puros, tanto de eritrocitos como de plaquetas, tienen un mínima inmunogenicidad, debido a la ausencia de moléculas coestimuladoras. Sin embargo, productos puros de eritrocitos, tienen la capacidad de reactivar la producción de anticuerpo anti HLA, en receptores previamente sensibilizados. El eritrocito no sintetiza HLA por si mismo, pero es a través de la herencia de HLA clase I, que le confiere sus reticulocitos ancestros. En individuos sensibilizados hacia HLA, la vida media de los eritrocitos transfundidos se puede acortar; puede ocurrir hemólisis y se puede incrementar su secuestro en el bazo. Aunque los eritrocitos expresan entre 40 y 50 moléculas de HLA clase I por célula, los Linfocitos T expresan 100,000 por célula, y el total de contenido por unidad de sangre de moléculas HLA clase I, es igualmente dividido entre eritrocitos y leucocitos. Solo los leucocitos viables tienen la oportunidad de persistir en un estado de microquimerismo después de la transfusión y continuar la síntesis de HLA clase I y II no propio.

Las plaquetas expresan antígenos del grupo ABH, expresan HLA clase I, y alo antígenos plaquetarios humanos, pero como los eritrocitos, las plaquetas son inductores pobres de alo anticuerpos en receptores inmunológicamente nativos, debido a la pérdida de moléculas coestimuladoras. Sin embargo antes de inmunidad, los alo antígenos plaquetarios pueden causar refractariedad a la transfusión de plaquetas.

La cantidad de inmunidad hacia HLA Clase I, es mayoría en los pacientes refractarios a plaquetas. En el 30% de los receptores de plaquetas no leucoreducidas, se desarrolla anticuerpos anti- HLA. Este porcentaje se reduce al 17 a 21 por ciento después de la leucoreducción. Efectos similares se han logrado con la infusión de plaquetas ABH y HLA Clase I compatibles, o con la neutralización de anticuerpos con

Inmunoglobulina intra venosa. En pacientes con Anemia Aplástica Adquirida (AAA), las “Leucoaglutininas” fueron descritas por primera vez por Jean Dausset en la década de los 50 ´s. Desde entonces, muchos estudios han confirmado la presencia de anticuerpos contra HLA, así como otros alo y auto anticuerpos. Los pacientes con AAA además muestran altos niveles de reactividad en sus Células T, hacia HLA, No HLA y contra auto antígenos. Las dos mayores consecuencias de esto es la refractariedad a la transfusión de plaquetas y falla del injerto en pacientes sometidos a TCPH.

La mayoría de los anticuerpos producidos después de múltiples transfusiones, tienen especificidad para HLA, pero del 10 al 30%, tiene reacción cruzada con plaquetas HLA compatibles, provocando transfusiones ineficaces.

En un estudio realizado por el grupo Europeo para el estudio de la Anemia Aplástica, y Trasplante de Médula Ósea, reporta en el grupo de pacientes estudiados, hasta 62% de estos, con anticuerpos anti linfocitos<sup>14</sup>.

Se ha demostrado en modelos murinos, la capacidad de sensibilización alogénica, posterior a repetidas transfusiones de células esplénicas alogénicas, además pudiendo provocar este mismo suceso sensibilización a receptores de Médula Ósea, con consecuente citotoxicidad mediada por anticuerpos<sup>15</sup>.

El uso de Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (FEC-G), utilizado en la movilización de CPH a sangre periférica para TCPH, se ha comparado con la médula ósea obtenida de forma directa, en relación con el incremento de los títulos de anticuerpos anti Eritrocitos, dirigidos contra sistema ABH, resultando un incremento en la incidencia de los anticuerpos circulantes anti HLA<sup>16</sup>.

En pacientes en los que es necesario el uso de dispositivos, como el uso de puentes coronarios o válvulas cardíacas, se ha encontrado sensibilización anti HLA clase I y II, como consecuencia incremento en el rechazo de trasplantes cardíacos. Esto se explica en este tipo de pacientes, como resultado de los requerimientos transfusionales, sobre todo de eritrocitos utilizados dentro de las medidas de soporte y el impacto en los resultados de los trasplantes cardíacos esta aún en debate<sup>17</sup>.

Ante esta problemática en el área de trasplantes, tanto de órganos sólidos como en el hematopoyético, se han hecho ya propuestas específicas para prevenir la alosensibilidad anti HLA, como la leucoreducción universal antes de almacenar plaquetas, como medida preventiva a la producción de estos anticuerpos, y al mismo tiempo disminuir la refractariedad a la transfusión de plaquetas, reduciendo en un grupo de pacientes, la incidencia de 14 a 4%, en quienes se utilizó plaquetas leucoreducidas<sup>18</sup>

Desde el punto de vista de la Nefrología, también la alo sensibilización hacia HLA clase I y II, ha resultado un problema en el trasplante renal, proponiendo el uso de Inmunoglobulina intravenosa y terapias inmunosupresoras como el Mofetil Mycofenolato, el sirolimus, alentuzumab y rituximab, además de la inmunoadsorción de proteína A, como medidas terapéuticas, sin lograr hasta el momento demostrar cual es el tratamiento más eficaz en estos casos, solo dando en estudios in Vitro e in vivo una ligera ventaja al uso de inmunoglobulina intravenosa <sup>19</sup>

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Muchas enfermedades hematológicas no oncológicas, tienen clara indicación de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas, incluyendo síndromes de falla medular ya sea de carácter genético o adquirido, hemoglobinopatías, y algunas entidades que alteran la hematopoyesis normal. Este grupo tienen en común los altos requerimientos de soporte transfusional, sobre todo por anemia y trombocitopenia

El Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas de tipo alogénico, es la única posibilidad curativa para este grupo de enfermedades, posibilidad que resulta ensombrecida por el rechazo del injerto secundario a alo sensibilización adquirida durante la evolución del enfermo.

La existencia de anticuerpos anti HLA en el receptor candidato al trasplante hematopoyético puede llevar al fracaso del trasplante además de producir refractariedad a los productos hemáticos transfundidos para el soporte transfusional en el periodo peritransplante, lo anterior puede comprometer la vida del paciente al no lograrse la recuperación de células rojas funcionales y de plaquetas.

## **3. JUSTIFICACIÓN**

Se sabe que pueden existir diversos factores condicionantes para el desarrollo de anticuerpos anti HLA, dentro de los más importantes se encuentran la exposición a múltiples transfusiones sanguíneas, sobre todo en aquellos pacientes con enfermedades hematológicas. En la actualidad se han realizado varios estudios de cortes de pacientes para describir la prevalencia de anticuerpos anti HLA donador específico, sin embargo aun no se cuentan con estudios en población pediátrica. La descripción inicial de la prevalencia de los anticuerpos anti HLA en pacientes en protocolo de trasplante y transfusiones previas permitirá en una segunda etapa establecer la asociación entre su presencia y el rechazo en los pacientes que logren ser trasplantados. Y más adelante la realización de intervenciones terapéuticas con el fin de prevenir el rechazo

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Describir la prevalencia de los anticuerpos anti HLA en pacientes en protocolo de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas con transfusiones previas.

#### **5. HIPÓTESIS**

Los pacientes en protocolo de trasplante de de Células progenitoras hematopoyéticas con transfusiones previas, desarrollaran anticuerpos anti HLA positivos, del panel anti HLA I y II

#### **6. CRITERIOS DE SELECCIÓN**

##### 6.1 Criterios de Inclusión:

Se incluyeron a todos los pacientes en edad pediátrica, que contaban con expediente clínico del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, y que se encontraban en protocolo de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas, con antecedente de haber recibido transfusiones sanguíneas previas

Pacientes con indicación de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas

1. Enfermedades Oncológicas
2. Enfermedades no Oncológicas

##### 6.2 Criterios de exclusión:

Pacientes en protocolo de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, en quien no se documento antecedente de transfusiones de derivados hematopoyéticos, independientemente del grupo sanguíneo al que pertenecieran.

#### **7. METODOLOGIA**

##### **Diseño del estudio**

Se realizó un estudio prospectivo transversal y descriptivo que incluye a pacientes en protocolo de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas del HIMFG en los que se realizó el panel reactivo de anticuerpos en muestras de sangre periférica.

#### **8. VARIABLES**

- Edad: Descrito como el número de años transcurridos desde al nacimiento hasta el momento en el que se realizó el estudio.
- Sexo. Asignado de acuerdo a las características de los genitales externos, referido como femenino o masculino.

- Grupo sanguíneo. Clasificación de la sangre de acuerdo con las características presentes o no en la superficie de los glóbulos rojos y en el suero de la sangre. Las dos clasificaciones más importantes para describir grupos sanguíneos en humanos son los antígenos (el sistema ABO) y el factor Rh. Los cuales fueron determinados en cada paciente mediante la realización de pruebas cruzadas.
- Número de transfusiones previas. Cantidad de paquetes de productos sanguíneos transfundidos, obtenido mediante la revisión de expedientes clínicos y en específico de los comprobantes de transfusión para determinar el número de productos hemáticos transfundidos.
- Tipo de hemoderivados transfundidos. Descrito como tipo de células derivadas de la sangre que se transfundieron a los pacientes.
- Presencia o ausencia de los anticuerpos anti HLA. Se realizó panel de anticuerpos para la determinación de anticuerpos anti HLA tipo 1 y 2. Reportándose como positivos o negativos.

Tamaño de la muestra

Considerando que el indicador anual de la unidad de trasplantes de células progenitoras es de 10 trasplantes por año, se incluyeron en el estudio a 12 pacientes.

## **9. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS**

Se tomaron en ayuno de 6 a 8 horas muestra de sangre periférica en tubo sin anticoagulante con aproximadamente 6 ml.

Se centrifugaron a 2500 RPM por 10 min, y se separó el suero para transferirlo a un tubo de plástico estéril con tapa. Se colocaran los datos del paciente para ser identificado.

Las muestras de sangre periférica fueron tomadas en una sola medición antes del trasplante y de la de la quimioterapia de inducción a la remisión.

### **Proceso de muestras para la obtención de los anticuerpos Anti HLA**

Equipo de medición: Analizador de flujo LABScan™ 100 con plataforma Luminex® XY (accesorio opcional para la lectura automatizada de 96 muestras en el analizador de flujo LABScan™ 100)

Centrifuga

Rotor para tubos de microfuga de 1,5 ml (9.300 g) o un rotor de cubeta de oscilación para una microplaca de 96 pocillos

(1.300 g)

Mezclador vórtex

Agitador de placas o plataforma rotatoria

Si se utilizo una bandeja para filtración:

Múltiple de vacío Millipore (Nº de catálogo Millipore MAVM0960R o equivalente)

Bandeja para la filtración Millipore (Multiscreen-BV, Nº de catálogo Millipore MABVN1210 o equivalente)

Bomba de vacío con una presión inferior a 100 mmHg

Agitador de placas o plataforma rotatoria

B. Calibración del instrumento

C. Software recomendado plataforma luminex

HLA Fusion® (OLI Cat. Nº FUSPGR)

#### EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se tomaron 3 mL de sangre en un tubo de tapón rojo, centrifugando a 4500 revoluciones por minuto

LS-LSCN-PI-ES-00, Rev. 16 Página 3 de 10

Si la prueba se realiza en una placade 96 pocillos:

UNIPLATE, 96 pocillos, microplaca de 250  I (Whatman Nº 77042250) o equivalente (superficie no tratada)

Cierre para bandeja (Nº de catálogo OLI SSPSEA300)

Suero de control negativo (Nº de catálogo OLI LSNC o equivalente – no contiene anticuerpos frente al HLA cuando se analizó con el Método LABScreen®).

Si se utiliza una bandeja para filtración:

Bandeja para la filtración Millipore (Multiscreen-BV, Nº de catálogo Millipore MABVN1210 o equivalente)

C. Procedimiento detallado

Véase el apartado “Instrucciones de uso” a continuación.

#### INSTRUCCIONES DE ANALISIS:

1) Encienda el instrumento LABScan™ 100 al menos 30 minutos antes de iniciar el ensayo.

2) Cree un nombre de archivo y una hoja de códigos de muestra para cada bandeja de prueba.

A. Para completar la prueba en un tubo de microfuga de 1,5 ml:

Nota: véase el apartado B más abajo para obtener instrucciones si se usa la placa de 96 pocillos.

1. Las bolas LABScreen® se deben mezclar bien agitando suavemente en un vórtex o pipeteando hacia arriba y abajo varias veces antes del uso.
2. Incubar en la oscuridad 5 µl de bolas LABScreen® con 20 µl del suero en estudio en tubos de microfuga de 1,5 ml diferentes durante 30 minutos a 20 – 25 °C con agitación suave.
3. En cada lote de pruebas, debe analizarse un suero de control negativo (Nº de catálogo OLI LS-NC o equivalente) para establecer los valores de fondo.
4. Diluir el tampón de lavado 10X (Nº de catálogo LSPWABUF) en agua destilada para obtener una solución 1X.
5. Añadir 1 ml de tampón de lavado 1X a cada tubo con la solución de bolas o suero y agitar en el vórtex. Centrifugar a 9.300 g durante 2 minutos. Aspirar y desechar el sobrenadante.
6. Repetir el paso 5 dos veces.
7. Diluir 1 µl por prueba de anti-IgG humana conjugada con PE 100X (Nº de catálogo LS-AB2) con 99 µl de tampón de lavado 1X para obtener una solución 1X.
8. Añadir 100 µl de anti-IgG humana conjugada con PE 1X a cada tubo. Agitar en el vórtex e incubar en la oscuridad durante 30 minutos a 20–25 °C con agitación suave.
9. Repetir el paso 5 dos veces.
10. Añadir 80 µl de tampón PBS a cada tubo. La muestra está lista para adquirir y analizar los datos o se puede almacenar a 2– 5 °C en la oscuridad hasta 24 horas antes del análisis.

B. Para completar la prueba en una placa de 96 pocillos:

Precaución: el cierre de la bandeja de 96 pocillos se debe realizar con cuidado y completamente para evitar la contaminación de las muestras entre pocillos. Cerrar la bandeja presionando el cierre contra cada uno de los bordes de los 96 pocillos. No volver a utilizar los cierres para bandejas. Utilizar un cierre nuevo en cada paso que requiera la aplicación de un cierre para bandeja.

1. Las bolas LABScreen® se deben mezclar bien agitando suavemente en un vórtex o pipeteando hacia arriba y abajo varias veces antes del uso.
2. Incubar en la oscuridad 5 µl de bolas LABScreen® con 20 µl del suero en estudio en cada pocillo de una placa de 96 pocillos durante 30 minutos a 20 – 25 °C con agitación suave.
3. En cada lote de pruebas, debe analizarse un suero de control negativo (Nº de catálogo OLI LS-NC o equivalente) para establecer los valores de fondo.

4. Diluir tampón de lavado 10X (Nº de catálogo LSPWABUF) en agua destilada para obtener una solución de lavado 1X.
5. Después de la incubación, añadir 150  $\mu$ l de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubrir con cierre para bandeja (Nº de catálogo OLI SSPSEA300) y agitar en un vórtex. Centrifugar a 1.300 g durante 5 minutos.
6. Retirar el tampón de lavado de los pocillos de la placa agitando las bandejas o mediante aspiración por vacío.
7. Añadir 200  $\mu$ l de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubrir la bandeja con un cierre nuevo y agitar en un vórtex. Centrifugar a 1.300 g durante 5 minutos.
8. Retirar el tampón de lavado de los pocillos de la placa agitando las bandejas o mediante aspiración por vacío.
9. Repetir los pasos 7 y 8.

#### ANÁLISIS DE DATOS:

1. La reactividad de cada suero se puede evaluar mediante la señal fluorescente para cada bola recubierta con HLA después de corregir la unión no específica a la bola del control negativo (NC) (Nº 001). Todos los datos se normalizan de acuerdo con los resultados obtenidos mediante el suero de control negativo (Nº de catálogo OLI LS-NC).
2. La reactividad de una muestra en estudio se calcula a partir de los valores de fluorescencia , que se pueden obtener del archivo .csv.

**TABLA DE DATOS GENERALES Y RESULTADOS**

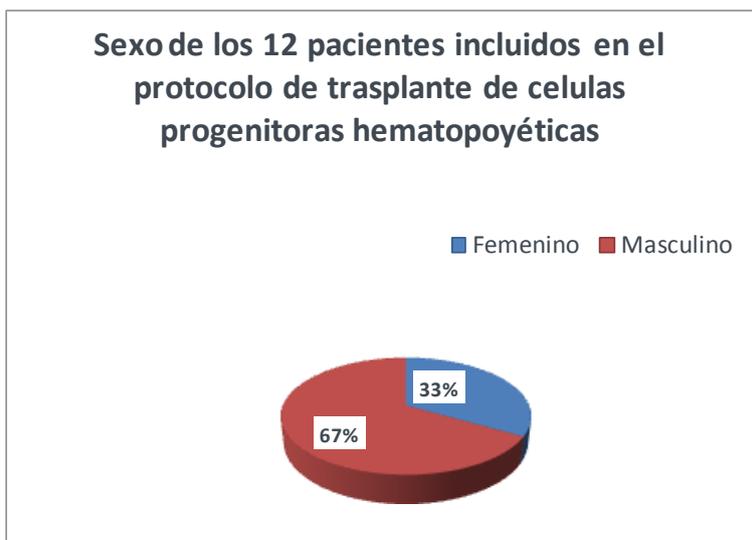
EDAD	SEXO	DIAGNOSTICO	FASE TRATAMIENTO	Gupo sang.	C. ERITROC.	PLAQUETAS	Transfusiones			Resultados	
							PLASMA	FRESCO	LEUCORE D.	total de transf.	AC Anti HLAclase 1
1	13a	masc	LLA L1 alto riesgo por celularidad T	O+	13	11	1	0	25	neg	neg
2	7 años	fem	LLA L2 alto riesgo por falta de citogenética y monoclonales	O+	18	30	0	0	48	neg	neg
3	18 años	masc	LMA M2	A +	2	2	0	0	4	neg	neg
4	16 años	masc	LMA M1 coexpresion CD3	O+	22	43	0	0	65	neg	neg
5	16 años	masc	Anemia Aplasica grave	O+	11	6	0	2	19	neg	neg
6	7 años	fem	LLA L2	O+	2	0	0	0	2	neg	neg
7	8 años	masc	LLA L2	O +	11	2	0	0	13	neg	neg
8	8 años	masc	LLA L1 alto riesgo por hiperleucocitosis	B +	13	1	1	0	15	neg	neg
9	17 años	fem	LLA L2 alto riesgo por edad e hiperleucocitosis	O +	21	6	0	0	27	neg	neg
10	13 años	fem	LLA L1 alto riesgo por edad cromosoma fildelfia	A+	6	7	0	0	13	neg	neg
11	11 años	masc	LLA	O+	7	5	2	7	21	pos 36%	neg
12	12 años	masc	LLA	A+	6	0	0	0	6	neg	neg

## 10. RESULTADOS

Se obtuvieron muestras de 12 pacientes pediátricos con transfusiones previas que se encontraban en protocolo de trasplante de médula ósea al momento del estudio.

La edad de los pacientes estudiados osciló entre los 7 y 18 años, con un promedio de 12.5 años.

En cuanto al sexo 8 pacientes correspondieron al sexo masculino y 4 al sexo femenino.

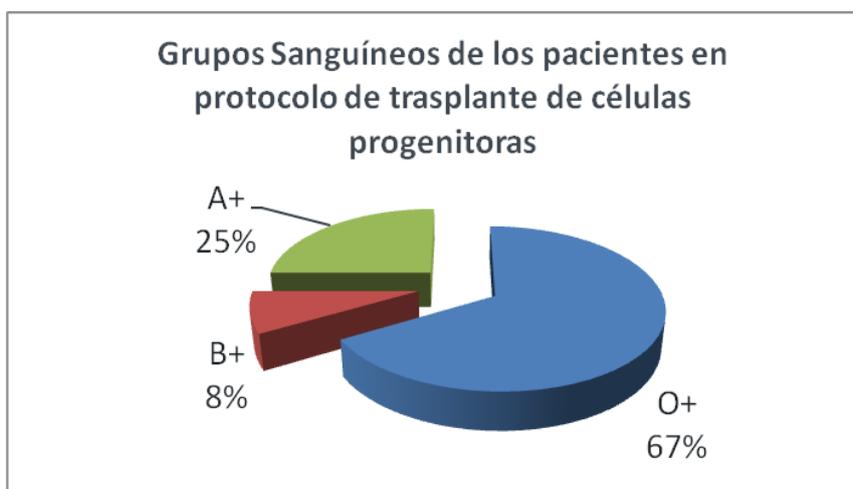
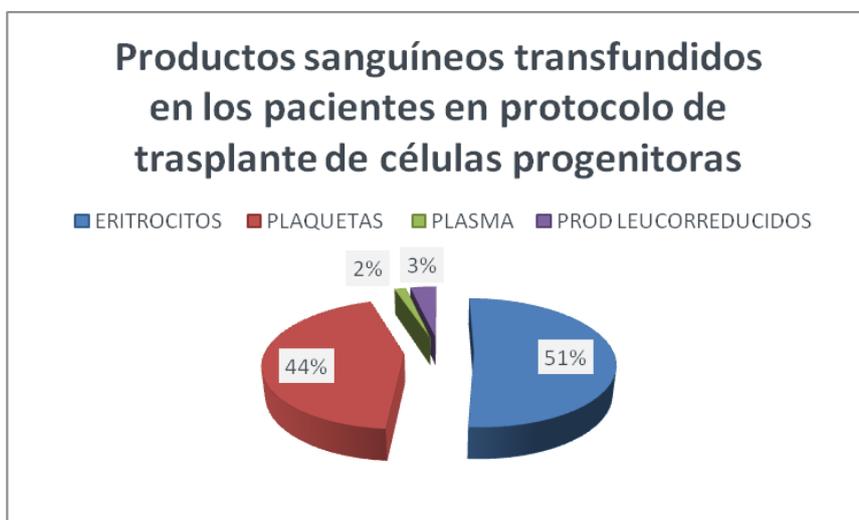


Los diagnósticos de los pacientes evaluados incluyen proceso neoplásicos y no neoplásicos. De los no neoplásicos se incluyó un paciente con Anemia aplásica, el resto, en total 11 pacientes corresponden a Leucemias linfoblásticas Agudas de alto riesgo o con mala respuesta a la quimioterapia convencional, presentando recaídas. Se incluyó a un paciente al que posterior a la detección de anticuerpos anti HLA se realizó trasplante de médula ósea.



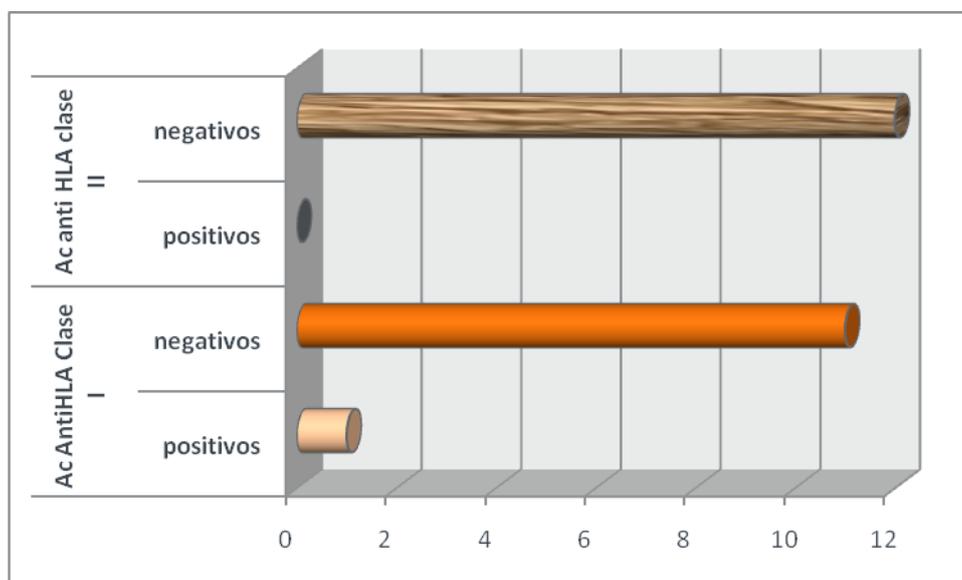
Como variable también se considero el número de transfusiones previas cuantificadas con base en los antecedentes encontrados en el expediente clínico. El número del total de transfusiones por paciente oscilaron entre las 4 y 68, con un promedio de 36 transfusiones.

Otro dato a considerar es el tipo de productos sanguíneos transfundidos, Dentro de las indicaciones más frecuentes para la transfusión en los pacientes oncológicos se encuentran la anemia y la trombocitopenia. De un total de un total de 258 transfusiones registradas, 132 correspondieron a concentrados eritrocitarios, 113 a concentrados plaquetarios, 4 a plasma fresco congelado, y en un solo paciente se administró productos leucoreducidos.



En los resultado finales se encontró que uno de los 12 pacientes estudiados resulto positivo para anticuerpos anti HLA tipo 1 el resto de los pacientes fueron no reactivos para dichos anticuerpos.

RESULTADOS			
Ac AntiHLA Clase I		Ac anti HLA clase II	
positivos	negativos	positivos	negativos
1	11	0	12



## 11. ANALISIS DE DATOS Y DISCUSION

Se obtuvo la Razón de Prevalencias por RR.

$$RR = \frac{\text{total de la población estudiada}}{\text{No. De casos positivos}}$$

$$\text{Razón de prevalencia} = \frac{\text{No de casos (12)}}{\text{No de casos positivos (1)}} = 12$$

Expresado como porcentaje se encontró 1 paciente reactivo para anticuerpos anti HLA tipo I correspondiente al 8.3% de los casos.

## DISCUSION

En nuestra Institución el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas es una opción para los pacientes con enfermedades hematológicas de origen maligno sobre todo las leucemias y siendo un centro de referencia a nivel central, en nuestro país se encuentran en seguimiento los casos con mala respuesta a los esquemas de quimioterapia convencional, o que en su defecto son consideradas desde el diagnóstico como de alto riesgo para recaídas. Recién se puso en marcha el programa de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas cargo del departamento de Oncología, colocando al Hospital Infantil de México como uno de los principales centros para la atención del niño con cáncer.

El objetivo de este estudio fue describir la prevalencia de los anticuerpos anti HLA donador específico en pacientes en protocolo de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, que habían recibido transfusiones previas. De las 12 muestras analizadas, se obtuvo una prevalencia del 8.3%, correspondientes a anticuerpos anti HLA tipo I. En el último año se han realizado 2 series de casos reportando diferentes prevalencias. En el 2011 Marie Detrait, et al en la Universidad de Lyon, Francia realizaron un estudio de prevalencia del 2005 al 2010 con un total de 107 pacientes adultos con diagnósticos de enfermedades hematológicas malignas, predominando los diagnósticos de Leucemia Mieloide y Mieloma Múltiple, se encontró una prevalencia del 22% de anticuerpos anti HLA (total de 24 pacientes), de los cuales el 67.5% correspondieron a HLA tipo I, 12.5% a HLA II y 20% positivos para ambos tipos.

Otro estudio publicado en 2011 por Ciurea Et al se realizo en la universidad de Texas un protocolo que incluyo un total de 592 pacientes adultos en los que previo a la realización del trasplante y de la quimioterapia mieloablativa se detectaron mediante citometría de flujo la presencia de anticuerpos anti HLA del total de los paciente 116 fueron positivos, correspondiente al 19% de los casos. Sin bien las prevalencias en los estudios antes mencionados, con respecto a lo encontrado en nuestro reporte, son bastante variables, estas se asocian al número de muestras obtenidas en cada protocolo. Es cierto que hasta el momento una limitante de este estudio es el numero de muestras analizadas, sin embargo esto abre un panorama para continuar con la determinación de los anticuerpos en todos aquellos pacientes que se encuentran en protocolos de trasplante de células progenitoras, sobre todo porque en la actualidad no se cuentan con series de casos que determinen la prevalencia de anticuerpos anti HLA de pacientes en edad, pediátrica.

Hasta el momento también se desconoce con exactitud, cuales son las condicionantes inmunológicas para el desarrollo de anticuerpos anti HLA donador específicos, en el estudio que se realizó en Texas se asoció de manera estadísticamente significativa un incremento en la prevalencia en mujeres que tenían antecedente de embarazos, sin embargo, esta condición no es aplicable en el campo de la pediatría. De acuerdo a lo escrito en el marco teórico se espera que para la población pediátrica las transfusiones sanguíneas sean una condicionante para el desarrollo de anticuerpos, por lo tanto en una segunda etapa se deberá de determinar esta asociación.

Por otra parte la presencia de anticuerpos anti HLA se ha asociado a una mayor incidencia en el rechazo del trasplante condicionando así la pérdida del injerto, actualmente hay quienes recomiendan la determinación de anticuerpos de manera rutinaria con el fin de conocer a los pacientes que están en riesgo y poder ofrecer una opción terapéutica, sin embargo aun la relación de costos y riesgo beneficio no esa determinada, tanto como en adultos como en edad pediátrica es por esto que el inicio de este estudio abre las posibilidades hacia un campo amplio de investigación en este sentido

## **12. Conclusiones**

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas es en la actualidad una opción terapéutica para enfermedades hematológicas, tanto neoplásicas como no neoplásicas. Sin embargo una de las principales complicaciones que limitan importantemente su efectividad es el rechazo. A esto se han relacionado múltiples factores de riesgo, entre ellos la presencia de anticuerpos anti HLA donador específico. En el trasplante de órganos sólidos se encuentra bien documentado que su presencia es un factor importante para la presencia del rechazo, sin embargo en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas y sobre todo en población pediátrica, no se cuentan con estudios contundentes. En este estudio se planteó que la presencia de transfusiones sanguíneas puede ser un factor que promueve la formación de anticuerpos anti HLA donador específico, por lo que conocer su prevalencia es el paso inicial para determinar su impacto. Se encontró una prevalencia general correspondiente al 8% de los pacientes que se encontraban en protocolo de trasplante de células progenitoras, sin embargo lo pacientes incluidos tenían una gran variación entre el número de transfusiones oscilando entre 4 y más de 60, por lo que esto podría ser una condicionante para el desarrollo de dichos anticuerpos, aunque en la muestra se incluyeron solo 12 pacientes la prevalencia de

anticuerpos anti HLA, no se encuentra dentro de números despreciables, esto da pauta a que en una segunda etapa se aumente el tamaño de la muestra y posteriormente se realicen estudios de asociación de la presencia o ausencia de anticuerpos Anti HLA con transfusiones, así como su relación con la supervivencia del injerto o el rechazo.

### **Limitantes del estudio**

Se tiene como principal limitante el tamaño de la muestra por el número de pacientes incluidos en el protocolo, además como se menciono previamente se encontró una gran variación con la cantidad de transfusiones y el tipo de derivados sanguíneos que recibió cada paciente estudiado, no pudiéndose determinar la manera en que estas variables pueden influir en el desarrollo de anticuerpos anti HLA. Así también se encuentra limitada la aplicación a otras poblaciones pediátricas ya que en este estudio solo se incluyó a población mexicana.

### **Consideraciones Éticas**

Este estudio se efectuó de acuerdo a la Declaración de Helsinki del año 2000 y al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación.

La información proporcionada por el paciente y sus familiares será de manejo exclusivo de los investigadores y se mantendrá en reserva en el expediente clínico y formatos de recolección de datos del estudio.

En el estudio sólo participaron los pacientes que otorgaron su consentimiento informado por escrito; los pacientes o sus familiares conservaron copia del mismo y se mantuvo la disponibilidad por parte de los investigadores para atender sus dudas o preguntas en el momento que así lo solicitaron.

### 13. Referencias

---

- <sup>1</sup> Thomas ED. Hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Am* 1995; 272:38-47.
- <sup>2</sup> Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Ann Intern Med* 1939;13:357-67.
- <sup>3</sup> L Congreso Nacional de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología; *Revista Mexicana de Hematología*; volumen 10, suplemento 3: abril 2009
- <sup>4</sup> García-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 2003; 195(3): 346-55.
- <sup>5</sup> Kozma L, Bohaty I. HLA class I antibody screening and typing in the sera of dialyzed patients with CDC and ELISA techniques: association with graft survival. *Orv Hetil* 2007;148(12): 553-8.
- <sup>6</sup> Terasaki P, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2004; 4(3), 438-43.
- <sup>7</sup> Toledo Nelson, Tiscornia Adriana, Bengochea Milka, Carretto Elena, Silva Eli, Cabrera Cabrera, Abilleira Doris, Sosa Martha, Alvarez Inés  
Monitoreo de anticuerpos HLA en insuficientes renales crónicos en lista de espera uruguaya para trasplante renal 2005, *Rev Med Uruguay* 2008; 24: 15-23
- <sup>8</sup> Zinkernagel R, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Kunding T, Hengartner H. Antigen localization regulates immune responses in a dose and time dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev.* 1997; 156:199-209.
- <sup>9</sup> Lawrence H. Homograft sensitivity: an expression of the immunologic origins and consequence of individuality. *Physiol Rev.* 1959; 39: 811-59.
- <sup>10</sup> Kunding T, Bachmann M, Oehen S et al. On the role of antigen in maintaining cytotoxic T cell memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9716-23.
- <sup>11</sup> Starzl T, Zinkernagel R. Antigen localization and migration in immunity and tolerance. *The new England Journal of Medicine.* 1998; 339:1905-12.
- <sup>12</sup> Bacigalupo A, Locatelli F, Lanino E, Marsh J, Socié G, Maury S, Prete A, Locasciulli A, Cesaro S, Passweg J. Fludarabine, cyclophosphamide and anti-thymocyte globulin for alternative donor transplants in acquired severe aplastic anemia: a report from the EBMT-SAA Working Party. *Bone Marrow Transplant* 36: 947-50

---

<sup>13</sup> Taylor P, Ehrhardt M, Roforth M, Swedinn J, Panoskaltis A, Serody J, Blazar B. Preformed antibody, not primed T cells, is the initial and major barrier to bone marrow engraftment in allosensitized recipients. *Transplantation* 2007; 109: 1307-15.

<sup>14</sup> Laundry G, Bradley B, Rees B, Younie M, Hows J. Incidence and specificity of HLA antibodies in multitransfused patients with acquired aplastic anemia. *Transfusion* 2004; 44:814-25

<sup>15</sup> Xu L, Fang J, Huang W, Xu H, Weng W, Kao G, Le Y Marrow graft rejection by repeated transfusions of allogenic donor spleen cells. *Bone Marrow Transplantation* 2007; 40:691-98.

<sup>16</sup> Lapiere V, Auperin A, Tayebi H, Chabod J, Saas P, Michalet M, Francois S, Garban F, Giraud C, Tramalloni D, Oubouzar N, Blaise D, Kuentz M, Robinet E. Increased presence of anti-HLA antibodies early after allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation compared with bone marrow transplantation. *Transplantation* 2002;100:1484-89.

<sup>17</sup> Kirsh L, Timmermans T, Van O, Gurne O, Noirhomme P, Jacquet L, Latinne D, Poncelet A. Allosensitization in bridge to transplant Novacor left ventricular assist device patients: analysis of long-term outcomes with regard to acute rejection and chronic allograft vasculopathy. *European J. of Cardio-thoracic Surgery* 2008; 34:268-74

<sup>18</sup> Seftel M, Grawe G, Petraszko T, Benny B, Lee A, Spinelli J, Sutherland H, Tsang P, Hogge D. Universal prestorage leucoreduction in Canada decreases platelet alloimmunization and refractoriness. *Blood* 2004; 103:333-39.

<sup>19</sup> Jordan S, Pezcovitz M. Presentization: The Problem and Its Management. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1:421-32.

<sup>20</sup>.- Ciurea Et al , Donor-specific anti-hla abs and graft failure in matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation  
*Blood*, 24 November 2011 volume 118, number 22 5957

<sup>21</sup>.- Daniele Focosi, Alessandra Zucca, Fabrizio Scatena. The role of anti-hla antibodies in hematopoietic stem cell transplantation *Biol Blood Marrow Transplant* 17: 1585-1588 (2011) \_ 2011 American Society for Blood and Marrow Transplantation

<sup>22</sup>.- Marie Detrait, et al The impact of the anti hla antibodies on allogeneic hematopoietic stem cells transplantation outcomes after reduced intensity conditioning regimens *Experimental Hematology* junio 2012.