



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD BIOQUÍMICA CLÍNICA

Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico (ADE) y su
asociación con la falla del injerto en pacientes trasplantados con células
progenitoras hematopoyéticas en el HIMFG

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD
BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA:

QFB. MARI CARMEN MORÁN ESPINOSA

Directora de Tesis:

Dra. En C. Irlanda Olvera Gómez

Hospital Nacional Homeopático

Ciudad Universitaria, CD.MX, Septiembre 2019



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.

Indice.

1.0 Introducción	8
1.1 Fuentes de obtención de células progenitoras hematopoyéticas	8
1.2 Falla del injerto	10
1.3 Falla primaria del injerto	12
1.4 Rechazo del injerto	13
1.4.1 Anticuerpos anti-HLA donador específico	14
1.5 Disminución de la función del injerto	15
1.6 Falla secundaria del injerto	16
1.7 Infecciones virales post-trasplante, una complicación del TCPH	16
2.0 Planteamiento del problema	18
3.0 Justificación	18
4.0 Hipótesis	18
5.0 Objetivo general	18
6.0 Objetivos específicos	19
7.0 Materiales y métodos	20
7.1 Diseño del estudio	20
7.2 Tamaño de muestra	20
7.3 Recolección de muestras biológicas	21
7.4 Determinación de anticuerpos anti-HLA donador específico	21
7.5 Tipificación de HLA	22
7.6 Cuantificación de quimerismo	22
7.7 Biometría hemática	23
7.8 Diagnóstico de infección y cargas virales	23
7.9 Análisis estadístico	23
8.0 Resultados	24
8.1 Evaluación de receptores pre-trasplante	24
8.2 Evaluación post-trasplante	32
9.0 Discusión	47
10.0 Conclusiones	52
11.0 Perspectivas	52
12.0 Referencias	53
13.0 Anexos	58
13.1 Consentimiento informado	58
13.2 Carta de comité de ética	62

Índice de gráficos.

Gráfico 1. Distribución de género	24
Gráfico 2. Distribución de edades	24
Gráfico 3. Diagnóstico de los receptores	25
Gráfico 4. Anticuerpos anti-HLA específicos contra el donador (ADE) ..	26
Gráfico 5. Especificidades de anticuerpos que reconocen moléculas HLA clase I del donador	27
Gráfico 6. Especificidades de anticuerpos que reconocen moléculas HLA clase II del donador	27
Gráfico 7. Especificidades de anticuerpos anti-HLA clase I	28
Gráfico 8. Especificidades de anticuerpos anti-HLA clase II	28
Gráfico 9. Anticuerpos anti-HLA en enfermedades hematológicas benignas y malignas	29
Gráfico 10. Anticuerpos anti-HLA y falla primaria del injerto.....	30
Gráfico 11. Infecciones virales en receptores en el primer mes post-trasplante.....	31
Gráfico 12. Número de transfusiones de componentes sanguíneos.....	33
Gráfico 13. Anticuerpos anti-HLA donador específico post-trasplante....	35
Gráfico 14. Porcentaje PRA-Single Antigen clase I post-trasplante.....	36
Gráfico 15. Porcentaje PRA-Single Antigen clase II post-trasplante.....	37
Gráfico 16. Falla secundaria del injerto y ADE.....	39
Gráfico 17. Falla secundaria del injerto y anticuerpos anti-HLA.....	40
Gráfico 18. Infecciones virales post-trasplante.....	41
Gráfico 19. Reconstitución de neutrófilos posterior al TCPH.....	42
Gráfico 20. Número absoluto de neutrófilos al cuarto mes.....	43
Gráfico 21. Sobrevida de receptores con ADE y TCPH.....	45
Gráfico 22. Sobrevida de receptores con anticuerpos anti-HLA y TCPH..	46

Indice de figuras.

Figura 1. Etiología de la falla primaria del injerto	10
Figura 2. Rechazo del injerto	14
Figura 3. Disminución de la función del injerto	15

Indice de tablas.

Tabla1. Factores de riesgo que influyen en la implantación del injerto ..	11
Tabla2. Características de la falla del injerto	12
Tabla 3. Componentes sanguíneos transfundidos post-trasplante	33

Abreviaturas

ADE	ANTICUERPOS ANTI-HLA DONADOR ESPECÍFICO
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMEL	Amelogenina
CMV	Citomegalovirus
CPH	Células progenitoras hematopoyéticas
EICH	Enfermedad de injerto contra huésped
FEC-G	Factor estimulante de colonias de granulocitos
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez
HLA	Human Leuckocyte Antigen, Antígeno Leucocitario Humano
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
INF-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
KG	Kilogramo
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MG	Miligramos
MO	Médula ósea
NK	Natural killer
PRA	Panel de reactivo de anticuerpos
T	Translocación cromosómica
TCPH	Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas
FNT-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEB	Virus Epstein barr

Resumen.

Los anticuerpos anti-HLA (*Human Leukocyte Antigen: Antígeno Leucocitario humano*) donador específico (ADE) en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) están asociados a la falla del injerto: *rechazo del injerto o disminución de la función del injerto*.

En el 100% (18/18) de los receptores se detectaron anticuerpos anti-HLA 7 días previos al trasplante. En el 72% (13/18) se detectaron anticuerpos anti-HLA no relacionados con el donador. De los cuales el 31% eran específicos contra moléculas de HLA clase I; el 15% contra HLA clase II y el 54% contra ambas clases. El 20% (3/13) de estos receptores presentaron rechazo del injerto y el 80% (10/13) presentó disminución en la función del injerto.

En el 28% (5/18) de los receptores se detectaron ADE con especificidades contra moléculas del HLA clase I en el 20% (1/5); 40% contra HLA clase II (2/5) y 40% para ambas moléculas de HLA (2/5). El 40% (2/5) de los receptores con ADE presentaron rechazo del injerto, y el 60% (3/5) una disminución de la función del injerto.

Dentro del primer mes, el 47% (8/18) fueron diagnosticados con infecciones virales agudas por (Citomegalovirus, Epstein barr y BK). El 67% de los receptores con infección viral resultó ser por el poliomavirus BK en el primer mes post-trasplante. Se observó que las cargas virales detectadas disminuían a partir del cuarto mes post-trasplante.

Se realizó el monitoreo de los anticuerpos anti-HLA de manera post-trasplante por conveniencia (desde el día 1 hasta el día 600), en el cual, el número de especificidades detectadas de manera pre-trasplante disminuyeron debido al tratamiento inmunosupresor por lo que no se pudo analizar su asociación con una falla secundaria del injerto.

Se observó que la presencia de anticuerpos anti-HLA clase I y en conjunto con anticuerpos que reconocen moléculas de HLA clase II de manera pre-trasplante es de mal pronóstico para la supervivencia de los receptores con TCPH.

Abstract.

Donor specific anti-HLA antibodies (DSA) in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) are associated with graft failure: *graft rejection or poor graft function*.

Anti-HLA antibodies were detected in 100% (18/18) of recipients 7 days before transplantation. In 72% (13/18) were detected anti-HLA antibodies not related to the donor. Of which 31% were specific against HLA class I molecules; 15% against HLA class II and 54% against both classes. 20% (3/13) of these recipients presented graft rejection and 80% (10/13) presented poor graft function.

In 28% (5/18) of the receptors were detected DSA; in 20% (1/5) of recipients had DSA against HLA class I molecules; 40% (2/5) against HLA class II and 40% (2/5) for both HLA molecules. 40% (2/5) of the recipients with DSA presented graft rejection, and 60% (3/5) poor graft function.

Within the first month, 47% (8/18) were diagnosed with acute viral infections by (Cytomegalovirus, Epstein barr and BK). 67% of recipients had viral infection in the first month post-transplant. It was observed that the viral loads decreased from the fourth month after transplantation.

Anti-HLA antibodies were monitored in a post-transplant manner for convenience (from day 1 to day 600), in which the number of specificities detected in a pre-transplant manner decreased due to immunosuppressive treatment and therefore, it is an association with a secondary graft failure could be analyzed.

We observed that the presence of anti-HLA class I antibodies and in conjunction with antibodies that recognize HLA class II molecules in a pre-transplant manner is of poor prognosis for the survival of recipients with HSCT

1.0 Introducción.

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) es un recurso terapéutico de gran utilidad para pacientes pediátricos con diversos padecimientos hematológicos benignos (anemia aplásica grave, anemia drepanocítica, osteopetrosis) y malignos (leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia granulocítica crónica y linfomas) que no son remitidos con el uso de otros tratamientos (corticoesteroides, andrógenos, inmunoglobulina anti-timocito, quimioterapia e inmunoterapia) que en su uso individual o en combinación pueden eliminar la enfermedad (1).

En este contexto, el objetivo del TCPH es sustituir la hematopoyesis del paciente ya sea por presentar defectos que impiden alcanzar la homeostasis de las células sanguíneas, o bien, por presencia de células neoplásicas.

1.1 Fuentes de obtención de células progenitoras hematopoyéticas.

1.1.1 Médula ósea (MO)

Las CPH (CD34+) de la MO se obtienen mediante múltiples punciones en ambas crestas ilíacas posteriores de un donador. El volumen aspirado de MO se encuentra en un rango de 10 a 20 mL por kilogramo (Kg) de peso del donador o receptor, dependiendo quien tenga una menor edad. La dosis de CPH recomendada para administrarse es de 2.5×10^8 de células nucleadas por Kg de peso del receptor (2). La MO obtenida puede ser administrada inmediatamente al receptor por vía intravenosa o criopreservada para su uso posterior.

1.1.2 Sangre periférica movilizada

Las CPH residen en la fracción mononuclear en sangre periférica, en una concentración de 0.1% (3). El uso de factores de crecimiento (*FEC-G*, *Factor Estimulante de colonias de granulocitos*) incrementa del 1 al 10% el número de progenitores hematopoyéticos en el torrente sanguíneo. La recolección de células mononucleares de sangre periférica se realiza por procedimientos de aféresis. Una

dosis mínima de $2-3 \times 10^6$ células CD34+ por Kg de peso del receptor se considera adecuada (4).

Las CPH obtenidas de sangre periférica movilizada ofrecen ventajas sobre las de MO que incluyen una rápida recolección, no requiere de anestesia general y es un procedimiento ambulatorio lo que favorece su uso para el TCPH.

1.1.3 Cordón umbilical (CU).

La sangre de CU, ya sea *in útero* o *ex útero* es recolectada mediante una punción en cualquiera de los tres vasos del cordón umbilical. El volumen obtenido de sangre, la cuenta total de células nucleadas y el total de células CD34+ es mayor empleando el método de recolección *ex útero*; sin embargo, las unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos se encuentran en mayor número cuando se utiliza el método *in útero*. La dosis administrada de células nucleadas recomendada es de 3.9×10^7 de acuerdo al Eurocord Experience (1).

1.2 Falla del injerto.

La falla del injerto se define como la ausencia de las células del donador (*falla primaria del injerto*) en los primeros 28 días después del TCPH, o la pérdida de las células del donador después de la implantación del injerto inicial, (*falla secundaria del injerto*) posterior a los primeros 28 días del TCPH (5). La etiología de la falla del injerto es multifactorial en la mayoría de los casos (Figura 1).

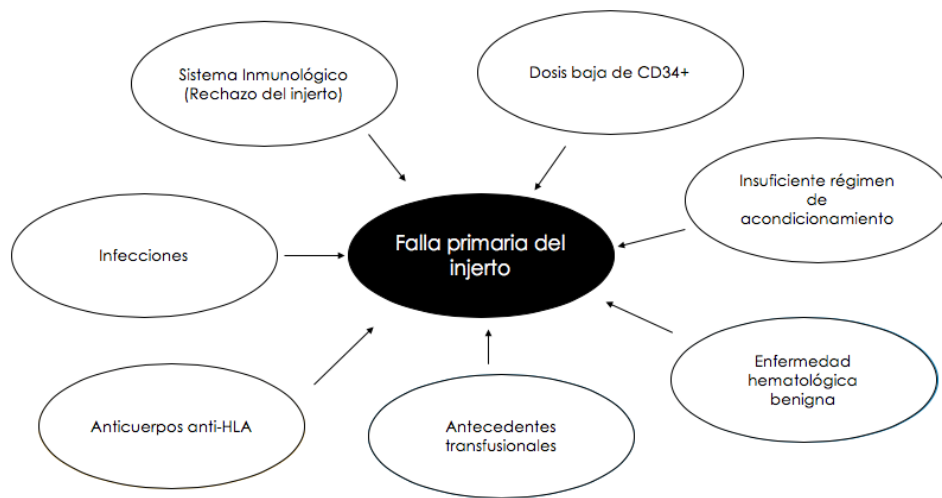


Figura 1. Etiología de la falla primaria del injerto, Imagen modificada de (6).

Existen factores de riesgo que influyen en la implantación del injerto los cuales se puedan monitorear antes y después del TCPH (Tabla 1) .

Tabla 1. Factores de riesgo que influyen en la implantación del injerto.

Pre-trasplante		Post-trasplante
Difíciles de modificar	Fáciles de modificar	
<ul style="list-style-type: none"> • Incompatibilidad en HLA. • Enfermedades hematológicas benignas. • Múltiples transfusiones. • Fibrosis medular extensa. • Edad del donador. • Esplenomegalia. • Presencia de Anticuerpos anti-HLA. • Número de CPH (CD34+). 	<ul style="list-style-type: none"> • Fuente de CPH • Régimen de acondicionamiento. • Depleción de linfocitos T. • Presencia de Anticuerpos anti-HLA. 	<ul style="list-style-type: none"> • Infecciones virales. • Enfermedad de injerto contra huésped (EICH). • Toxicidad a fármacos.

Abreviaturas: HLA: Human Leukocyte Antigen: Antígeno Leucocitario Humano, Tabla modificada (6).

La presencia de varios de estos factores de riesgo conlleva a la falla del injerto y/o la recaída, siendo las principales complicaciones del TCPH.

1.3 Falla primaria del injerto.

La falla primaria del injerto incluye: el *rechazo del injerto* que se define como la incapacidad de reconstitución de neutrófilos (número absoluto de neutrófilos $\leq 0.5 \times 10^9 /L$) durante tres días consecutivos dentro de los primeros 28 días después del TCPH con ausencia de hematopoyesis del donador (porcentaje de quimerismo menor a 95%).

Además del rechazo del injerto, se presenta la *disminución de la función del injerto* que se define como la incapacidad de obtener dos o tres recuentos sanguíneos adecuados: número absoluto de neutrófilos $\leq 0.5 \times 10^9 /L$, plaquetas $\leq 20 \times 10^9 /L$ y/o hemoglobina (Hb) $\leq 80 g / L$ después de 28 días del TCPH por dos semanas consecutivas en presencia de hematopoyesis completa del donador (porcentaje de quimerismo 100%) en ausencia de enfermedad de injerto contra huésped grave o recaída (7,8) (Tabla 2).

Tabla 2. Características de la falla del injerto. Tabla modificada (9).

		Implantación del injerto inicial del donador	Recuperación hematológica inicial	Citopenias	Médula ósea	Recaída	Quimerismo
Rechazo del injerto	Primario	No	No	Sí	Hipocelular	No	Mixto o completo del receptor
	Secundario	Sí	Sí	-	-	-	
Disminución de la función del injerto	Primaria	Sí	No	Sí	Hipocelular	No	Quimerismo completo del donador
	Secundaria	Sí	Sí	-	-	-	

1.4 Rechazo del injerto.

El rechazo del injerto (Figura 3) se produce por una respuesta inmune aloreactiva mediada por la inmunidad residual del receptor (posterior al régimen de acondicionamiento quimioterapia mieloablativa o de intensidad reducida), los linfocitos T CD8+ residuales del receptor son considerados potenciales células efectoras que median el rechazo del injerto (11).

Este tipo de rechazo puede ocurrir tanto en trasplantes alogénico HLA compatible como en trasplantes con incompatibilidad en este sistema (12).

Las células NK (*Natural Killer, células asesinas naturales*) del receptor también pueden eliminar las CPH del donador como se demostró en estudios utilizando modelos animales (13). El rechazo del injerto mediado por células NK observado principalmente en los trasplantes con incompatibilidades en el sistema HLA es el resultado de una ausencia de reconocimiento de lo propio (14,15) activando el mecanismo de citotoxicidad mediada por granzima y perforina(16,17)

Los linfocitos T y las células NK del donador pueden facilitar la implantación de las CPH (18) debido a que los linfocitos T reguladores con fenotipo CD4+ CD25+, células T CD8+, células T gamma delta ($\gamma\delta$), células TCD8 supresoras, células CD3+ CD4- CD8-, células NK, o células NKT participan en mecanismos de tolerancia demostrados en modelos animales (19).

Los mecanismos de tolerancia de las células NKT es mediante la secreción de citocinas antiinflamatorias (2,20) como: Interleucina (IL) IL-4, IL-10 y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) estas citocinas actúan sobre los macrófagos activados reduciendo los efectos de interleucinas pro-inflamatorias como: IL-1, IL6, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e inhibiendo la producción de radicales libres de oxígeno (21).

1.4.1 Anticuerpos anti-HLA donador específico.

La presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico se asocia con el rechazo del injerto en el trasplante alogénico y haploidéntico de CPH (22). A través de la activación de la vía clásica de la cascada del complemento se activa cuando la moléculas C1q se une al complejo antígeno-anticuerpo HLA-ADE e inicia la activación de otros componentes de la vía, lo que resulta en el complejo de ataque a la membrana, que a su vez, provoca la lisis y daño celular y la posterior eliminación de las CPH (23,24)

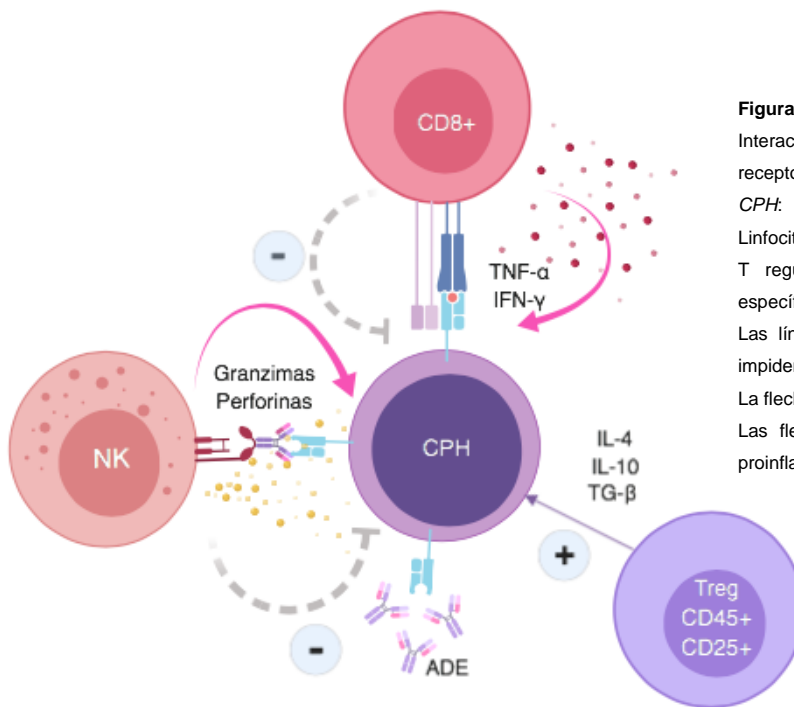


Figura 3. Rechazo del injerto.

Interacciones inmunológicas entre las células del receptor (rosa) y células del donador (moradas)

CPH: Célula progenitora hematopoyética, CD8+: Linfocito T citotóxico, NK: Natural Killer, Treg: Linfocito T regulador, ADE: Anticuerpo anti-HLA donador específico.

Las líneas punteadas indican los mecanismos que impiden la implantación del injerto.

La flecha morada favorece la implantación del injerto.

Las flechas rosas indican secreción de moléculas proinflamatorias. Imagen modificada (5)

1.5 Disminución de la función del injerto.

La disminución de la función consiste en una citopenia de al menos dos líneas celulares y un requerimiento de transfusión en presencia de MO hipoaplásica/aplásica (disminución en la celularidad de la MO) con quimerismo completo del donador (100% de quimerismo) (Figura 2). Esta complicación del TCPH es consecuencia de mecanismos más complejos e interacciones menos definidas entre el sistema inmunológico y el nicho hematopoyético.

Las células endoteliales, perivasculares y vasculares así como los osteoblastos tienen un papel fundamental en el mantenimiento de las CPH al proporcionar señales que regulan la autorenovación de estas células (5).

Dicho ambiente se puede afectar por la presencia de citocinas proinflamatorias como: interferón γ (INF- γ) y factor de necrosis tumoral α (FNT- α) que pueden participar en la disminución de la función del injerto inhibiendo la expresión de genes (HOX), β -catenina, gen de leucemia de células hematopoyéticas, el gen que codifica al receptor de Notch (10) que participan en la autorenovación de las CPH (9).

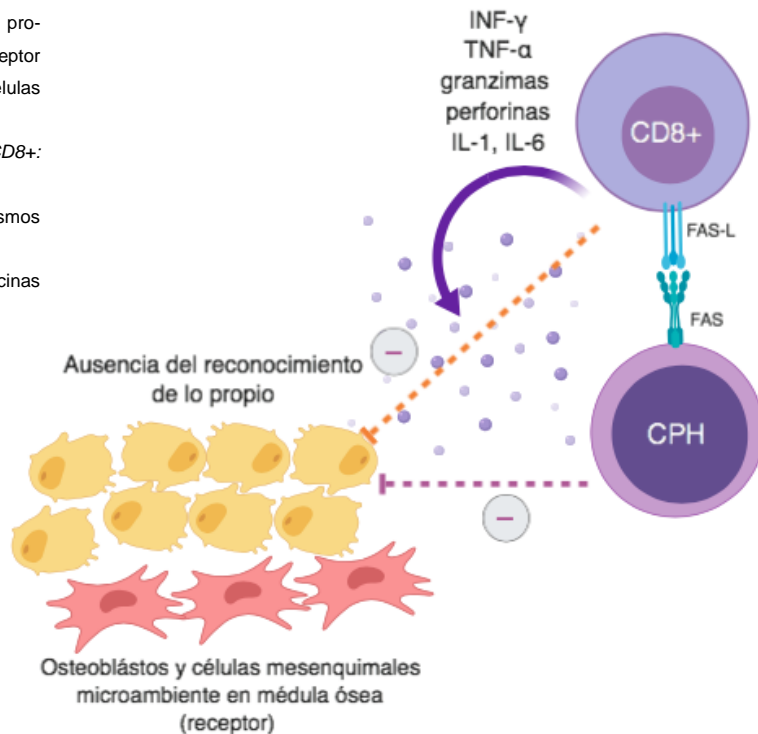
Figura 2. Disminución de la función del injerto

Interacciones inmunológicas en un ambiente pro-inflamatorio entre las células del receptor (osteoblastos y células mesenquimales) y células del donador (moradas)

CPH: célula progenitora hematopoyética, CD8+: Linfocito T citotóxico

Las líneas punteadas indican mecanismos inhibitorios para la implantación del injerto.

La flecha morada indica la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Imagen modificada (5)



1.6 Falla secundaria del injerto.

La *falla secundaria del injerto* se caracteriza por la pérdida de las células del donador después de 28 días del injerto inicial, obteniendo un número absoluto de neutrófilos $\leq 0.5 \times 10^9 /L$ con porcentaje de quimerismo menor a 95%.

Por lo tanto, en el rechazo del injerto el porcentaje del quimerismo es mixto (<95%), con presencia parcial o total de las células del receptor (9,25) (Tabla 2).

1.7 Infecciones virales post-trasplante, una complicación del TCPH.

Las infecciones contribuyen en forma importante a la morbi-mortalidad en los receptores con TCPH, el riesgo de infección no se limita al periodo de granulocitopenia previo al injerto, sino que persiste hasta que ocurre la reconstitución inmunológica que se observa de 12 a 24 meses posteriores al trasplante (1) .

La mayoría de las infecciones bacterianas y micóticas son causadas por microorganismos que colonizan: piel, boca, intestino, región perianal y tracto respiratorio, mientras que las infecciones virales son el resultado de una reactivación (virus latente CMV, EB,BK) o por adquisición de una transfusión de hemoderivados seropositivos a un receptor seronegativo.

Las estrategias para la prevención de infecciones incluyen: aislamiento del paciente en cuartos con flujo laminar, filtración de alta eficiencia de partículas aéreas HEPA (por sus siglas en inglés: *High Efficiency Particle Air*), ingestión de alimentos estériles, uso de inmunoglobulina IV, factores de crecimiento hematopoyético, y agentes antimicrobianos (1). En la Figura 4 se observa las infecciones más frecuentes en receptores con TCPH.

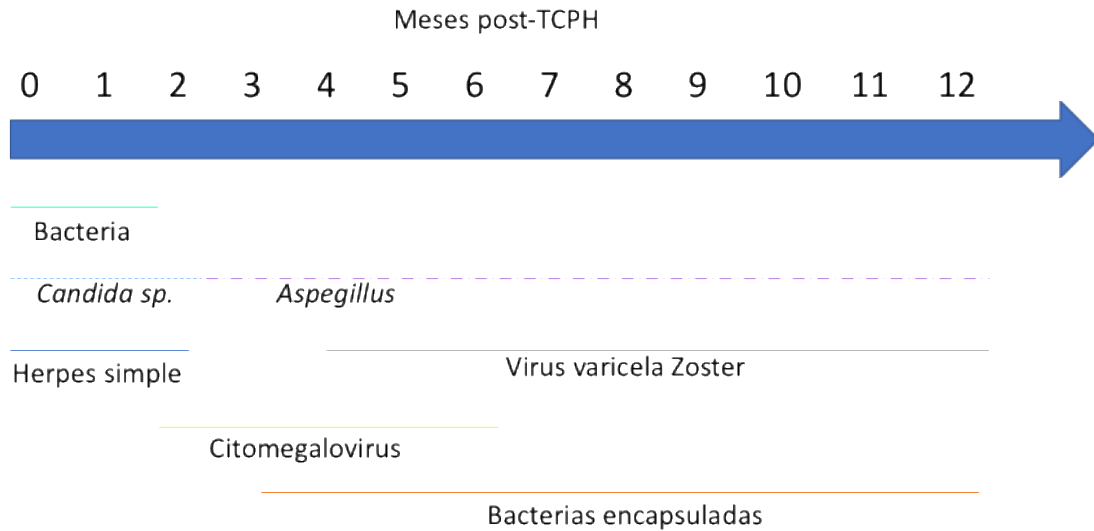


Figura 4. Infecciones más frecuentes post-TCPH. Imagen modificada (1).

2.0 Planteamiento del problema.

Los anticuerpos anti-HLA (*Human Leukocyte Antigen: Antígeno Leucocitario humano*) donador específico (ADE) en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) están asociados a la falla del injerto: *rechazo del injerto o disminución de la función del injerto*.

Debido a que los receptores candidatos al TCPH cursan con múltiples transfusiones (eventos de sensibilización) que resultan en la aparición de anticuerpos anti-HLA los cuales se han asociado a la falla primaria del injerto, detectarlos de manera oportuna permitirá predecir la falla del injerto a corto y largo plazo.

3.0 Justificación.

La detección y seguimiento de anticuerpos anti-HLA permitirá proponer y protocolos de desensibilización favoreciendo el éxito del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. Por lo que con este trabajo en México en población pediátrica, los anticuerpos anti-HLA podrían ser un buen blanco de estandarización para un tratamiento desensibilizante personalizado.

4.0 Hipótesis.

Existe una asociación de anticuerpos anti-HLA donador específico y datos clínicos con la falla primaria del injerto y la falla secundaria del injerto en receptores alogénicos de células progenitoras hematopoyéticas.

5.0 Objetivo general.

Determinar la asociación de anticuerpos anti-HLA donador específico y datos clínicos con la falla del injerto en receptores alogénicos de células progenitoras hematopoyéticas.

6.0 Objetivos específicos.

6.1 Determinar anticuerpos anti HLA donador específico pre-trasplante en receptores con TCPH.

6.2 Asociar la presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico con el rechazo del injerto.

6.3 Asociar la presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico con la disminución de la función del injerto.

6.4 Determinar la frecuencia de infecciones en los receptores de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

7.0 Materiales y métodos.

7.1 Diseño de estudio.

Estudio cohorte, longitudinal, prospectivo, observacional.

7.2 Tamaño de muestra.

Con base a la ecuación para calcular la proporción poblacional se obtuvo un tamaño de muestra de n=18 pacientes con trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas.

$$n = \frac{Z^2 \frac{\alpha}{2} N p q}{p q Z^2 \frac{\alpha}{2} + (N - 1) e^2} = 18$$

$Z^2 \frac{\alpha}{2}$	1.96	Nivel de confianza 95 %.
N	20	20 trasplantes alogénicos programados en 1 año.
p	0.7	Proporción de individuos con alo-TCPH.
q	0.3	Proporción de individuos con TCPH autólogo.
e	0.05	Error máximo tolerable.

7.2 Recolección de muestras biológicas.

1. Muestra pre-trasplante. Se recolectó una muestra de sangre periférica en un tubo sin anticoagulante siete días antes de realizar el TCPH.
2. Muestras post-trasplante. Se recolectó una muestra de sangre periférica en un tubo sin anticoagulante cada 8 días durante 2 meses durante su estancia en la Unidad de trasplante de médula ósea del HIM-FG, posterior a este tiempo se recolectó una muestra de sangre periférica una vez al mes.
3. Se centrifugó a 3,500 revoluciones por minuto (rpm) por 10 minutos.
4. El suero se almacenó a (-80°C) en crioviales hasta su uso, etiquetados con la siguiente información:
Nombre del paciente.
Fecha de recolección
Etiqueta (pre-trasplante) o (días post-trasplante).

7.3 Determinación de anticuerpos anti-HLA donador específico por la técnica Single Antigen Class I & II (One Lambda)®

Inactivación de sueros de los receptores.

1. Centrifugar 450 microlitros (μL) de suero a 3,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 1 minuto a temperatura ambiente.
2. Adicionar 50 μL de Ditiotreitól (DTT) 0.05M para la determinación de isotipo IgG.
3. Incubar a 37°C por 30 minutos.
4. Centrifugar a 3,000 rpm por 1 minuto.

Determinación de anticuerpos anti-HLA donador específico Single Antigen Clase I y Clase II One Lambda ®.

1. En una placa Whatmann ® de 96 pozos, se incubó 20 µL de suero inactivado con 5 µL de perlas de Single Antigen clase I (One Lambda ®).
2. Incubar 20 µL de suero inactivado con DTT con 5 µL de perlas de Single Antigen clase II (One Lambda ®).
3. Utilizar 20 µL de control negativo comercial (One Lambda ®).
4. Realizar un vórtex e incubar en un lugar oscuro por 30 minutos.
5. Realizar 3 lavados con buffer de Lavado 1X (One Lambda®)
6. Se adicionaron 100 µL de anticuerpo secundario anti-IgG-ficoeritrina (1µL de ficoeritrina + 99µL de buffer de lavado 1X (One Lambda®), por cada suero analizado.
7. Mezclar con vórtex e incubar en un lugar oscuro por 30 minutos.
8. Realizar 3 lavados con buffer de Lavado 1X (One Lambda®)
9. Adicionar 80 µL de buffer de fosfato salino a cada pozo a analizar.
10. Leer las perlas de Single Antigen Clase I y II en el equipo LUMINEX® T200.
11. Se analizaron con el software HLA fusion 3.2.

7.4 Tipificación de HLA (Receptor y Donador)

Se recolectaron datos del laboratorio de onco-hematología e histocompatibilidad. La tipificación se realizó por secuencia específica de oligonucleótidos (One Lambda®).

7.5 Cuantificación de quimerismo por análisis de Fragmentos (STR).

Se recolectaron datos del laboratorio de onco-hematología e histocompatibilidad.

Se realizó por análisis de fragmentos a través de un kit de amplificación para la identificación humana a través (15 STR (short tandem repeat, repetidos cortos en bloque) y Gen amelogenina, AMEL), (Applied Biosystems).

7.6 Biometría hemática.

Se recolectaron datos referentes a cuenta absoluta de neutrófilos, hemoglobina y plaquetas con el software INFOLAB® emitidos por el Equipo Beckman Coulter (Indianápolis).

7.7 Diagnóstico de infección y cargas virales.

Se recolectaron datos del laboratorio de biología molecular de resultados de identificación y cuantificación de virus determinadas por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de: CMV, Epstein barr, poliomavirus BK.

7.8 Análisis estadístico (GraphPad Prism 8 ®).

8.0 Resultados.

I. Evaluación de receptores pre-trasplante

Se analizaron 18 receptores de TCPH alogénico con tratamiento mieloablativo (busulfán y ciclofosfamida adicionando radiación corporal) en un período comprendido entre Agosto 2017 a Marzo 2019. De los cuales el 50% (n=9) son pacientes femeninos y el resto (n=9) son pacientes masculinos (Gráfico 1), con un intervalo de edades de 2 a 17 años (Gráfico 2).

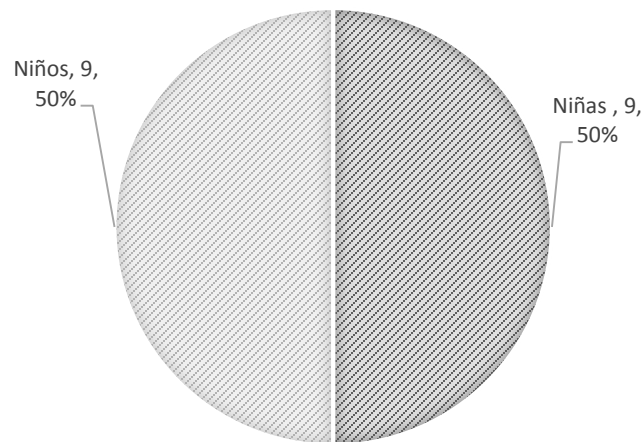


Gráfico 1. *Distribución de género de los receptores.*
Se indican porcentajes y números absolutos

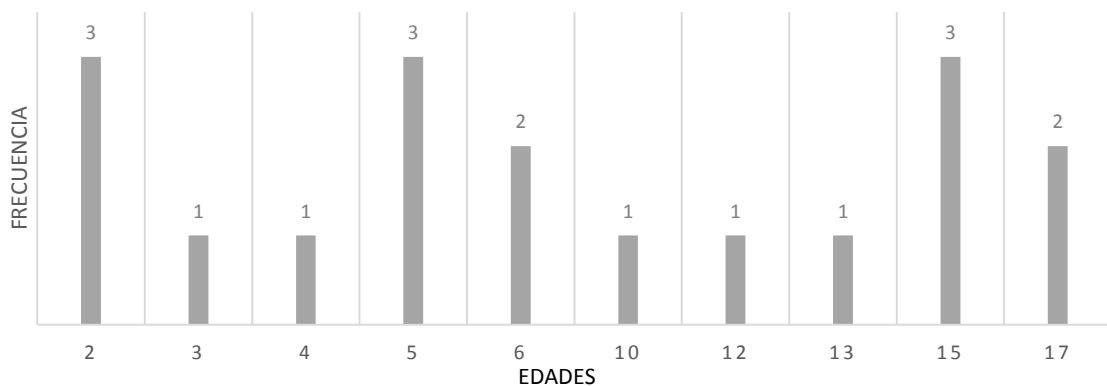


Gráfico 2. *Distribución de edades de los receptores.*

Los diagnósticos de los receptores fueron principalmente: Anemias 28% y Leucemias 55% y sólo el 12% presentó una translocación cromosómica de mal pronóstico de la enfermedad (Gráfico 3).

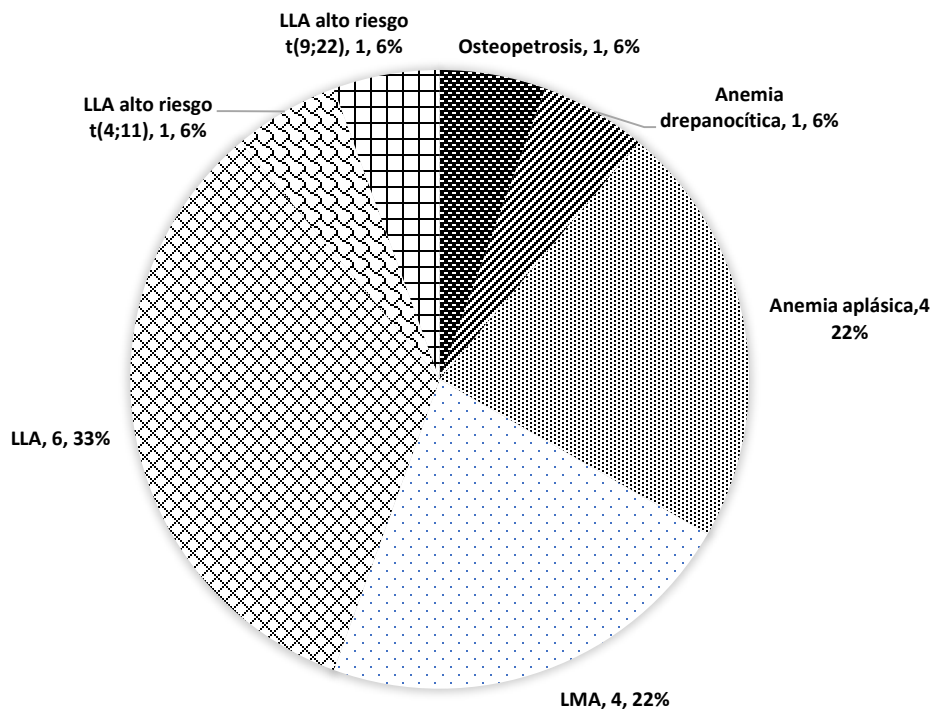


Gráfico 3. Diagnóstico de los receptores.

Número y porcentaje de receptores.

(Abreviaturas, t: presencia de translocación cromosómica)

Fuente de obtención de CD34+

De acuerdo a la fuente de obtención de las CPH el 78% proviene de un proceso de aféresis (Sangre periférica movilizada, administrando factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos) con un promedio de viabilidad de 97%. El intervalo de dosis administrada de células CD34+ fue de: 1.6×10^6 - 7.86×10^6 .

En tanto que en el 22% de los donadores (n=4), las células fueron obtenidas de aspirado de médula ósea con una viabilidad promedio 87.93%. El intervalo de dosis administrada de células CD34+ fue de: 1.08×10^5 - 5.22×10^5 .

Anticuerpos anti-HLA donador específico (pre-trasplante).

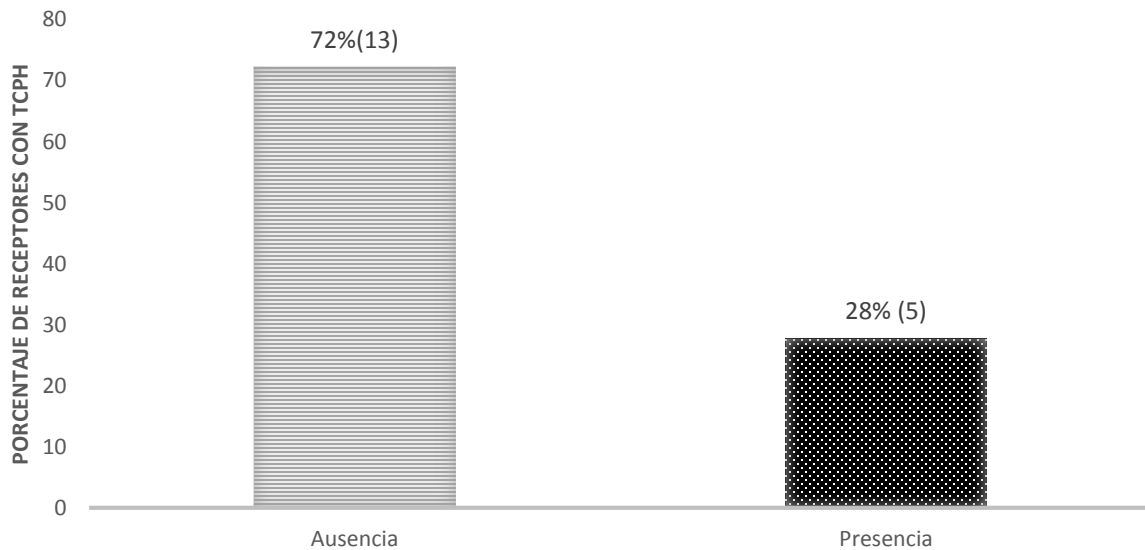


Gráfico 4. *Anticuerpos anti-HLA específicos contra el donador (ADE).*

Se muestra porcentaje de receptores y número de receptores con ausencia o presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico de acuerdo a las pruebas realizadas.

En el Gráfico 4, el 28 % (5/18) de los receptores, fueron positivos para ADE 7 días antes del TCPH, mientras que el resto de la población estudiada 72% (13/18), no presenta ADE, pero sí presentan anticuerpos que reconocen antígenos HLA.

Las especificidades de los anticuerpos anti-HLA donador específico (ADE) y no relacionados con el donador (NO ADE), encontradas en los receptores de manera pre-trasplante se muestran en los siguientes gráficos.

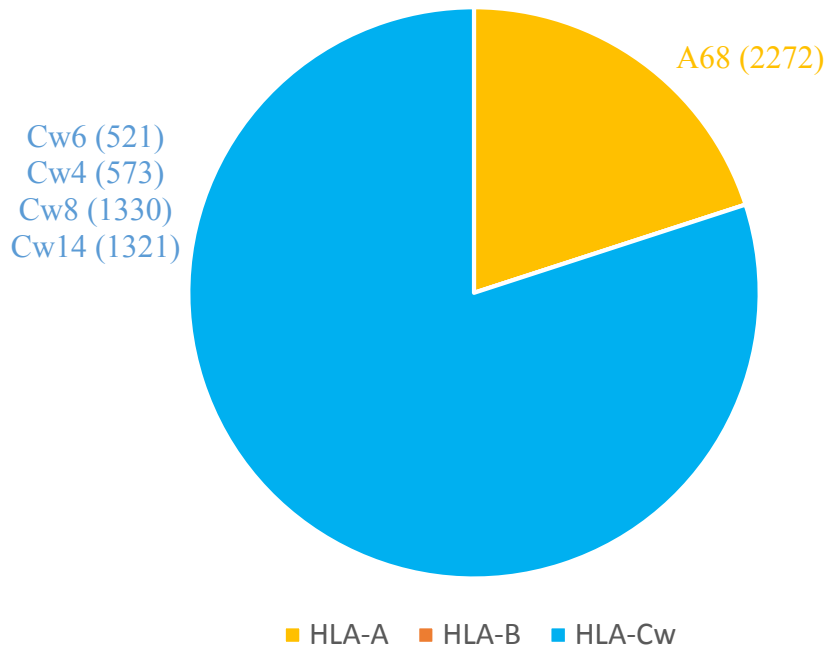


Gráfico 5. Especificidades de anticuerpos que reconocen moléculas HLA clase I del donador.

Se agrupan en especificidades que reconocen el alelo HLA-A, HLA-B y HLA-Cw; además se muestra entre paréntesis el valor de intensidad media de fluorescencia (entre paréntesis).

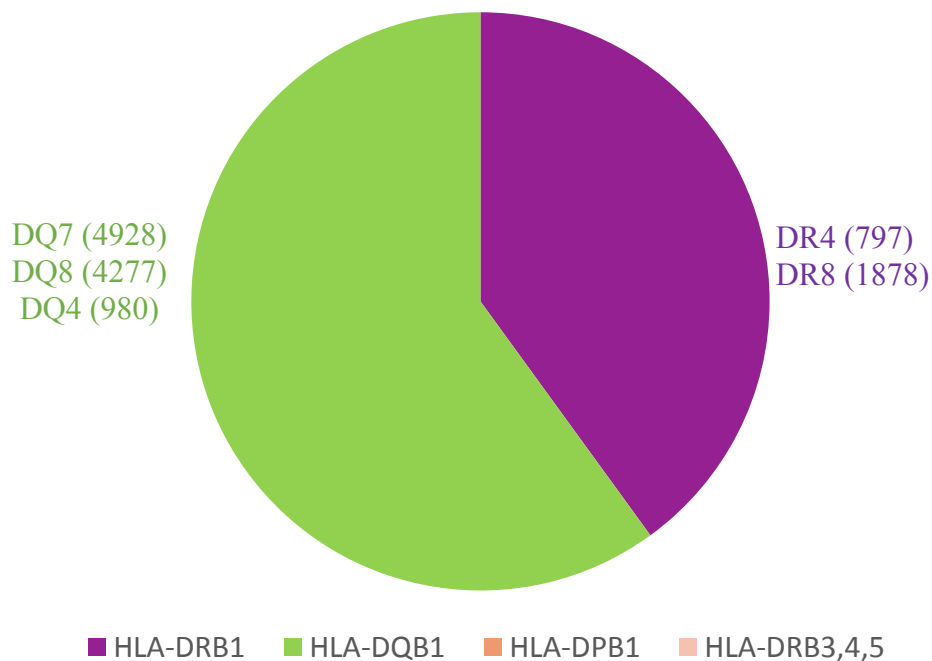


Gráfico 6. Especificidades de anticuerpos que reconocen moléculas HLA clase II del donador. Se agrupan en especificidades que reconocen el alelo HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP; además se muestra entre paréntesis el valor de intensidad media de fluorescencia (entre paréntesis).

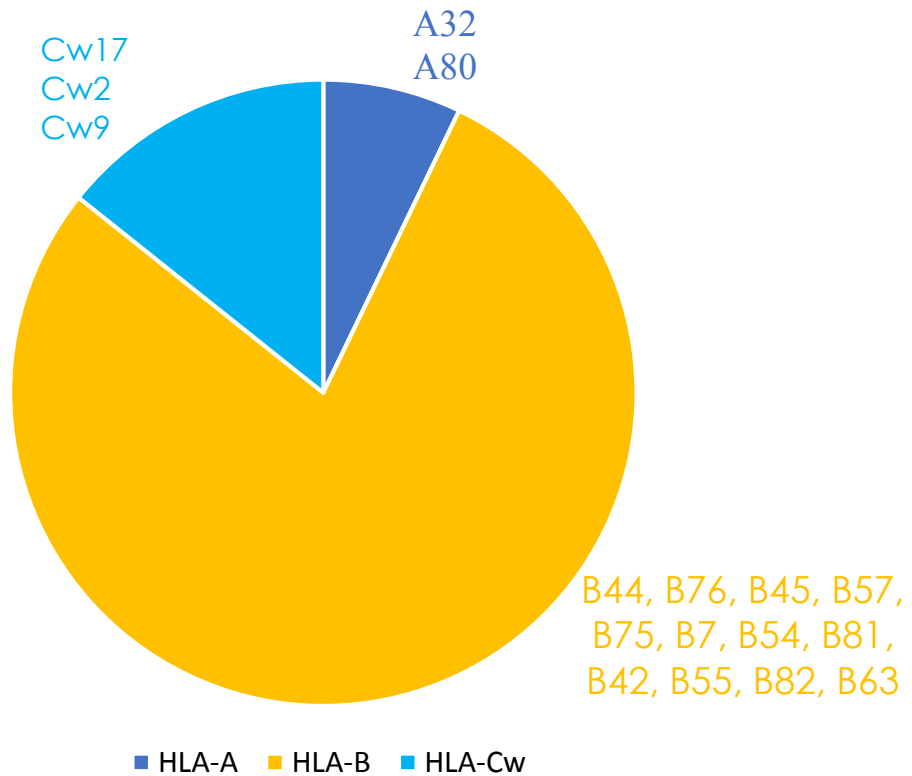


Gráfico 7. Especificidades de anticuerpos anti-HLA clase I.

Se muestran los antígenos HLA de clase I que fueron reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero. Se agrupan en especificidades que reconocen el alelo HLA-A, HLA-B y HLA-Cw.

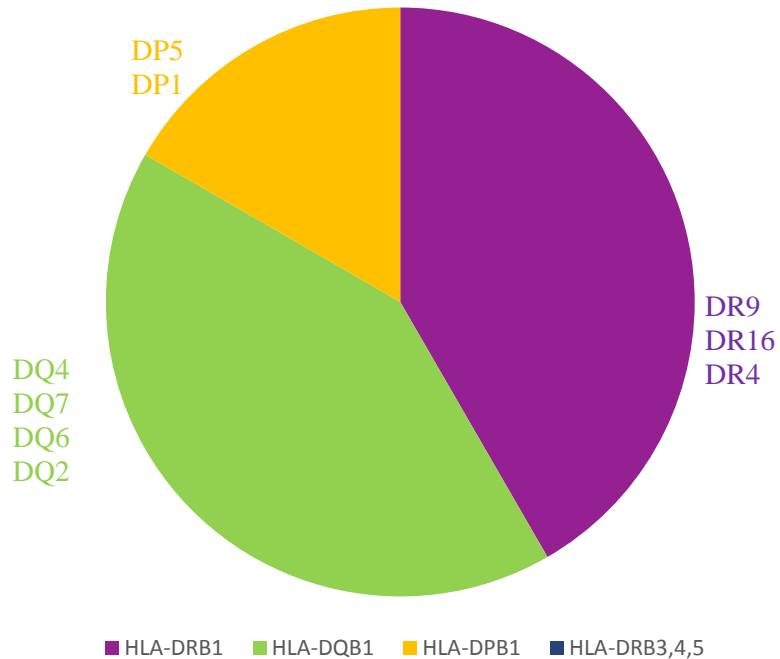


Gráfico 8. Especificidades de anticuerpos anti-HLA clase II.

Se muestran los antígenos HLA de clase II que fueron reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero. Se agrupan en especificidades que reconocen el alelo HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.

Presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico (pre-trasplante) en los grupos de enfermedades hematológicas

Se observó que el 50% (n=3) de los receptores con enfermedades hematológicas no maligna presentan ADE contrastando con el 17% (n=2) con enfermedad hematológica maligna. Ambos grupos de pacientes presentan anticuerpos anti-HLA de manera pre-trasplante, observando un mayor porcentaje (83%, n=10) en los receptores con enfermedades hematológicas malignas comparado con el 50% (n=3) de receptores en enfermedades hematológicas no malignas (Gráfico 9).

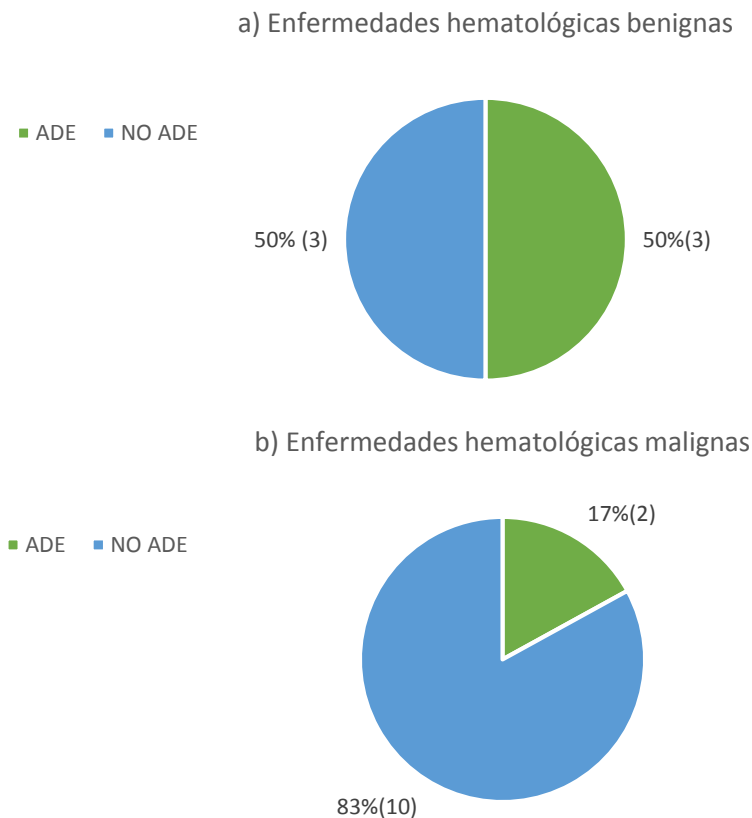


Gráfico 9 A, B. Anticuerpos anti-HLA en enfermedades hematológicas benignas y malignas. Se indica el porcentaje de receptores con anticuerpos anti-HLA donador específico y anticuerpos anti-HLA no relacionados con el donador (NO ADE) en enfermedades hematológicas.

Asociación de anticuerpos anti-HLA y falla primaria del injerto.

El 40% (2/5) de los receptores con ADE cursaron con rechazo primario del injerto, comparado con el 15% (2/13) de receptores que tuvieron rechazo primario del injerto y anticuerpos anti-HLA no relacionados con el donador (NO ADE) (Gráfico 10).

Asimismo, se observa que el 60% (3/5) de los receptores con ADE presentó una disminución de la función del injerto, mientras que el 85% (11/13) de los receptores con anticuerpos anti-HLA presentan dicha condición.

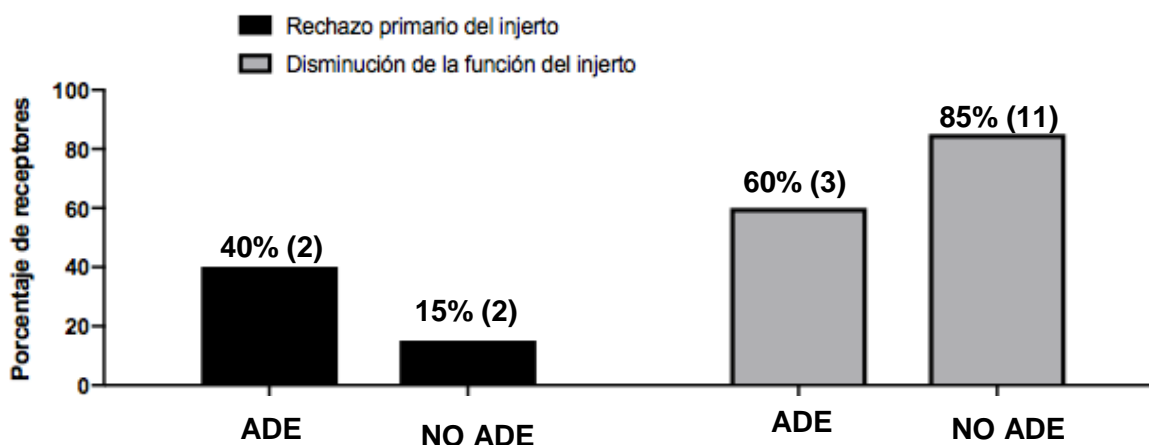


Gráfico 10. *Anticuerpos anti-HLA y falla primaria del injerto.*

Se muestra el porcentaje de receptores con ADE y anticuerpos anti-HLA con rechazo primario del injerto o disminución de la función del injerto.

Infecciones virales en el primer mes post-trasplante.

Durante el primer mes post-trasplante los pacientes se encuentran hospitalizados en la unidad de trasplante de MO, durante este periodo se realiza la detección de agentes infecciosos principalmente de tipo viral: citomegalovirus (CMV), virus Epstein barr y el poliomavirus BK.

En esta cohorte se observa que el 47% (8/18) presentaron infecciones virales por los patógenos antes mencionados.

Se observó que el 40% (n=2/5) de los receptores con ADE presentaron infecciones en el primer mes post-trasplante. Mientras que en el segundo grupo de estudio con receptores que sólo presentaron anticuerpos anti-HLA, el 46% (n=6/13) presentaron infecciones en este periodo.

Por lo que la presencia de los anticuerpos anti-HLA no condiciona a una protección o riesgo de presentar infecciones virales dentro de este periodo, por lo que no se encontró una diferencia significativa al realizar una prueba exacta de Fisher (Gráfico 11).

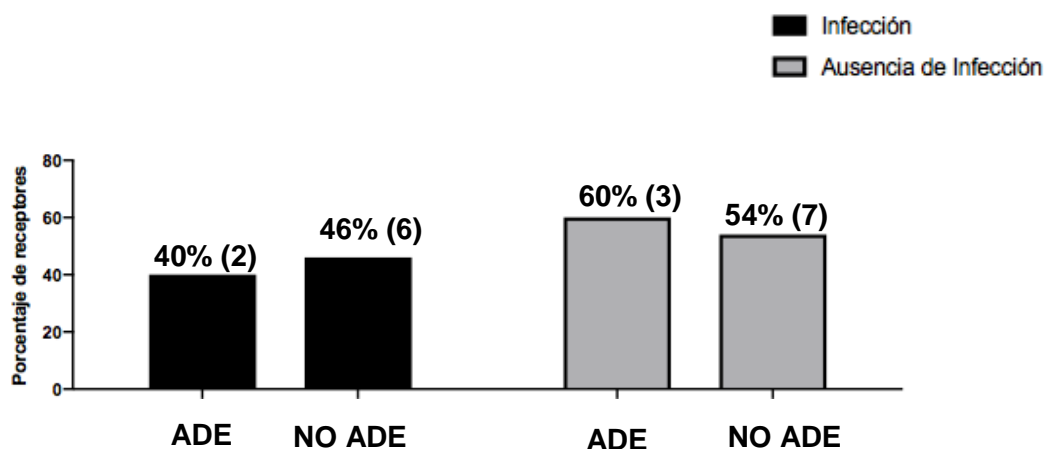


Gráfico 11. *Infecciones virales en los receptores en el primer mes post-trasplante.* Se muestra el porcentaje de receptores con infección viral en el primer mes y presencia de ADE y anticuerpos anti-HLA.

II. Evaluación post-trasplante

Presencia de anticuerpos anti-HLA post-trasplante.

Se determinó la presencia de anticuerpos anti-HLA de manera post-trasplante considerando la constante sensibilización por múltiples transfusiones de componentes sanguíneos posterior al evento de alosensibilización (TCPH) tabla3. Principalmente, por concentrados eritrocitarios radiados y filtrados en promedio 5 paquetes en conjunto con la administración de plaquetaféresis radiadas y filtradas en promedio 4 paquetes por paciente (Gráfico 12).

Tabla 3. *Componentes sanguíneos transfundidos post-trasplante.*

• Concentrado Eritrocitario
• Concentrado Eritrocitario Pediátrico
• Concentrado Eritrocitario Radiado
• Concentrado Eritrocitario Radiado Filtrado
• Concentrado Eritrocitario Filtrado
• Plaquetaféresis
• Plaquetaféresis Pediátrico
• Plaquetaféresis Pediátrico Filtrado
• Plaquetaféresis Pediátrico Radiado
• Plaquetaféresis Radiado Filtrado
• Plasma Fresco Congelado
• Crioprecipitados
• Mezcla de crioprecipitados

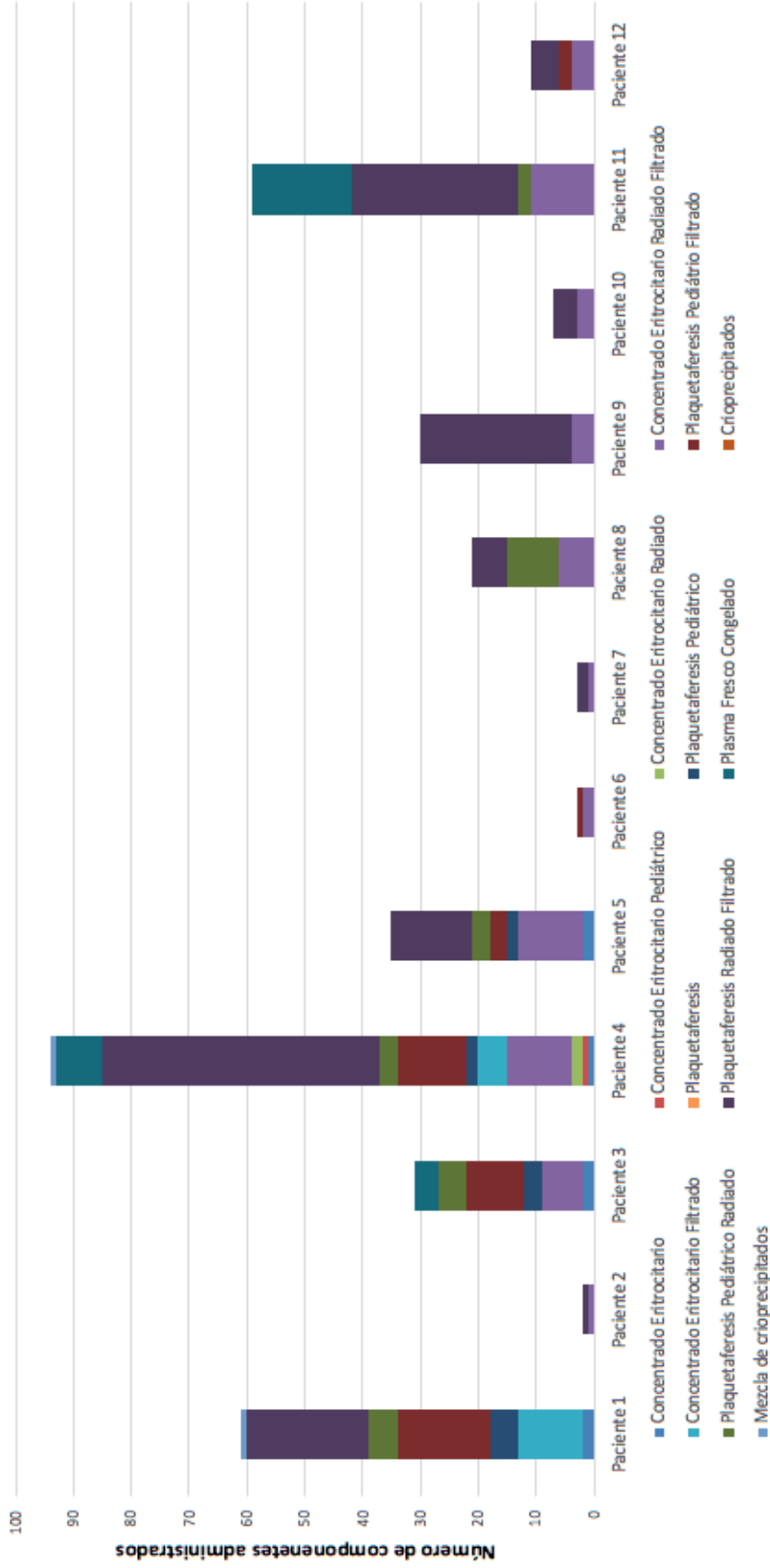


Gráfico 12. Número de transfusiones de componentes sanguíneos.

Se grafica el número de componentes sanguíneos administrados a cada paciente (12 datos de 18 receptores) con dato de transfusión post-TCPH.

Se realizó el seguimiento de los valores de intensidad media de fluorescencia en los cinco receptores que presentaron ADE que reconocen HLA de clase I y clase II de manera pre-trasplante, en distintos períodos, teniendo en cuenta que la alícuota de suero post-trasplante no cursara con transfusiones de componentes sanguíneos cercanas, cargas virales altas o presentara fiebre el paciente.

En el primer grupo de receptores, que presentaban ADE pre-trasplante, se observó que el 100% presenta una disminución en los valores de intensidad media de fluorescencia en los ADE anti-HLA clase I y clase II (Gráfico 13).

Por otro lado, los 13 receptores con anticuerpos anti-HLA (NO ADE) se midió el porcentaje de positividad de anticuerpos anti-HLA , (%) *PRA: Porcentaje de Panel Reactivo de Anticuerpos* (de manera pre-trasplante y post-trasplante).

Doce receptores fueron positivos para anticuerpos anti-HLA clase I post-trasplante, con distintos valores de %PRA, en siete receptores el porcentaje de positividad disminuyó tras recibir el TCPH. Cuatro receptores aumentaron el porcentaje de positividad y un receptor se mantuvo a lo largo del periodo post-trasplante (+190 días) (Gráfico 14).

De la misma manera, se determinó el porcentaje de positividad para anticuerpos anti-HLA clase II, donde se observa un comportamiento similar a los anticuerpos anti-HLA clase I, en seis receptores disminuye el %PRA, en cinco aumenta y en un receptor se mantiene el resultado del porcentaje después del TCPH (Gráfico 15).

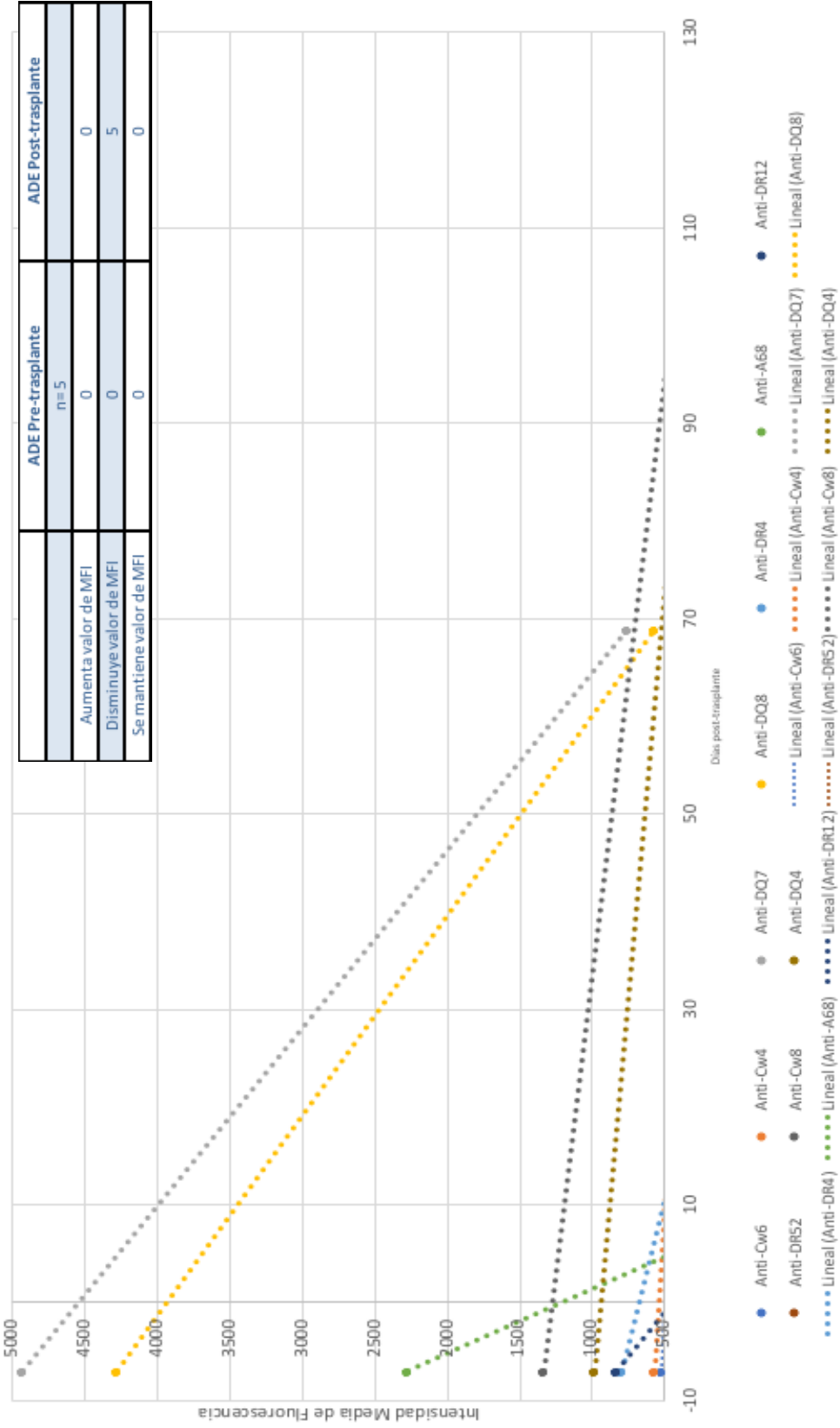


Gráfico 13. Anticuerpos anti-HLA donador específico post-trasplante.

Día -7 muestra pre-trasplante, los puntos representan antígenos que reconocen los ADE; línea punteada representa el seguimiento post-trasplante de cada especificidad.

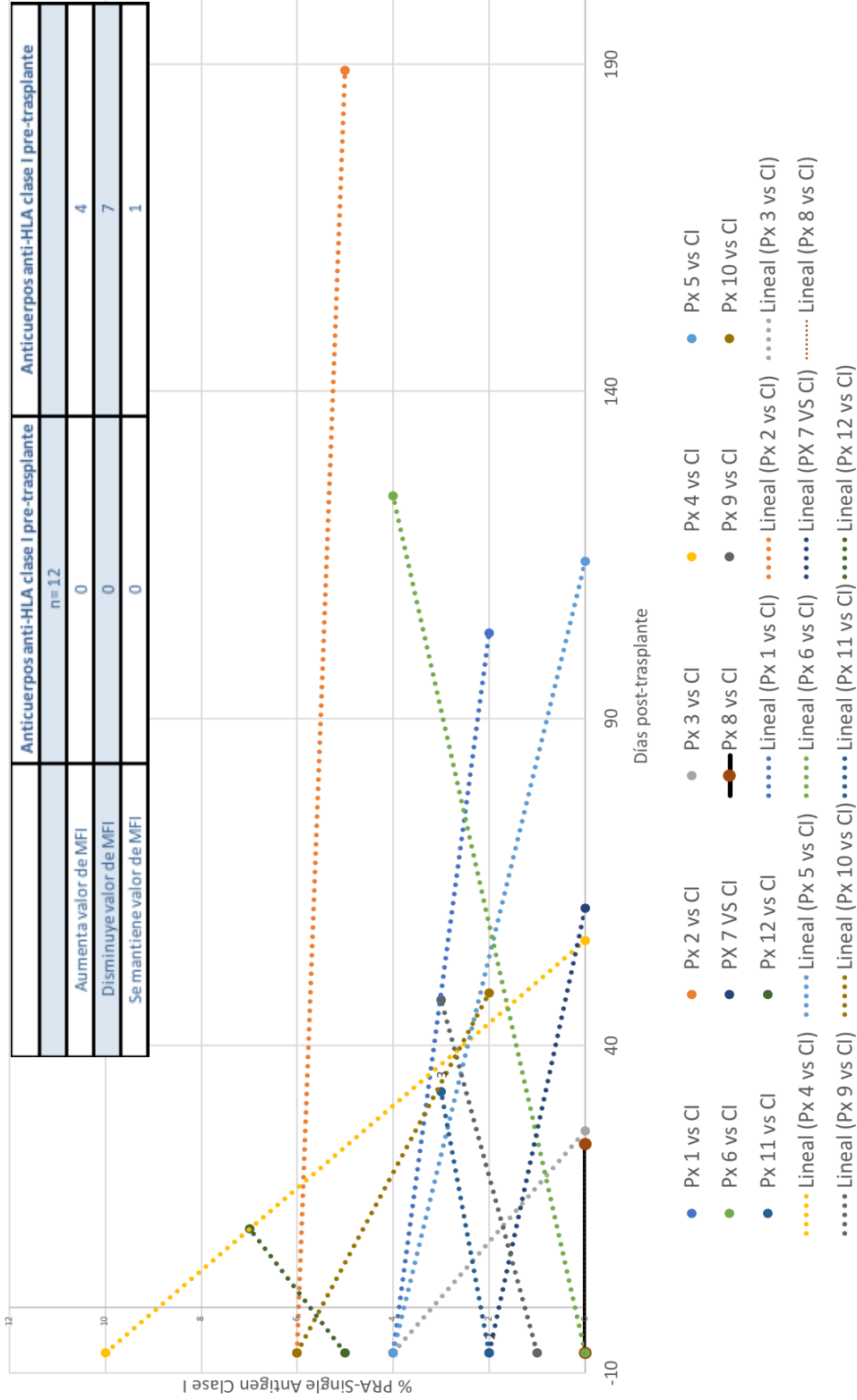


Gráfico 14. Porcentaje Panel Reactivo de Anticuerpos- Single Antigen HLA- clase I post-trasplante. Día -7 refiere a la muestra pre-trasplante. Los puntos de color representan a los 12/18 pacientes (Px) con anticuerpos anti-HLA, líneas punteadas representa el seguimiento del porcentaje de anticuerpos anti-HLA post-trasplante.

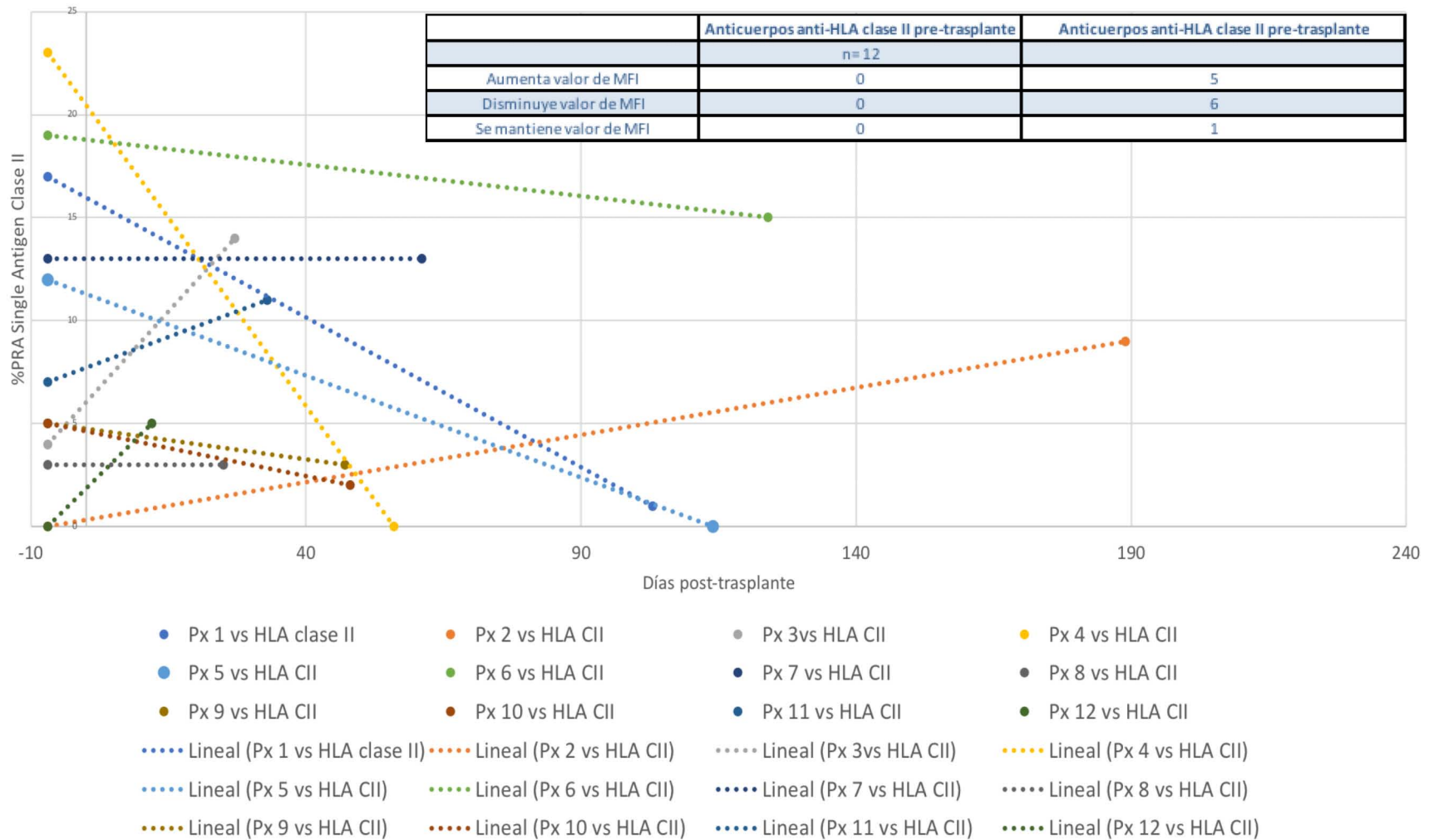
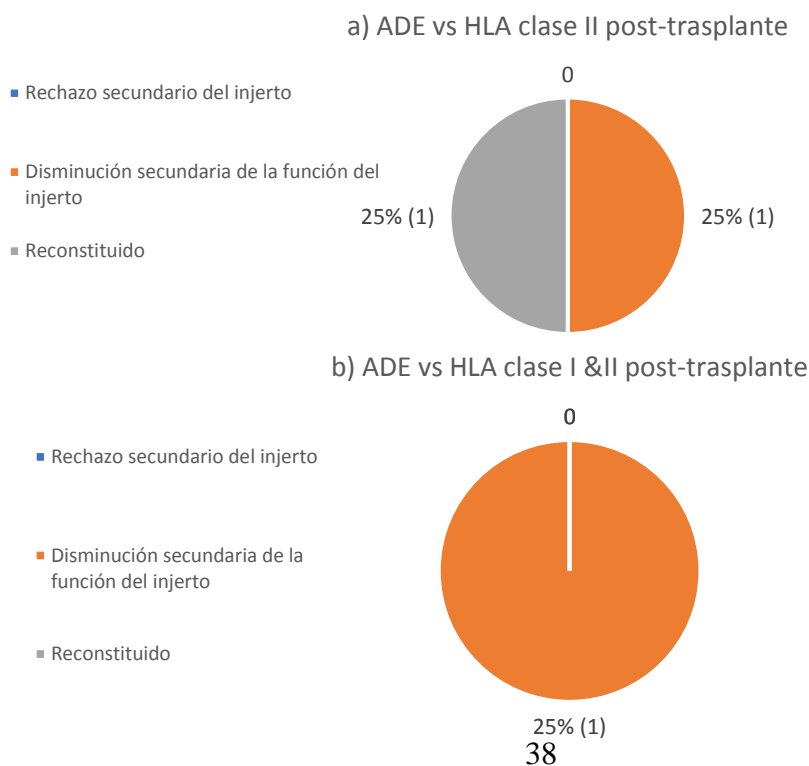


Gráfico 15. *Porcentaje Panel Reactivo de Anticuerpos-Single Antigen HLA-clase II post-trasplante.* Día -7 refiere a la muestra pre-trasplante. Los puntos de color representan a los 12/18 pacientes (Px) con anticuerpos anti-HLA, líneas punteadas representa el seguimiento del porcentaje de anticuerpos anti-HLA post-trasplante.

Posterior a los 28 días post-trasplante se considera una falla secundaria del injerto en donde se puede detectar un rechazo secundario del injerto y una disminución de la función del injerto o si el receptor posterior a este periodo ha reconstituido la estirpe celular mieloide (cuenta absoluta de neutrófilos, valores de hemoglobina y plaquetas).

El seguimiento post-trasplante de los cinco receptores que presentaban ADE antes del TCPH, se observó que el 50% (2/4) persistió el ADE de manera post-trasplante que reconoce moléculas de HLA clase II, de los cuales el 25% (1/4) presentó una disminución de la función del injerto y el otro 25% (1/4) reconstituyó el número de neutrófilos, hemoglobina y plaquetas.

El otro 25% (1/4) persistió ADE que reconocen moléculas de HLA clase I y clase II de manera conjunta dicho receptor presentó una disminución de la función del injerto. Por último el 25% restante resultó ser negativo para la detección de ADE con múltiples infecciones virales al momento de la determinación el cual resultó en el rechazo secundario del injerto, dicho paciente no contaba con el número de neutrófilos, hemoglobina y plaquetas y con un porcentaje de quimerismo menor al 95% (Gráfico 16 a,b,c).



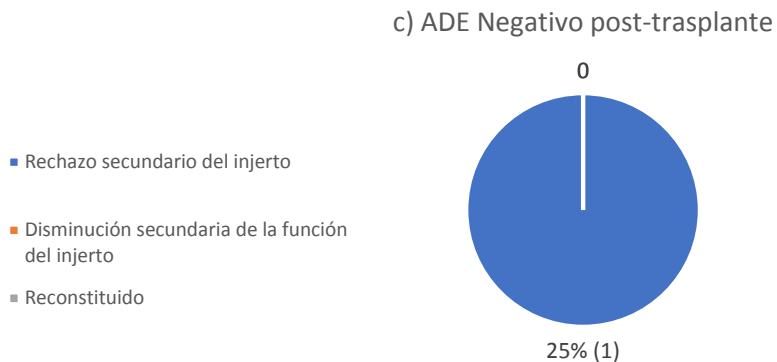
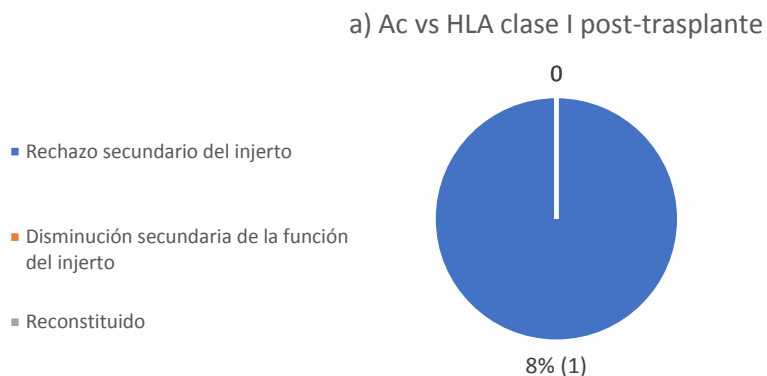


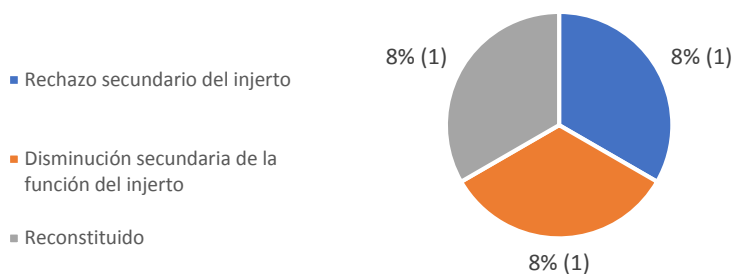
Gráfico 16. Falla secundaria del injerto y ADE.

En los gráfico **16 a**: Se muestra que el 50 % (n=2) con ADE que reconoce HLA clase II el 25% presentó disminución de la función del injerto, el 25% presentó una reconstitución hematológica. **16b**: El 25% (n=1) con ADEs que reconocen ambas clase del HLA, presentó una disminución de la función del injerto. **16c**: El 25% (n=1) con ADE negativo y con infecciones virales en los primeros dos meses post-trasplante presentó rechazo secundario del injerto post-TCPH.

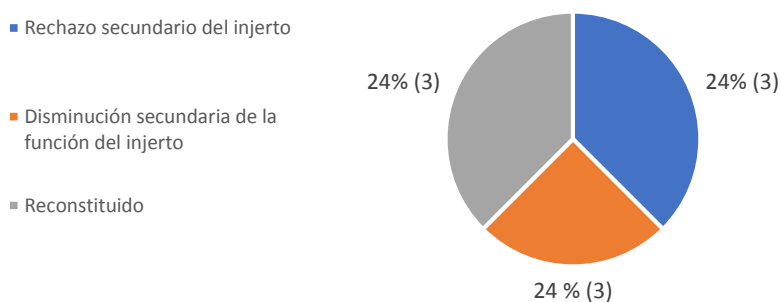
En los 14 receptores restantes se observó los tres panoramas que se observaron de manera pre-trasplante, ya que el 8% (1/14) reconoció moléculas de HLA clase I que resultó en el rechazo secundario del injerto. De igual manera se observa que 24% (3/14) reconocieron moléculas de HLA de clase II de los cuales el 8% resultó en rechazo, 8% en una disminución de la función del injerto y el 8% restante logró reconstuir celularidad identificada en la citometría hemática. Este mismo comportamiento se observó en los pacientes que reconocían moléculas de HLA clase I y II en manera conjunta pero en el 72% (9/14)de población. Por último el 8% (1/14) restante resultó ser negativo para el panel reactivo de anticuerpos anti-HLA, obteniendo una reconstitución hematológica satisfactoria y sin datos de infección de manera post-trasplante (Gráfico 17 a, b y c).



b) Ac vs HLA clase II post-trasplante



c) Ac vs HLA clase I & II post-trasplante



d) Ac Negativo post-trasplante

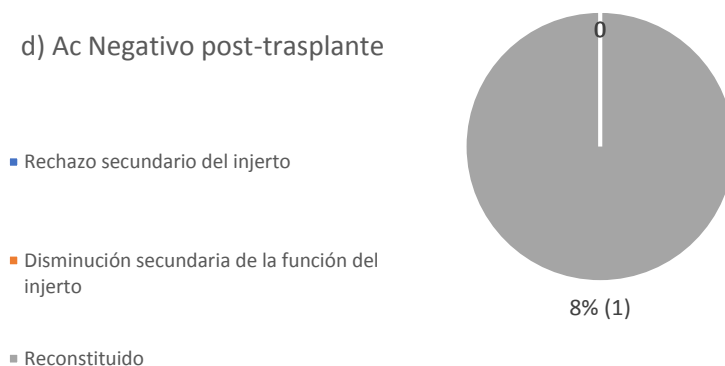


Gráfico 17. *Falla secundaria del injerto y anticuerpos anti-HLA.* Se muestra el porcentaje de receptores con falla secundaria del injerto con anticuerpos que reconocen moléculas de HLA en distintas condiciones de reconocimiento de moléculas de HLA.

Infecciones virales post-trasplante.

Realizando el seguimiento de las cargas virales de manera post-trasplante de los virus: CMV, Epstein barr, Poliomavirus BK, se observa que el número de las cargas virales disminuyen y se limitan posterior al cuarto mes (Gráfico 18) por otra parte, se observa que el número de pacientes disminuye.

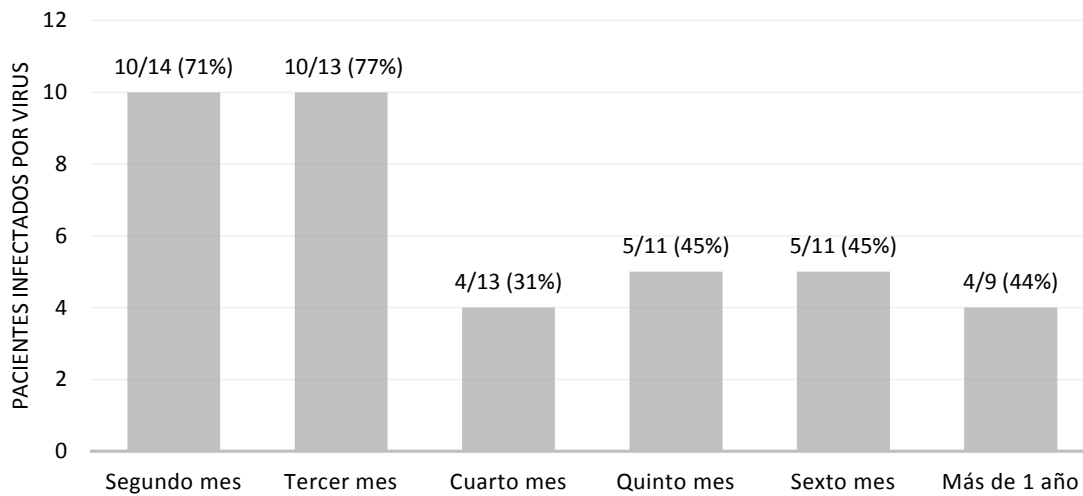


Gráfico 18. Infecciones virales post-trasplante.

Se muestra la razón de receptores con identificación y cuantificación de infecciones virales agudas con respecto al total de los pacientes sin infecciones en el respectivo mes (1er mes a más de un año post-trasplante).

Se observa que el estudio empezó con 18 receptores y hasta este momento sobreviven 10 pacientes.

Se determinó en que momento la primer línea celular de defensa del organismo (neutrófilos) empezaba mostrar valores normales y se observó que el 81 % de los receptores tuvieron valores normales en el número absoluto de neutrófilos al cuarto mes post-trasplante, dicha reconstitución celular es independiente de estímulos externos como infecciones virales o fiebre (Gráfico 19 y 20).

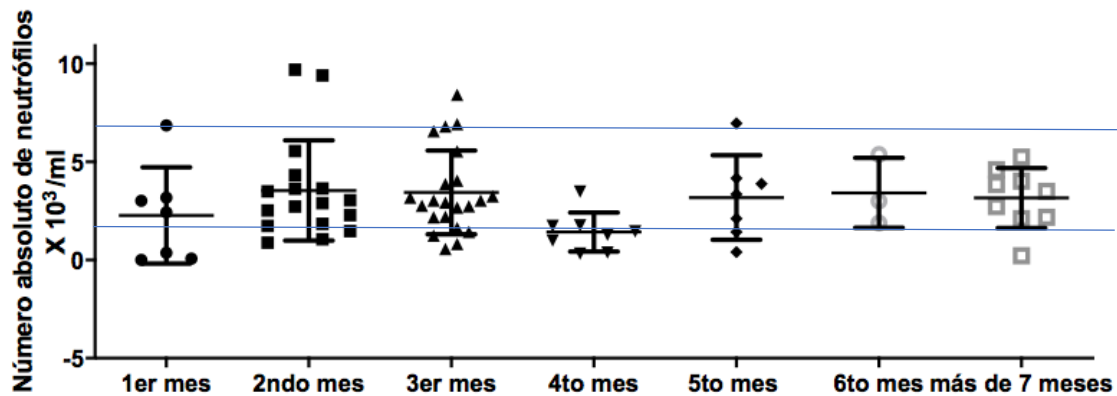


Gráfico 19. *Reconstitución de neutrófilos posterior al TCPH.*

Determinaciones de número absoluto de neutrófilos a lo largo de 1 año en los 18 receptores. Se reporta Mann-Whitney para cada mes analizado sólo el cuarto mes se observó una diferencia significativa $p=0.0379$. Las líneas punteadas indican el valor de referencia de la cuenta absoluta de neutrófilos ($4.5-7.5 \times 10^3/\text{mL}$)

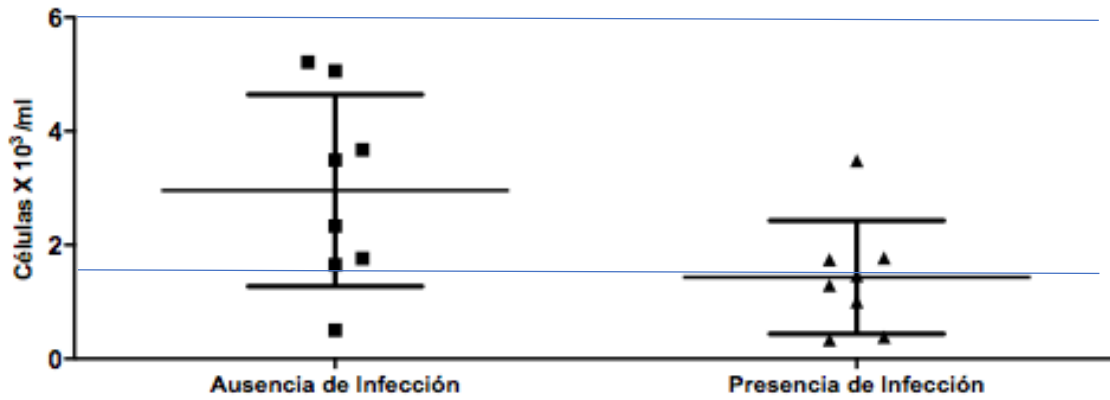


Gráfico 20. *Número absoluto de neutrófilos al cuarto mes.*

Se observa dos grupos con distintos valores de neutrófilos, el primer grupo son pacientes sin infección; el segundo grupo representa a receptores con infecciones virales con cargas virales positivas, detectadas mediante PCR en tiempo real.

Desenlace de los receptores con TCPH.

Se realizó una comparación de curvas de sobrevida, donde en ambos grupos de estudio se observa un comportamiento en común, independientemente si presentan ADE o No ADE. En ambos grupos la presencia de anticuerpos anti-HLA clase I y clase II en conjunto de manera pre-trasplante disminuye la sobrevida de los receptores, observando que el promedio de vida de los receptores con ADE es de 81 días, mientras que los receptores que presentaron anticuerpos anti-HLA la media de vida fue de 358 días (Gráfico 21 y 22).

Se observa una menor sobrevida cuando los receptores presentan anticuerpos anti-HLA que reconocen la molécula de HLA clase I, donde el promedio de sobrevida en el grupo que presenta ADE es de 130 días, y el grupo no ADE es de 147 días.

El 50% de la población que presentan estas condiciones de anticuerpos anti-HLA fallece por complicaciones como: infecciones virales, un paciente falleció por colitis neutropénica al día +19 y otro falleció al día +9 por coagulación intravascular diseminada (CID) posterior al TCPH.

Sin embargo, los receptores que poseen anticuerpos que reconocen moléculas de HLA clase II, el 100% logra sobrevivir y reconstituir hematológicamente después de llevar a cabo el TCPH, observando un comportamiento protector. Cabe mencionar que este grupo de receptores no presentaron infecciones virales en el primer mes post-trasplante o si las presentaban tenían un bajo número de copias.

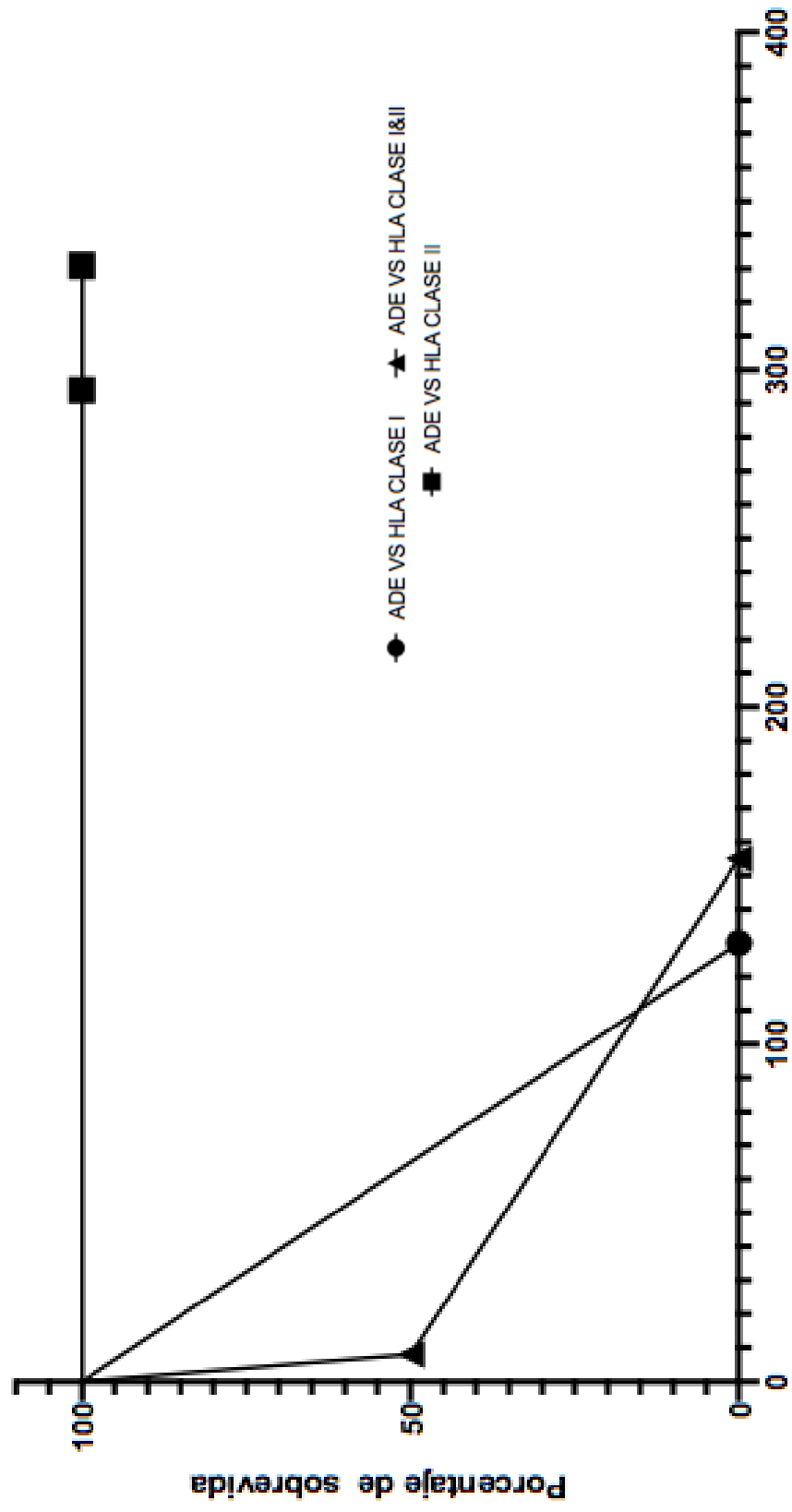


Gráfico 21. Supervivencia de receptores con ADE y TCPH.

Se muestran 5 receptores con ADE que reconocen moléculas del HLA clase I, clase II o ambas.

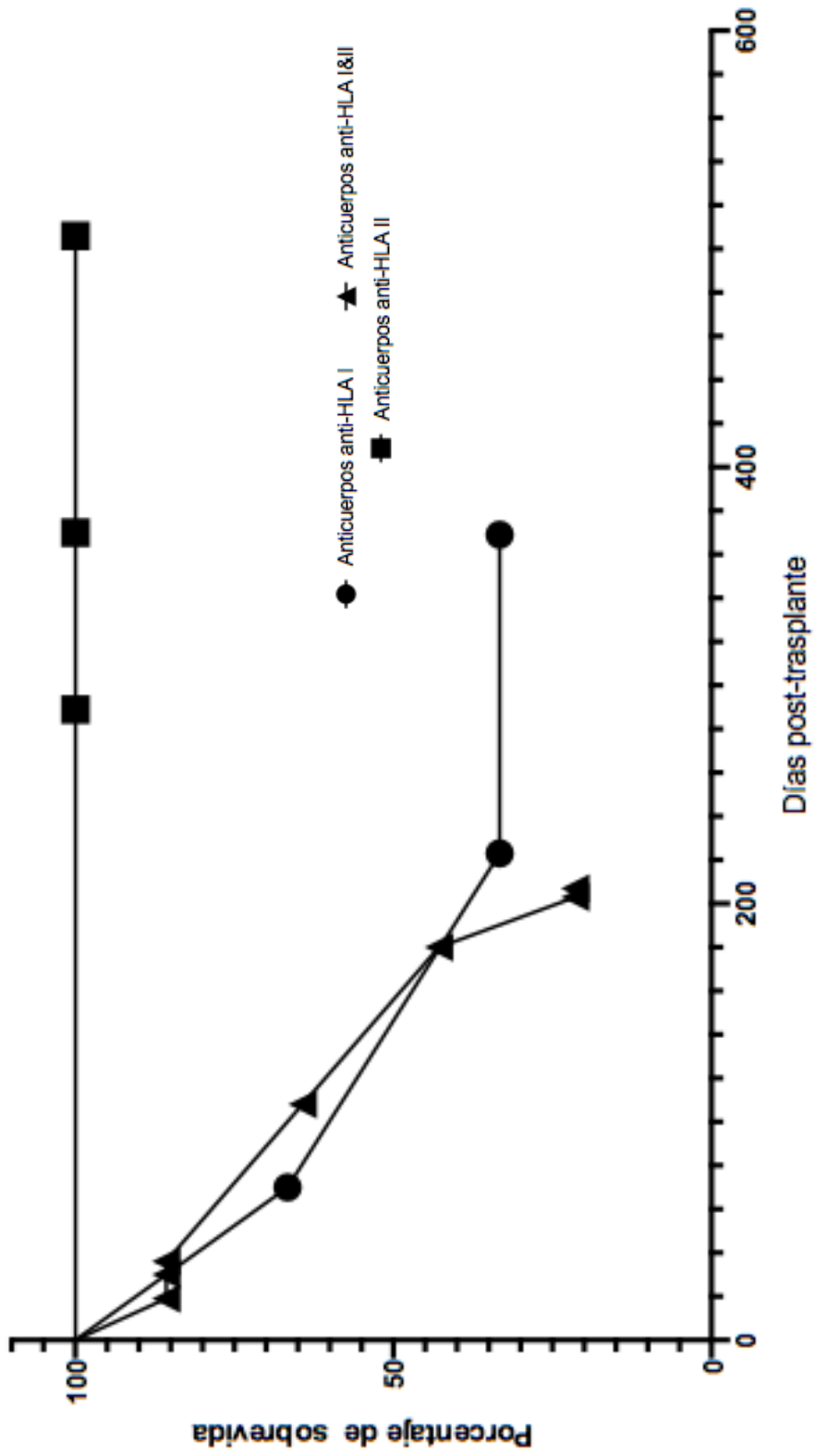


Gráfico 22. Supervida de receptores con anticuerpos anti-HLA y TCPH.

13 receptores con anticuerpos anti-HLA que reconocen moléculas de HLA clase I, clase II o ambas. Supervida de 506 días post-trasplante.

9.0 Discusión.

Las transfusiones sanguíneas son una parte esencial en el tratamiento de las enfermedades hematológicas benignas antes de realizar el TCPH (6). Estudios demuestran que la presencia de ADE resulta en la mayoría de los casos en eventos de sensibilización inducida por transfusiones previas al TCPH, dichos anticuerpos se han asociado con la falla primaria del injerto (22,26–28). En el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIM-FG), se observó que el 50% (n=3/6) de los receptores con enfermedad hematológica benigna presentaron ADE, debido a que estos receptores antes del trasplante recibieron 19, 30 y 9 transfusiones de distintos componentes sanguíneos comparando con los otros 3 receptores que recibieron 1 transfusión de manera pre-trasplante, mientras que el 17% (n=2/12) de los receptores con enfermedades hematológicas malignas presentaron ADE debido a que estos dos receptores recibieron 66 y 99 transfusiones de diferentes componentes sanguíneos de manera pre-trasplante, a diferencia de los 12 receptores restantes que a lo máximo recibieron 18 transfusiones. Cabe mencionar que la presencia de estos anticuerpos, se debe a que los pacientes con cáncer (leucemia) o enfermedades hematológicas, con frecuencia reciben transfusiones de componentes sanguíneos, donde se ha observado que un componente eritrocitario aumenta los valores de hemoglobina 1g/dL, pero pueden ocurrir incrementos menores en este análisis. Por lo que es una terapia de rescate para este tipo de anomalías hematológicas (29).

Se ha reportado una frecuencia de ADE entre el 5-24%, mientras que para anticuerpos anti-HLA no relacionados con el donador se describe entre 21-41% de los receptores adultos, principalmente en mujeres multíparas y con enfermedad heterogénea con TCPH, aún no se cuenta con datos de anticuerpos anti-HLA donador en población pediátrica con TCPH (28).

En HIMFG se observó que el 28% de los receptores pediátricos presentaron ADE y el 72% presentó anticuerpos anti-HLA no asociados con el donador del grupo estudiado.

La frecuencia de la falla del injerto se ha reportado entre el 3.8 y el 5.6% en trasplantes autólogos y alogénicos, pero aumenta hasta un 10% en los TCPH haploidénticos en receptores adultos, variando significativamente de acuerdo a los distintos centros de trasplante de CPH (30). La frecuencia del rechazo del injerto se observa en el 20% de la receptores (7), mientras que la disminución de la función del injerto se presenta entre el 5-27% y se asocia principalmente a altas cargas virales y complicaciones hemorrágicas (5).

En el HIMFG la frecuencia de la falla primaria del injerto se observó en el 100% de los receptores alogénicos, observando que el 40% de ellos presentaron rechazo primario y el 60% presentó una disminución de la función del injerto. El rechazo primario del injerto se puede deber a incompatibilidad en el sistema HLA entre el receptor y donador (principalmente en trasplantes haploidénticos) y la disminución de la función del injerto se debe a que los receptores se infectan por agentes patógenos virales desde el primer mes post-trasplante impidiendo que la reconstitución hematológica no se logre dentro de los primero 28 días post-trasplante con un perfil genético con 100% con origen del donador.

En nuestros datos se observa que los valores obtenidos son mayores a lo reportado en los artículos, pero observando los número absolutos la frecuencia de rechazo y disminución de la función del injerto es baja, para que este estudio obtenga un mayor poder estadístico se debe de obtener un mayor número de muestras y normalizar la población de estudio.

Actualmente, no se cuentan con estudios que asocien la falla secundaria del injerto con la presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico, pero se han desarrollado protocolos de desensibilización para el seguimiento de estos anticuerpos y la reconstitución hematológica.

En el Centro de hematología y unidad de inmunohematología y medicinal transfusional de la universidad Sapienza, Roma (31); se realizó el seguimiento del valor de intensidades media de fluorescencia (MFI) del anticuerpo anti-HLA diez días antes de realizar el TCPH, administrando un esquema de medicamentos:

Se administró anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab) en el día -15 pre-TCPH, para inhibir la producción de anticuerpos por linfocitos B CD20+. Dos plasmaféresis en los días -9 y -8, para eliminar los anticuerpos anti-HLA preformados. Inmunoglobulina anti-timocito, se empleó como profilaxis para la EICH al día -4 al día -2. Infusión de inmunoglobulinas intravenosas (800 mg/Kg) en el día -7 para limitar la aparición de los anticuerpos.

En la población estudiada se logró la eliminación de ADE, sin observar la reaparición de estos anticuerpos, evitando que hubiera interferencia farmacocinética de la quimioterapia del régimen de acondicionamiento y la administración de la inmunoglobulina anti-timocito, bajo estas condiciones los receptores lograron un injerto estable sin efectos de reconstitución celular tardíos, donde se concluyó que el protocolo era seguro y efectivo para el injerto (31).

La sociedad europea para el trasplante de sangre y médula ósea (The European Society for Blood and Marrow Transplantation), ha publicado guías para el manejo de los ADE en trasplantes haploidénticos, sugiriendo desensibilizar a los pacientes con ADE antes del TCPH sin sugerir la temporalidad (tiempo de administración del tratamiento desensibilizante) (32).

En el HIMFG se realiza un tratamiento profiláctico post-TCPH en el cual se administran 2 inmunosupresores (ciclosporina y tacrolimus), el mecanismo de acción es la inhibición de la producción de IL-2, cuya función es fundamental para la diferenciación y proliferación de linfocitos T citotóxicos. Estos fármacos bloquean la transcripción del gen que codifica a la IL-2, uniéndose a las inmunofilinas (proteínas citoplásmicas en los linfocitos T). Ciclosporina se une a ciclofilina y tacrolimus, (denominado FK506), se une a la molécula denominada FKBP (proteína de unión a FK506, funcionalmente parecida a ciclofilina), la diferencia entre ambos fármacos

es la potencia inmunosupresora, se observa una mayor potencia farmacológica en el caso de tacrolimus, entre 10 y 100 veces mayor.

El complejo fármaco-inmunofilina interacciona con un tercer componente, calcineurina, esta unión produce la inhibición de su actividad fosfatasa y de algunos procesos calcio dependiente e interfiere en la activación de las células T y en la producción de IL-2 (33).

Las infecciones virales relacionadas con el trasplante son el resultado de daños en mucosas y piel como consecuencia de los regímenes de acondicionamiento, así como de los catéteres, la neutropenia y la inmunodeficiencia. Los esquemas de intensidad reducida se asocian con una tasa más baja de infecciones tempranas comparada con los mieloablativos, pero el riesgo de infección tardía parece ser el mismo (34).

El 67% de los receptores en el primer mes post-TCPH presentaron cargas virales para el poliomavirus BK. Este virus infecta a una gran parte de la población, la infección se da principalmente en la etapa de la infancia y a veces, se asocia con una enfermedad respiratoria leve. El virus persiste en el riñón después de la infección causando cistitis hemorrágica y se vuelve a reactivar y excretar en la orina durante períodos en los que la persona se encuentra inmunocomprometida. La viremia por BK se ha reportado en pacientes con TCPH en un 25 a 47%, en receptores de aloinjerto renal y mujeres embarazadas (38,39).

A diferencia del citomegalovirus y el virus de Epstein barr que se detectan de manera serológica antes de realizar el trasplante, el poliomavirus no se determina por esa técnica de laboratorio, por lo que sería conveniente detectarlo en el binomio receptor-donador antes de realizar el TCPH.

Se ha observado que el poliomavirus no infecta a receptores que poseen antígenos HLA en especial el HLA-Cw , se observó en un estudio con 5 receptores renales que tenían el antígeno HLA-Cw7, se determinó que este antígeno es

protector contra el virus BK esto debido a que el 80% (4/5) receptores presentaban injertos funcionales sin recurrencia a la infección por el virus antes mencionado (40).

En nuestro estudio se encontró que el 28% (5/18) de receptores posee un antígeno HLA-Cw7 protector para el virus BK. De estos receptores sólo un receptor está infectado por el virus BK con $\approx 127,200$ copias del virus.

Los antígenos HLA-Cw son un grupo de genes que favorecen la producción de interferón que pueden tener un papel determinante en el nivel de actividad de las células NK. Este efecto se ha postulado debido a que las moléculas HLA-C son ligandos para los receptores inhibidores y activadores de las células NK, especialmente con infecciones virales (40). Los receptores tipo inmunoglobulina (KIR) de las NK representan una familia diversa de receptores inhibidores y activadores que son parte fundamental de este modelo antiviral (41).

Se han descrito las causas de mortalidad post-TCPH donde se observa que en el 70% corresponde a recaída de la enfermedad, en el 20% se da la EICH y en el 10% corresponde a pacientes infectados y el 10% presenta toxicidad a fármacos (42).

En el HIM-FG se describió que el 11% tuvo mortalidad temprana causada por colitis neutropénica y coagulación intravascular diseminada. Mientras que el 39% las causas de mortalidad se debió a múltiples infecciones virales (principalmente por el virus BK). El 7% (n=1/13) tuvo recaída de la enfermedad de manera tardía observándose 180 días post-TCPH.

10.0 Conclusiones.

- La presencia de anticuerpos anti-HLA en el 22% de los receptores está asociado con el rechazo primario del injerto.
- Los receptores se infectan principalmente por el poliomavirus BK.
- La presencia de anticuerpos anti-HLA que reconozcan la molécula HLA clase I y en conjunto con HLA clase II es de mal pronóstico.

11.0 Perspectivas.

El seguimiento de anticuerpos anti-HLA, ayudará al manejo personalizado de terapia inmunosupresora de manera post-trasplante.

De igual manera se podrá establecer y estandarizar un protocolo de desensibilización de manera personalizada de acuerdo al manual (The European Society for Blood and Marrow Transplantation).

12.0 Referencias.

1. Gaytán Morales F. et al. *Programa de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas del hospital Infantil de México Federico Gómez. Protoc Traspl células progenitoras Hematop.* 2011;1–95.
2. Jiang X, Kojo S, Harada M, Ohkohchi N, Taniguchi M, Seino KI. et al. *Mechanism of NKT cell-mediated transplant tolerance.* Am J Transplant. 2007;7(6):1482–90.
3. Mera Reina C, Roa Lara A, Ramírez Clavijo S. et al. *Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación.* Rev Ciencias la Salud. 2007;5(1):67–89.
4. Gaytán-morales F. et al. *Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) en Pediatría.* Gac Mex Oncol. 2013;12(3):174–81.
5. Ozdemir ZN, Civriz Bozdağ S. et al. *Graft failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* Transfus Apher Sci. 2018;57(2):163–7.
6. Dufour CVDSA. Graft Failure. In: Carreras Enric, Dufor Carlo, Montht Mohamad K, editor. *The EBMT Handbook, Hematopoietic Stem Cell transplantation and cellular therapies.* 2019th ed. European Society: Springer; 2019. p. 307–15.
7. Chang YJ, Zhao XY, Xu LP, Zhang XH, Wang Y, Han W, et al. *Donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies were associated with primary graft failure after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation: A prospective study with randomly assigned training and validation sets.* J Hematol Oncol. 2015;8(1):1–10.
8. Larocca A, Piaggio G, Podestà M, Pitto A, Bruno B, Di Grazia C, et al. *A boost of CD34 + -selected peripheral blood cells without further conditioning in patients with poor graft function following allogeneic stem cell transplantation.* Hematol J. 2006;91(7):935–40.

9. Masouridi-Levrat S, Simonetta F, Chalandon Y. et al. *Immunological Basis of Bone Marrow Failure after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Front Immunol. 2016 Sep 16;7:1–8.
10. Stein MI, Zhu J, Emerson SG. et al. *Molecular pathways regulating the self-renewal of hematopoietic stem cells*. Exp Hematol. 2004;32:1129–36.
11. Gress HN. et al. *Graft rejection by cytolytic T cells*. Transplantation. 1990;49(2):453–7.
12. Kernan NA, Flomenberg N, Dupont B, O'Reilly RJ. et al. *Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia*. Transplantation. (43) 1987. p. 842–7.
13. Kiessling R, Hochman PS, Haller O, Shearer GM, Wigzell H, Cudkovicz G. et al. *Evidence for a similar or common mechanism for natural killer cell activity and resistance to hemopoietic grafts*. Eur J Immunol. 1977;7(9):655–63.
14. Storb, Robert F Raff, Joachim Deeg Thomas; Loughran Jr Theodore C, Graham Joseph Aprile, George E Sale R. et al. *Characterization of Host Cells Involved in Resistance to Marrow Grafts in Dogs Transplanted From Unrelated DLA-Nonidentical Donors*. Blood. 1986;68(4):861–8.
15. Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. et al. *Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency (SCID) Evidence that natural killer cells can mediated the specificity of marrow graft rejection*. JExpMed. 1987;164(8):1212–7.
16. Bennett M, Taylor PA, Austin M, Baker MB, Schook LB, Rutherford M, et al. *Cytokine and cytotoxic pathways of NK cell rejection of class I-deficient bone marrow grafts: Influence of mouse colony environment*. Int Immunol. 1998;10(6):785–90.
17. Taylor MA, Ward B, Schatzle JD, Bennett M. et al. *Perforin- and Fas-dependent mechanisms of natural killer cell-mediated rejection of incompatible bone marrow cell grafts*. Eur J Immunol. 2002;32(3):793–9.

18. Murphy WJ, Keller JR, Harrison CL, Young HA, Longo DL. et al. *Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis in vitro and promote marrow engraftment in vivo*. Blood. 1992;80(3):670–7.
19. Segundo D, Fernandez-fresnedo G, Martían M, Arias M LHM. et al. *Células T reguladoras y tolerancia en trasplante: Efecto de la inmunosupresión farmacológica*. Inmunología. 2007;26(3):157–68.
20. Kronenberg M. et al. *Toward an understanding of NKT cell biology: Progress and paradoxes*. Annu Rev Immunol. 2005;23:877–900.
21. Barros de Oliveira C, Sakata R, Machado A, Gerola L, Salomão R. et al. *Citocinas y dolor*. Rev Bras Anesthesiol. 2011;61(2):137–42.
22. Yoshihara S, Maruya E, Taniguchi K, Kaida K, Kato R, Inoue T, et al. *Risk and prevention of graft failure in patients with preexisting donor-specific HLA antibodies undergoing unmanipulated haploidentical SCT*. Bone Marrow Transplant. 2012;47(4):508–15.
23. Mark B. et al. *C1q, Autoimmunity and Apoptosis*. Immunobiology. 2002;205:395–406.
24. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. et al. *Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis*. Nat Immunol. 2010;11(9):785–97.
25. Ferrà C, Sanz J, Díaz-Pérez MA, Morgades M, Gayoso J, Cabrera JR, et al. *Outcome of graft failure after allogeneic stem cell transplant: Study of 89 patients*. Leuk Lymphoma. 2015;56(3):656–62.
26. Spellman S, Bray R, Rosen-bronson S, Haagenson M, Klein J, Flesch S, et al. *Brief report The detection of donor-directed , HLA-specific alloantibodies in recipients of unrelated hematopoietic cell transplantation is predictive of graft failure*. 2010;115(13):2704–9.
27. Cutler C, Kim HT, Sun L, Sese D, Glotzbecker B, Armand P, et al. *Donor-specific anti-HLA antibodies predict outcome in double umbilical cord blood transplantation*. Blood. 2011;118(25):6691–8.

28. Ciurea SO, Thall PF, Milton DR, Barnes TH, Kongtim P, Carmazzi Y, et al. *Complement-Binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Risk of Primary Graft Failure in Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant* . 2015;21(8):1392–8.
29. Kara MS, Bruhn R, Roubinian NH, Chowdhury D, Qu L, Snyder EL, et al. *The impact of recipient factors on the lower-than-expected hemoglobin increment in transfused outpatients with hematologic diseases*. *Transfusion*. 2019;0:1–7.
30. Olsson RF, Logan BR, Chaudhury S, Zhu X, Bolwell BJ, Bredeson CN, et al. *Primary graft failure after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies*. *Leukemia*. 2016;29(8):1754–62.
31. La Rocca U, Perrone MP, Piciocchi A, Cinti P, Barberi W, Gozzer M, et al. *Anti-HLA donor-specific antibodies in allogeneic stem cell transplantation: management and desensitization protocol*. *Bone Marrow Transplant*. 2019;
32. Ciurea SO, Cao K, Fernandez-Vina M, Kongtim P, Malki M Al, Fuchs E, et al. *The european society for blood and marrow transplantation (EBMT) consensus guidelines for the detection and treatment of donor-specific Anti-HLA Antibodies (DSA) in Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation*. *Bone Marrow Transplant*. 2018;53(5):521–34.
33. Sádaba B. et al. *Monitoring and secondary effects of immunosuppressants in the transplant*. *An Sist Navar*. 2006;29(2):207–18.
34. Copelan EA. et al. *Hematopoietic stem-cell transplantation*. *N Engl J Med*. 2006 Apr 27; 354(17):1813–26.
35. Ljungman P, Morgan H, Michael B. et al. *Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients*. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25(1):1–18.
36. Jeffrey C. et al. *Epstein-Barr virus infection*. *N Engl J Med*. 2000;342(7):481–92.

37. Ohga S, Nomura A, Takada H, Hara T. et al. *Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection*. *Oncol Hematol*. 2002;44:203–15.
38. Padilla B, Bastida J., Virseda A., Labrador J, Caballero D, Silva J., et al. *Hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation*. *Gen Urol*. 2014;67(2):167–73.
39. Arthur R., K.H S, Baust S., Santos G. et al. *Association of BK viruria with hemmorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants*. *N Engl J Med*. 1986;315(4):230–4.
40. Gheith O, Al-Otaibi T, Zakaria Z, Halim MA, Nampoory N. et al. *Human leukocyte antigen Cw7-mediated protection against Polyoma BK virus in renal transplant recipients who received grafts from antigen-positive donors*. *Exp Clin Transplant*. 2015;13:383–7.
41. Khakoo SI, Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Collin R, Gao X, et al. *Virus Infection HLA and NK Cell Inhibitory Receptor Genes in Resolving Hepatitis C Virus Infection*. 2014;872(2004).
42. Duerst RE, Horan JT, Liesveld JL, Abboud CN, Zwetsch LM, Senf ES, et al. *Allogeneic bone marrow transplantation for children with acute leukemia: Cytoreduction with fractionated total body irradiation, high-dose etoposide and cyclophosphamide*. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(5):489–94.

13.0 Anexos.

13.1 Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO AUTORIZACION DE LOS PADRES

Estudio: Efecto de la presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico en el rechazo del injerto en pacientes en protocolo de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

Investigador: Dr. Felix Gaytan Morales

Dirección: Hospital Infantil de México Federico Gómez
Doctor Márquez 162, Colonia Doctores.
Cuauhtémoc Ciudad de México C.P. 06720

Teléfono: 52289917 Ext: 2333

Introducción:

Efecto de la presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico en el rechazo del injerto en pacientes en protocolo de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) es un tratamiento establecido para los niños con enfermedades onco-hematológicas en los cuales la quimioterapia no remite la enfermedad.

Las principales limitaciones de esta modalidad de tratamiento ha sido la alta tasa de fracaso y la enfermedad de injerto contra el huésped, que se producen debido a reacciones aloreactivas relacionadas con la incompatibilidad a nivel HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos) entre el receptor y el donador.

Los pacientes candidatos al TCPH pueden ser aloinmunizados a antígenos leucocitarios humanos por eventos como: embarazos, transfusiones y trasplantes previos. La sensibilización resultante puede incluir anticuerpos dirigidos contra antígenos HLA incompatibles con el probable donador de células progenitoras hematopoyéticas.

Estos anticuerpos se pueden detectar antes o después del trasplante, la presencia de estos en contra de los antígenos expresados en los órganos o tejidos donantes, cuando no se tratan clínicamente dan como resultado una respuesta inmune dañina

al órgano o tejido trasplantado y aumenta el riesgo de pérdida del injerto, atacando el endotelio del aloinjerto.

Por ello, es importante determinar la presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico y su asociación con la falla del injerto después del TCPH.

Objetivos de la Investigación:

Evaluar la presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico en pacientes con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

Procedimiento

Este proyecto de investigación se realizará en los pacientes con enfermedades hemato-oncológicas sometidos a TCPH. Si usted Autoriza que su Hijo(a) participe se realizara lo siguiente:

1. Se tomará 1.0 mL de sangre periférica en un tubo seco. En los pacientes de manera pre-trasplante (7 días antes del trasplante) y se realizará la determinación de anticuerpos anti-HLA donador específico
2. Las muestras se obtendrán a través del catéter venoso central (Hickman) que se coloca a todos los pacientes que ingresan a TCPH, solo en caso de que el catéter no funcione el retorno serán tomadas por punción de vena periférica.

¿Qué molestias puede presentar el paciente?

Debido a que las muestras se tomaran a través del catéter venoso central colocado en el paciente antes de ingresar a TCPH, las molestias serán mínimas, sin embargo, en el caso de que el catéter no funcione se tomaran las muestras a través de una vena periférica. Lo cual podría causar sangrado leve y equimosis (moretón).

¿Qué beneficios pueden esperarse?

Los beneficios de este estudio no serán directamente para su niño(a) y no recibirá un pago por la participación de su hijo(a) en este estudio. Si bien los beneficios directos para su hijo(a) pudieran no existir, los resultados del presente estudio ayudarán a ampliar el conocimiento sobre la importancia de la presencia de anticuerpos anti-HLA antes y después del TCPH y el estado clínico de los pacientes.

Participación del paciente en el estudio

La participación de su hijo(a) en este estudio es completamente voluntaria. Usted está en completa libertad de retirar a su hijo(a) de esta investigación en el momento que lo desee. Si usted decide que su hijo(a) no participe en este estudio, o en caso de haber aceptado y cambia posteriormente de opinión y desea retirarlo estando ya dentro del estudio, esto no afectará su seguimiento post-trasplante y no se le negará la atención necesaria para su tratamiento en este Hospital.

Privacidad y confidencialidad

La información de su hijo(a) que este fuera de su expediente y que pueda ser utilizada para identificarlo(a) (por ejemplo: nombre, dirección etc.) será guardada de manera confidencial.

La información de su hijo(a) será codificada en código alfanumérico.

Los resultados que se obtengan del estudio podrán ser publicados manteniendo siempre la confidencialidad del su hijo(a) a través de los códigos que lo(a) identifiquen y solo los investigadores tendrán acceso a ellos.

¿Qué pasa si se presentan complicaciones?

En caso de que se presenten complicaciones secundarias a la toma de muestras de sangre será atendido de acuerdo de forma oportuna, sin embargo como se mencionó previamente tomando en cuenta que se empleara el catéter para extraer las muestras de sangre el riesgo debe ser mínimo.

¿Cómo Resuelvo mis Dudas?

Los investigadores de este proyecto le explicarán de forma detallada toda la participación de su hijo(a) en este estudio. Si usted tiene dudas puede preguntarlas con confianza y los investigadores se las explicarán las veces que sean necesarias. Si durante la participación de su hijo(a) en el estudio le surge alguna duda, puede contactar a las siguientes personas:

Dr. Felix Gaytan Morales Teléfono 52289917 Ext: 2333

Declaración de consentimiento informado

Yo _____ declaro que se me ha explicado en qué consiste este estudio, además he leído y comprendido la información de este documento. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis dudas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y he entiendo que los resultados obtenidos en este estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Al firmar este formato estoy de acuerdo en que mi hijo(a) participe en este estudio de investigación. Se me dará una copia fechada y firmada de esta carta de consentimiento informado.

Nombre de la madre o tutor: _____

Firma _____

Fecha: _____

Nombre del padre o tutor: _____ Firma _____

Fecha: _____

Nombre del niño(a): _____

1. Testigo: _____

Firma _____

Fecha: _____

Dirección _____

Relación con el paciente _____

2. Testigo: _____

Firma _____

Fecha: _____

Dirección _____

Relación con el paciente _____

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Considero que comprendió la información descrita en este documento y que libremente da su consentimiento para que su hijo(a) participe en este estudio. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación en seres humanos y me apegó a ella.

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado: _____

Firma _____ Fecha _____

Teléfono: _____

Dirección: _____

13.2 Comité de ética.



HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



México, D.F., a 29 de noviembre del 2016

DI 4000/1435/2016


Dr. Felix Gaytan Morales
Jefe del servicio de la Unidad de Trasplante de médula ósea
Presente

Informo a usted, que los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad, después de revisar el protocolo **HIM 2017-039** "Efecto de la presencia de anticuerpos anti HLA donador específico en el rechazo del injerto en pacientes en protocolo de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas", emiten los siguientes dictámenes:

Comité de Investigación:	Pendiente de aprobación
Comité de Ética:	Aprobado
Comité de Bioseguridad:	Pendiente de aprobación

Requiere volver a presentar, preparar una nueva versión incorporando las observaciones.

Por el Comité de Investigación,


Dr. Juan Garduño Espinosa
Director de Investigación



JGE/JGO/ash



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM

DR. MÁRQUEZ 162, COL. DOCTORES, DEL CUAHUTÉMOC, C.P. 06730 MÉXICO D.F.
CONMUTADOR: 5228-9917 EXT. 4315 Y 4100
www.instituto-nacional-de-salud.mx