



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**“Determinación de anticuerpos anti-HLA, anti-MICA y anti-Eritrocitos  
en mujeres multigestas donadoras de sangre del Banco Central de  
Sangre, Centro Médico Nacional S XXI”**

**T E S I S I N A**

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA  
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**PRESENTA**

**Q.F.B. ROBERTO ÁNGEL FUENTES LANDA**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA**

\_\_\_\_\_

**VOCAL: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ**

\_\_\_\_\_

**SECRETARIO: M EN C. JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ**

\_\_\_\_\_

**1er. SUPLENTE: M EN C. MA. DE LOS ÁNGELES GRANADOS SILVESTRE**

\_\_\_\_\_

**2° SUPLENTE: DR. MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO**

\_\_\_\_\_

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE HLA DEL BANCO CENTRAL DE SANGRE, CMN S XXI, IMSS**

**ASESOR DEL TEMA.**

\_\_\_\_\_  
E.B.C. y M. en C. JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

**SUSTENTANTE**

\_\_\_\_\_  
Q.F.B. ROBERTO ÁNGEL FUENTES LANDA

**El presente trabajo fue desarrollado bajo la autorización del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el Laboratorio de HLA del Banco Central de Sangre del CMN S XXI, aprobado por el Sistema de Registro Electrónico en línea de la Coordinación de investigación en Salud (SIRELCIS) con número R-2012-3601-213**

## RESUMEN

Los Antígenos del Sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) son particularmente eficientes en la obtención de la respuesta inmunológica ya que pueden ser reconocidos directa o indirectamente por las células del sistema inmunológico. Esta eficiencia inmunogénica de los antígenos HLA es debido a su alto grado de polimorfismo que varía en los diferentes grupos de poblaciones, incrementando así la probabilidad de incompatibilidad en transfusiones o trasplantes de productos de la sangre, tejidos u órganos, induciendo de esta forma una respuesta inmunológica. En nuestro país se transfunden 1,200 000 personas al año, con un promedio de transfusiones de 2.3 unidades por paciente, siendo los concentrados eritrocitarios los más solicitados para transfusión, seguido del plasma. Un riesgo atribuible a la transfusión de plasma fresco congelado es el daño pulmonar agudo asociado a transfusión (TRALI). En este estudio se analizaron 100 muestras de suero de donadoras de sangre entre 18 y 65 años, con tres o más embarazos previos llevados a término que acuden al Banco Central de Sangre del CMN SXXI del IMSS y 20 controles de mujeres donadoras de sangre, en el mismo intervalo de edad, sin embarazos previos, ni algún otro factor que pudiera interferir en el estudio como transfusiones o trasplantes previos. Para la determinación de anticuerpos Anti-HLA Clase I, Clase II y Anti-MICA, se utilizó el analizador Luminex®; en lo que respecta a los anticuerpos Anti-Eritrocitos se empleó la técnica de salina rápida y salina Coombs, enfrentando el suero problema contra eritrocitos de fenotipo conocido (Panel de 4 células) representativos de la población. La identificación de anticuerpos anti-HLA CI/CII en mujeres multigestas

comparada con las donadoras nuligestas se realizó con dos reactivos de sensibilidad diferente, Screening y %PRA (Porcentaje del Panel Reactivo de Anticuerpos) específico, el primero de menor sensibilidad que el segundo. En Países desarrollados como Inglaterra, el Screening se realiza de manera rutinaria en las donadoras multigestas, sin embargo, al realizar el análisis estadístico de las muestras y controles de este estudio, se observó que con esta prueba no hay un valor de  $p$  significativo entre ellas, lo que lleva a pensar que en esos países la cantidad de rechazo para acceder a donar es alta debido a falsos positivos por la baja sensibilidad de la prueba ya que, al hacer la comparación de las muestras de este estudio con la segunda prueba de mayor sensibilidad, las diferencias son estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.0001$  para HLA CI y  $p < 0.002$  para HLA CII con un intervalo de confianza del 95%. En cuanto a la comparación de anticuerpos anti-MIC A entre las donadoras multigestas y las nuligestas no se encontró diferencias estadísticamente significativas a través del Screening, por lo cual se espera que este resultado cambie si se hace con una prueba de mayor sensibilidad. En ambas donadoras (multigestas y nuligestas) la búsqueda de anticuerpos anti-eritrocitos fue negativo, indicando que no hay una razón entre la presencia de estos anticuerpos atribuible a la cantidad de embarazos. Con el presente trabajo se comprobó que los anticuerpos anti-HLA están presentes en la mayoría de las mujeres multigestas y el uso de sus plasmas como terapia transfusional podría desencadenar eventos adversos posteriores a su administración, como lo es el TRALI.

## ÍNDICE.

RESUMEN .....	iv
ABREVIATURAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
<b>1. Consideraciones generales de la reacción Antígeno-Anticuerpo .....</b>	<b>1</b>
1.1. Los Anticuerpos.....	1
1.2. Los Antígenos. ....	3
1.3. Interacción Antígeno-Anticuerpo. ....	6
<b>2. El Sistema HLA.....</b>	<b>11</b>
2.1. Genes y moléculas del Sistema HLA Clase I. ....	11
2.2. Genes y moléculas del Sistema HLA Clase II. ....	12
2.3. Identificación del polimorfismo HLA .....	14
<b>3. Antígenos y Anticuerpos del Sistema HLA y de Eritrocitos.....</b>	<b>14</b>
3.1. Antígenos HLA .....	14
3.1.1 Antígenos HLA Clase I .....	15
3.1.2. Antígenos HLA Clase II. ....	16
3.1.3. Anticuerpos anti-HLA.....	16
3.2. Antígenos MICA. ....	18
3.2.1. Anticuerpos Anti-MICA. ....	19
3.3. Antígenos Eritrocitarios. ....	20
3.3.1. Antígenos del sistema ABO.....	20
3.3.2 Antígenos de otros sistemas no ABO.....	20
3.3.3. Anticuerpos Anti-Eritrocitos del sistema ABO.....	21
<b>4. Reacciones adversas a la transfusión.....</b>	<b>24</b>
4.1. Clasificación de las reacciones adversas a la transfusión.....	24
4.2. Relevancia Clínica del Sistema HLA en Transfusiones sanguíneas. ....	25
CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	29
<b>1. Planteamiento del problema.....</b>	<b>29</b>
CAPÍTULO III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	31
<b>1. Hipótesis. ....</b>	<b>31</b>

<b>2. Objetivos.....</b>	<b>32</b>
2.1. Generales.....	32
2.2. Particulares.....	32
 CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA.....	 33
1. Estudio de investigación.....	33
2. Muestras.....	33
3. Método empleado para la determinación de anticuerpos Anti-HLA y Anti-MICA.....	34
4. Técnicas empleadas en la determinación de anticuerpos Anti-Eritrocitos.....	35
5. Análisis estadístico.....	36
 CAPÍTULO V. RESULTADOS.....	 37
<b>1. Frecuencias.....</b>	<b>37</b>
1.1. Grupos Sanguíneos.....	37
1.2. Edad.....	39
1.3. Gestas.....	41
1.4. Rastreo de anticuerpos.....	42
1.5 MIC A.....	45
1.6. %PRA específico.....	47
 <b>2. Análisis estadístico.....</b>	 <b>54</b>
2.1. MIC A Muestras vs. Controles.....	54
2.2. Screening CI Muestras vs. Controles.....	56
2.3. Screening CII Muestras vs. Controles.....	57
2.4. PRA CI Muestras vs. Controles.....	59
2.5 PRA CII Muestras vs. Controles.....	60
 CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.....	 62
 CAPÍTULO VII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	 68
<b>1. Conclusión.....</b>	<b>68</b>
<b>2. Perspectivas.....</b>	<b>69</b>
 CAPÍTULO VIII. ANEXOS.....	 70
<b>1. Guía para determinar anticuerpos anti-MIC A y anti-HLA CI y CII (LABSCREEN®).....</b>	<b>70</b>
<b>2. Guía para determinar anticuerpos anti-Eritrocitos.....</b>	<b>71</b>
<b>3. Carta de consentimiento bajo información.....</b>	<b>72</b>
 CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA.....	 73



## ABREVIATURAS.

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AGO	Antecedentes Gineco Obstétricos
BCS	Banco Central de Sangre.
BCR	Receptor de Linfocitos B
CMN	Centro Médico Nacional.
EHRN	Enfermedad Hemolítica del Recién Nacido
EIVH	Enfermedad Injerto <i>versus</i> Hospedero post-transfusión
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FUA	Fecha Última de Aborto
FUP	Fecha Última de Parto
GS	Grupo Sanguíneo
HLA CI/CII	Antígenos Leucocitarios Humanos Clase I/Clase II, en inglés.
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos, en inglés.
Ig	Inmunoglobulina
ISBT	Sociedad Internacional de Medicina Transfusional, en inglés
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad, en inglés.
MICA	Proteína A Relacionada a la Cadena del MHC Clase I, en inglés.
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PRA	Panel Reactivo de Anticuerpos Anti-HLA.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa, en inglés

PFC	Plasma Fresco Congelado.
SHOT	<i>Serious Hazards Of Transfusion</i>
SSO	Oligonucleótidos de Secuencia Específica, en inglés
SSP	Iniciadores de Secuencia Específica, en inglés
TCR	Receptor de Linfocitos T
TRALI	<b>Daño Pulmonar Agudo Asociado a Transfusión, en inglés.</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de un Anticuerpo .....	2
<b>Figura 2.</b> Mapa del Complejo Principal de Histocompatibilidad .....	13
<b>Figura 3.</b> Estructura de las Moléculas HLA de Clase I .....	16
<b>Figura 4.</b> Estructura de las Moléculas HLA de Clase II .....	16
<b>Figura 5.</b> Frecuencia de hemotipos en las muestras .....	37
<b>Figura 6.</b> Frecuencia de hemotipos en los controles .....	38
<b>Figura 7.</b> Frecuencia de edad en las muestras .....	39
<b>Figura 8.</b> Frecuencia de edad en los controles .....	40
<b>Figura 9.</b> Frecuencia de gestas en las muestras .....	41
<b>Figura 10.</b> Resultados de Screening (rastreo de anticuerpos anti-HLA CI/CII) en las muestras .....	42
<b>Figura 11.</b> Resultados de Screening (rastreo de anticuerpos anti-HLA CI/CII) en los controles .....	43
<b>Figura 12.</b> Resultados de la búsqueda de anticuerpos anti-MIC A en muestras .....	45
<b>Figura 13.</b> Resultados de la búsqueda de anticuerpos anti-MIC A en controles .....	46
<b>Figura 14.</b> Resultados de la identificación de anticuerpos anti-HLA CI/CII en las muestras .....	47
<b>Figura 15.</b> Resultados de la identificación de anticuerpos anti-HLA CI/CII en los controles .....	48
<b>Figura 16.</b> Frecuencia y especificidad de los anticuerpos encontrados contra HLA CI .....	51
<b>Figura 17.</b> Frecuencia y especificidad de los anticuerpos encontrados contra HLA CII .....	53
<b>Figura 18.</b> Gráfica de comparación de anticuerpos MIC A Muestras vs. Controles .....	54
<b>Figura 19.</b> Gráfica de comparación del rastreo de anticuerpos anti-HLA CI Muestras vs. Controles .....	56
<b>Figura 20.</b> Gráfica de comparación del rastreo de anticuerpos anti-HLA CII Muestras vs. Controles .....	57

<b>Figura 21.</b> Gráfica de comparación del PRA específico anti-HLA CI Muestras vs. Controles .....	59
<b>Figura 22.</b> Gráfica de comparación del PRA específico anti-HLA CII Muestras vs. Controles .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Propiedades fisicoquímicas de las Ig's humanas .....	2
<b>Tabla 2.</b> Numeración y símbolos ISBT para los antígenos más importante de los sistemas de grupos sanguíneos.....	23
<b>Tabla 3.</b> Componentes transfundidos y bajas durante 2012.....	29
<b>Tabla 4.</b> Frecuencia de hemotipos en donadoras multigestas.....	37
<b>Tabla 5.</b> Frecuencias de hemotipos en donadoras nuligestas .....	38
<b>Tabla 6.</b> Frecuencia de edades en donadoras multigestas.....	39
<b>Tabla 7.</b> Frecuencia de edades en donadoras nuligestas.....	40
<b>Tabla 8.</b> Número de gestas en donadoras multigestas.....	41
<b>Tabla 9.</b> Resultados de Screening en donadoras multigestas .....	42
<b>Tabla 10.</b> Resultados de Screening en donadoras nuligestas .....	43
<b>Tabla 11.</b> Resultados de anticuerpos anti-MIC A en donadoras multigestas .....	45
<b>Tabla 12.</b> Resultados de anticuerpos anti-MIC A en donadoras nuligestas .....	46
<b>Tabla 13.</b> Resultados de PRA específico en donadoras multigestas.....	47
<b>Tabla 14.</b> Resultados de PRA específico en donadoras nuligestas.....	48
<b>Tabla 15.</b> Especificidades de anticuerpos encontrados en %PRA específico contra HLA CI .....	49
<b>Tabla 16.</b> Especificidades de anticuerpos encontrados en %PRA específico contra HLA CII .....	52
<b>Tabla 17.</b> Tabla de contingencia MIC A Muestras vs Controles.....	54
<b>Tabla 18.</b> Pruebas de chi-cuadrada MIC A Muestras vs Controles.....	54
<b>Tabla 19.</b> Tabla de contingencia Screening CI Muestras vs Controles .....	56
<b>Tabla 20.</b> Pruebas de chi-cuadrada Screening CI Muestras vs Controles.....	56
<b>Tabla 21.</b> Tabla de contingencia Screening CII Muestras vs Controles.....	57

<b>Tabla 22.</b> Pruebas de chi-cuadrada Screening CII Muestras vs Controles.....	57
<b>Tabla 23.</b> Tabla de contingencia PRA CI Muestras vs Controles.....	59
<b>Tabla 24.</b> Pruebas de chi-cuadrada PRA CI Muestras vs Controles.....	59
<b>Tabla 25.</b> Tabla de contingencia PRA CII Muestras vs Controles.....	60
<b>Tabla 26.</b> Pruebas de chi-cuadrada Muestras vs Controles .....	60
<b>Tabla 27.</b> Prevalencia de anticuerpos anti-HLA en población de donadores.....	64

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

### 1. Consideraciones generales de la reacción Antígeno-Anticuerpo

#### 1.1. Los anticuerpos.

Un anticuerpo se define como una inmunoglobulina capaz de una combinación específica con el antígeno que ha causado su producción en un animal susceptible y que es reconocido por el BCR y TCR. Ellos son producidos en respuesta a la invasión de moléculas foráneas en el cuerpo. Los anticuerpos existen como una o más unidades en forma de "Y", compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas. Cada "Y" contiene dos copias idénticas de una cadena pesada (HC, heavy chain), y dos copias idénticas entre sí de una cadena ligera (LC, light chain), llamadas así por sus pesos moleculares relativos que son de aproximadamente 50kDa la cadena pesada y de cerca de 25kDa la cadena ligera. Estas cadenas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuros intercatenarios. Estas cadenas pueden separarse por reducción de los enlaces S-S y acidificación (Figura 1).<sup>1</sup>

Los anticuerpos pueden ser divididos en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, basado en el número de unidades "Y" y en el tipo de cadena pesada. Las cadenas pesadas de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, son conocidas como *gamma*, *mu*, *alpha*, *delta* y *epsilon* (g, m, a, d y e), respectivamente. Las cadenas ligeras de cualquier anticuerpo pueden ser clasificadas como tipo *kappa* (k) o *lambda* (l), basadas en pequeñas diferencias estructurales polipeptídicas; sin embargo, las cadenas pesadas determinan la subclase de cada anticuerpo (Tablas 1).<sup>2</sup>

**Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las inmunoglobulinas humanas.**

Immunoglobulina	Cadena pesada	Cadena ligera	Coefficiente de Sedimentación	PM Wt (M <sub>r</sub> )	M <sub>r</sub> Cadena pesada	Contenido carbohidratos(%)	A <sub>280nm</sub>	pl
IgG <sub>1</sub>	λ <sub>1</sub>	κ, λ	7S	146 000	50 000	2-3	13.8	5.0-9.5
IgG <sub>2</sub>	λ <sub>1</sub>	κ, λ	7S	146 000	50 000	2-3		5.0-8.5
IgG <sub>3</sub>	λ <sub>1</sub>	κ, λ	7S	170 000	60 000	2-3		8.2-9.0
IgG <sub>4</sub>	λ <sub>1</sub>	κ, λ	7S	146 000	50 000	2-3		5.0-6.0
IgM	μ	κ, λ	19S	900 000	68 000	12	12.5	5.1-7.8
IgA <sub>1</sub>	α <sub>1</sub>	κ, λ	7S	160 000	56 000	7-11	13.4	5.2-6.6
IgA <sub>2</sub>	α <sub>2</sub>	κ, λ	7S	160 000	52 000	7-11		5.2-6.6
IgA <sub>3</sub>	α <sub>1</sub> , α <sub>2</sub>	κ, λ	11S	370 000	52-56 000	11		4.7-6.2
IgD	δ	κ, λ	7S	184 000	68 000	12	17.0	-
IgE	ε	κ, λ	8S	190 000	72 000	12	15.3	-

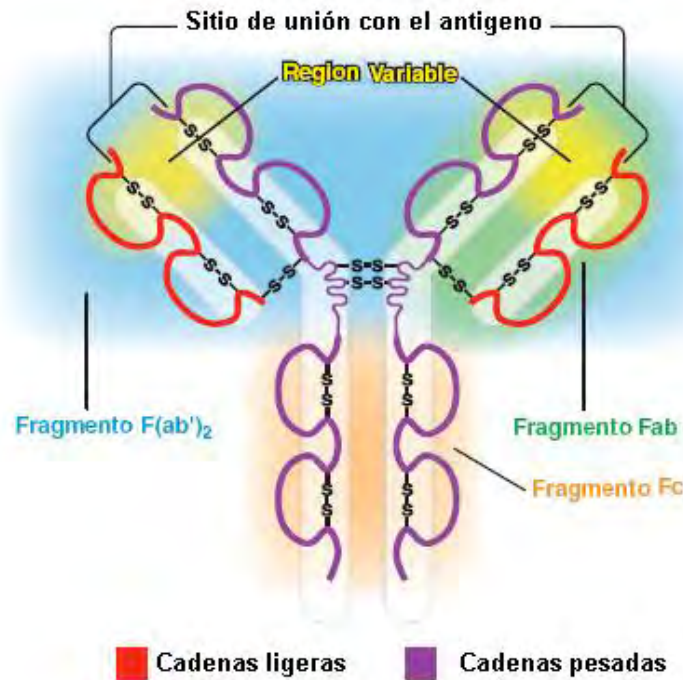


Fig. 1 Estructura de un Anticuerpo [Bloisi, R.M. 1988. Principles of Immunology and Immunodiagnostic. Ed. Lea/Tebiger]

Las subclases de anticuerpos difieren en el número de puentes disulfuro y la longitud de la región “bisagra”. El anticuerpo más comúnmente usado en ensayos inmunoquímicos es el de la clase IgG debido a que son las inmunoglobulinas más



abundantes en la circulación en el suero, la región bisagra expuesta tiene estructura extendida debido al alto contenido de prolina, por lo que es vulnerable al ataque proteolítico; en consecuencia, es muy fácil escindir la molécula en el laboratorio mediante papaína, para obtener dos fragmentos Fab (llamados así por el fragmento que contiene el sitio de unión al antígeno por sus siglas en inglés) idénticos, cada uno con un único sitio de combinación para el antígeno, y un tercer fragmento, Fc (fragmento que cristaliza), que carece de capacidad para fijar el antígeno. La pepsina ataca en otro punto y escinde el Fc del resto de la molécula, para separar un fragmento 5S de gran tamaño que se designa F(ab')<sub>2</sub>, dado que se mantiene divalente con respecto a la fijación al antígeno, al igual que el anticuerpo original (Figura 1). La región entre los fragmentos Fab y Fc es a la que se le llama bisagra. Este segmento le permite movimiento lateral y rotacional de los dos dominios que se unen al antígeno. Una cadena 12 ligera asociada con la región amino-terminal de una cadena pesada forman un dominio de unión al antígeno. Las regiones carboxi-terminal de las dos cadenas pesadas se doblan juntas para formar el dominio Fc.<sup>3</sup>

## **1.2. Los Antígenos**

El principio básico de cualquier técnica inmunoquímica es el de que un anticuerpo específico se unirá con un antígeno específico para dar un complejo anticuerpo-antígeno exclusivo. La definición clásica de antígeno es cualquier sustancia foránea que induce una respuesta inmunitaria cuando es introducida dentro de tejidos de animales susceptibles y que son capaces de combinar con los anticuerpos específicos formados, y en un contexto más actual, al antígeno lo

podemos definir como una molécula que dada sus características es capaz de ser reconocida por los receptores clonales del sistema inmunológico es decir, el receptor de células B y el receptor de células T (BCR y TCR).

Los antígenos son generalmente de alto peso molecular y comúnmente son proteínas o polisacáridos. Polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos y otras moléculas pueden también funcionar como antígenos. La respuesta inmunitaria puede también ser generada contra sustancias pequeñas, llamadas haptenos, si estos están acoplados a una proteína acarreadora, como la albúmina de suero bovino (BSA) u otras matrices sintéticas. Una variedad de moléculas como drogas, azúcares simples, aminoácidos, pequeños péptidos, fosfolípidos o triglicéridos pueden funcionar como haptenos. Así, dándole suficiente tiempo, cualquier sustancia foránea será identificada por el sistema inmunológico y evocara la producción de un anticuerpo específico. Sin embargo, esta respuesta inmunitaria específica es altamente variable y depende mucho en parte del tamaño, estructura y composición de los antígenos. Los antígenos que inducen una fuerte respuesta inmunitaria se dice que son altamente inmunogénicos.

Las partes de las regiones hipervariables del anticuerpo que contactan con el antígeno se denominan parátomos y la región de un antígeno que puede específicamente unirse a un anticuerpo es llamado epítomo. Un epítomo no tiene una propiedad intrínseca de alguna estructura particular. Estos son usualmente uno a seis monosacáridos o 5-8 residuos de aminoácidos sobre la superficie del antígeno.<sup>4</sup>

Debido a que la molécula de antígeno existe en el espacio, el epítipo reconocido por un anticuerpo puede depender de la presencia de una específica conformación tridimensional del antígeno (por ejemplo, un sitio único formado por la interacción de dos "loops" o subunidades de una proteína nativa) o el epítipo puede corresponder a una región de una secuencia primaria simple, así, los epítipos son descritos como conformacionales y lineares, respectivamente. El rango de posibles sitios de unión es enorme, ya que cada sitio de unión tiene sus propias propiedades estructurales derivadas de enlaces covalentes, iónicos e interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas.<sup>1,2</sup>

Para que exista una eficiente interacción entre el antígeno y el anticuerpo, el epítipo debe estar fácilmente disponible para la unión. Si la molécula blanco es desnaturalizada, por ejemplo, por la fijación, cambios de pH o durante la preparación para el corrimiento en un gel de electroforesis, el epítipo puede ser alterado y esto puede afectar su habilidad para interactuar con un anticuerpo. Algunos anticuerpos son inefectivos en un "*Western blot*" pero muy bueno en inmunohistoquímica debido a que en el proceso, un complejo sitio antigénico puede ser mantenido en el tejido, mientras que en el otro procedimiento la preparación de la muestra altera la conformación de la proteína lo suficiente para destruir el sitio antigénico y así elimina el sitio de unión con el anticuerpo.<sup>3</sup>

Si el producto de un gene de interés está presente en concentraciones extremadamente bajas, una opción puede ser el uso de la información de la secuencia conocida de nucleótidos para derivar el correspondiente péptido para generar anticuerpos específicos para esa secuencia.

*Características de un buen antígeno incluyen:*

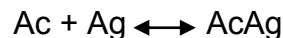
- Áreas de estabilidad estructural dentro de la molécula
- Un peso molecular mínimo de 8000 a 10000 Daltons, aunque los haptenos con pesos moleculares tan bajos como 200 Da han sido usados en presencia de proteínas acarreadoras
- La habilidad de ser procesado por el sistema inmunológico
- Regiones inmunogénicas accesibles al mecanismo formado por el anticuerpo
- Elementos estructurales que sean suficientemente diferentes al huésped
- Para péptidos antígenos, regiones que contengan por lo menos 30% de aminoácidos inmunogénicos: Lisina, Arginina, Ácido glutámico, Ácido aspártico, Glutamina y Asparagina.
- Para péptidos antígenos, significativa hidrofobicidad o residuos cargados.<sup>3</sup>

### **1.3. Interacción Antígeno-Anticuerpo**

Los antígenos y anticuerpos interactúan por complementariedad espacial y no por uniones covalentes. La asociación específica del antígeno y el anticuerpo es dependiente de los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y las fuerzas de *van der Waals*; por lo general solo son efectivas en distancias cortas. Todos estos son uniones débiles no covalentes, aunque algunas de las asociaciones entre antígeno y anticuerpo pueden ser bastante fuertes. Al igual que los anticuerpos, los antígenos pueden ser multivalentes, ambos a través de diversas copias del mismo epítipo, o mediante la presencia de diferentes epítopos que son reconocidos por múltiples anticuerpos. Las interacciones que

involucran multivalencias pueden producir mayor estabilidad a los complejos, sin embargo la multivalencia puede también resultar en dificultades estéricas, por lo tanto reduciendo la posibilidad de unión.<sup>1</sup>

Los haptenos de tamaño pequeño en sí son monovalentes en lo que respecta a la reacción con el anticuerpo. En un experimento donde se mezcló el hapteno con el anticuerpo en una bolsa de diálisis se mostró que la combinación con el anticuerpo era reversible y que el complejo así formado podría disociarse con facilidad en función de la fuerza de unión, a la que denominamos afinidad. En la situación simplista de un brazo de unión Fab aislado a un epítipo en el antígeno, la fuerza de unión puede definirse mediante la constante de equilibrio  $K_A$  de la reacción de asociación:



Como todas las uniones antígeno-anticuerpo son reversibles y siguen los principios básicos termodinámicos de cualquier interacción reversible bimolecular, tenemos que:

$$K_A = \frac{[Ac-Ag]}{[Ac][Ag]}$$

donde  $K_A$  es la constante de afinidad,  $[Ac]$  y  $[Ag]$  son las concentraciones molares de los sitios de unión no ocupados del anticuerpo y del antígeno, respectivamente, y  $[Ac-Ag]$  es la concentración molar del complejo antígeno-anticuerpo. Si el anticuerpo y el antígeno encajaban juntos de modo muy íntimo, el equilibrio estaría bien a la derecha de la reacción de asociación; nos referimos a estos anticuerpos que se unen con fuerza al antígeno como anticuerpos de alta afinidad.

Así mismo la afinidad puede definirse en términos de la constante de disociación ( $K_D$ ) de la reacción:



Si las concentraciones se expresan en moles por litro:

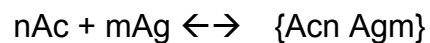
$$K_D = \frac{[\text{moles de Ac/L}][\text{moles de Ag/L}]}{[\text{moles de AcAg/L}]}$$

Es claro que  $K_D$  es la recíproca de  $K_A$ , es decir,  $1/K_A$  y sus unidades son moles/L o M. Al contrario,  $K_A$  se expresa en las unidades L/mol o  $M^{-1}$  y tiene la ventaja de que cuanto mayor es la fuerza de unión la cifra es más alta.

El tiempo que toma en alcanzar el equilibrio es dependiente de la velocidad de difusión y de la afinidad del anticuerpo sobre el antígeno y puede variar ampliamente. Las constantes de afinidad de unión antígeno-anticuerpo pueden abarcar un amplio rango, extendiéndose por debajo de  $10^5 \text{ mol}^{-1}$  hasta más de  $10^{12} \text{ mol}^{-1}$ . Las constantes de afinidad pueden ser afectadas por la temperatura, el pH y los solventes.<sup>2,3</sup>

La afinidad describe la fuerza de interacción entre anticuerpo y antígeno en un solo sitio antigénico. Dentro de cada sitio antigénico, las regiones variables del anticuerpo interactúa a través de fuerzas débiles, no covalentes con el antígeno en numerosos sitios. Mientras que el término afinidad describe la unión del anticuerpo a un hapteno monovalente o a un solo determinante antigénico, en la mayoría de las circunstancias prácticas nos preocupamos por la interacción con el antisuero (es decir, el suero proveniente de un individuo inmunizado) con un antígeno multivalente. El término empleado para expresar esta unión es la avidéz o afinidad

funcional. La avidéz es la fuerza con la que el anticuerpo multivalente se une a un antígeno multivalente. Aunque depende de las afinidades individuales de cada uno de los determinantes existentes de ese antígeno, su valor es mucho mayor que la suma de afinidades. Por otro lado, hay que considerar que los Antígenos naturales suelen tener más de un tipo de determinante antigénico. Cuando un antígeno de este tipo entra en un individuo, éste produce un antisuero, que presenta varios tipos de anticuerpos, cada uno de ellos dirigidos a un tipo diferente de determinante antigénico del Antígeno original. En este caso se habla de avidéz del antisuero, que es la fuerza conjunta de los distintos anticuerpos de ese antisuero que reconocen al antígeno multivalente complejo:



donde n representa la heterogeneidad del anticuerpo, y m los distintos tipos de epítomos del antígeno.<sup>4</sup>

Los factores que contribuyen a la avidéz del antisuero son complejos, pero uno muy interesante es el derivado de la multivalencia del antígeno. La fuerza de unión de un antígeno complejo multivalente a varios tipos de anticuerpo es mucho mayor que la suma aritmética de las fuerzas de unión de cada anticuerpo: La avidéz refleja mejor la situación fisiológica, pero la afinidad nos caracteriza lo que ocurre con cada tipo de anticuerpo concreto en su interacción con el epítomo.

La avidéz es quizá una medida más informativa de toda la estabilidad o la fuerza del complejo antígeno-anticuerpo. Esto es controlado por tres factores: la afinidad anticuerpo-epítomo; las valencias de ambos, la concentración de antígeno y anticuerpo; y el arreglo estructural de las partes que interactúan. Cuando el anticuerpo y el antígeno pueden formar complejos multivalentes, la fuerza de

interacción es grandemente incrementada. Estos factores definen la especificidad del anticuerpo, que es, la probabilidad de que un anticuerpo particular se una a un preciso epítipo del antígeno. Dado que la intensidad de la reacción puede cuantificarse por la afinidad o la avidéz, relacionaríamos la especificidad de un antisuero con su avidéz relativa por los antígenos para los que están siendo discriminados.

Al reconocer que un antisuero puede tener una avidéz relativamente mayor por un antígeno que por otro, indicamos que el antisuero despliega una especificidad relativa más que absoluta; en la práctica se habla de grados de reactividad cruzada. La reactividad cruzada se refiere a un anticuerpo o población de anticuerpos unidos a epítopos sobre otros antígenos. Esto puede ser causado por: la baja avidéz o por distintos antígenos que tienen idénticos o muy similares epítopos. La reactividad cruzada es a veces deseable cuando uno quiere una unión general a un grupo relacionado de antígenos o cuando se intenta clasificar especies cruzadas cuando la secuencia del epítipo del antígeno no está muy altamente conservada en la evolución.

Los aminoácidos que forman el sitio de unión del antígeno son derivados de ambas cadenas, la pesada y la ligera, y corresponden a los aminoácidos de las regiones hipervariables determinadas por la secuencia de la proteína. Las regiones hipervariables son conocidas como las regiones determinantes de la complementariedad o CDRs (por sus siglas en inglés, *Complementarity Determining Regions*). Los CDRs son seis, tres de cada cadena, y estos forman loops discretos anclados y orientados por las estructuras de los residuos de los dominios variables.<sup>1,2,3</sup>



## **2. El Sistema HLA.**

El sistema HLA consiste en un grupo de genes estrechamente relacionados localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (localización específica en el segmento 6p21.3) que codifican para moléculas de superficie celular altamente polimórficas, las cuales, su principal función es la presentación antigénica de péptidos al sistema inmunológico para poder iniciar una respuesta inmunitaria adaptativa. Un número de moléculas co-estimuladoras (por ejemplo: CD80, CD86) y moléculas de adhesión como ICAM-1 (CD54) y LFA-3 (CD58) contribuyen también a estas interacciones. Basados en algunas de sus características moleculares y funcionales, se han descrito dos principales tipos de genes y moléculas HLA: HLA Clase I y HLA Clase II. Las moléculas de Clase I y Clase II son glicoproteínas compuestas de dos cadenas proteínicas diferentes (heterodímeros).<sup>13</sup>

### **2.1. Genes y moléculas del Sistema HLA Clase I.**

Estos genes codifican para las cadenas pesadas  $\alpha$  de las moléculas clásicas HLA-A, -B y -C, las no clásicas HLA-E, -F y -G y las relacionadas con las cadenas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) MICA y MICB. El gen para la cadena ligera no covalentemente asociada a clase I,  $\beta$ -2 microglobulina, está localizado en el cromosoma 15. Las moléculas de HLA Clase I (A, B, C) son expresadas en la mayoría de los tejidos y células nucleadas incluyendo linfocitos T y B, granulocitos y plaquetas y en menor grado en tejido endócrino, músculo esquelético y células del sistema nervioso central. Las moléculas HLA-E, -F, -G se

encuentran en una distribución tisular más restringida. Las moléculas MICA y MICB son expresadas de manera normal en Timo, córnea, fibroblastos, células endoteliales, intestinales y tumorales epiteliales. Estas moléculas presentan primordialmente, pero no exclusivamente, péptidos endógenos antigénicos para células T CD8+.<sup>7,29</sup>

## **2.2. Genes y moléculas del Sistema HLA Clase II.**

Los genes del sistema HLA Clase II incluyen los clásicos HLA- DRB1, -DQB1, -DQA1, -DPA1, -DPB1 y los no clásicos HLA-DMA, -DMB, -DOA y -DOB, los cuales tienen una estructura similar a los genes clásicos, pero muestran limitado polimorfismo.

Las moléculas de HLA Clase II son constitutivamente expresadas en linfocitos B, monocitos y células dendríticas, pero también pueden ser encontradas en linfocitos T activados y granulocitos activados<sup>13</sup>. La expresión de las moléculas de Clase II puede ser inducida en un número de células como fibroblastos y células endoteliales como resultado de la activación y/o el efecto de ciertas citocinas inflamatorias como son IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  e IL-10. Moléculas de HLA Clase II (DR, -DQ y -DP) están involucrados en la presentación de péptidos derivados de patógenos exógenos a linfocitos T CD4+. Una vez activados, los Linfocitos T CD4+ promueven la maduración y diferenciación de efectores celulares y humorales.

Tanto las moléculas clásicas y no clásicas HLA Clase I y II pueden encontrarse en forma soluble y se ha sugerido que las moléculas de Clase I podrían jugar un

papel importante en la inducción de tolerancia periférica o tener un efecto inmunomodulador en la transfusión sanguínea.

La región HLA del MHC también contiene genes que codifican para otro diverso grupo de moléculas incluyendo los polipéptidos de bajo peso molecular LMP2 y LMP7, los transportadores TAP1 y TAP2 y Tapasina involucrados en el procesamiento, transporte y carga de péptidos antigénicos HLA Clase I<sup>4,15,16</sup>. Otros genes que codifican para componentes del complemento, factor de necrosis tumoral (TNF) y proteínas de choque térmico (HSPs) están localizados en los genes de Clase III (Fig. 2).<sup>14</sup>

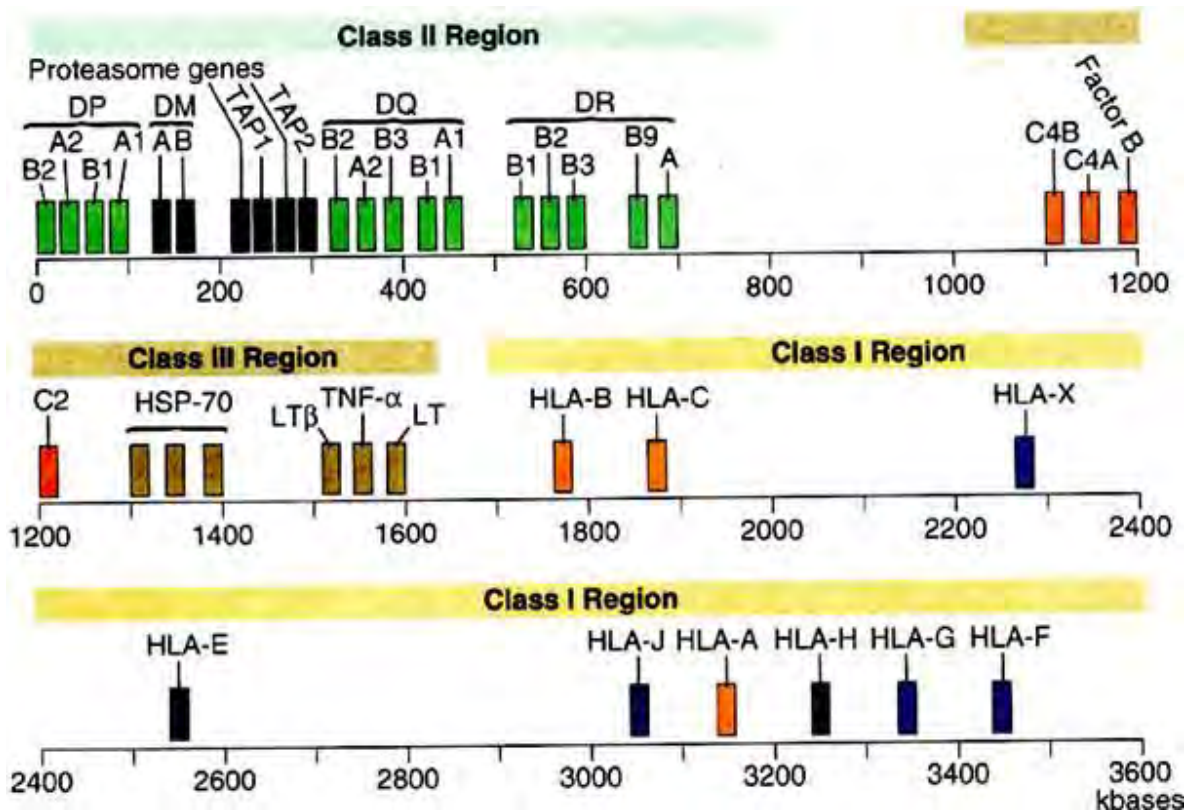


Fig. 2 Mapa del Complejo Principal de Histocompatibilidad. [Abbas. Inmunología Celular y Molecular, cuarta Ed]

### **2.3. Identificación del polimorfismo HLA.**

Las técnicas utilizadas para identificar el polimorfismo HLA están basados en la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), en donde se amplifican la región específica de DNA a ser analizada. Estas técnicas incluyen PCR-SSP (iniciadores de secuencia específica), PCR-SSO (oligonucleótidos de secuencia específica) y Tipificación basada en secuenciación de DNA (SBT)<sup>7,27,28</sup>

### **3. Antígenos y Anticuerpos del Sistema HLA y de Eritrocitos.**

#### **3.1. Antígenos HLA**

Los antígenos de los leucocitos humanos (HLA) forman un sistema complejo organizado bajo determinaciones de bases genéticas (genes) de donde resultan productos moleculares que son de vital importancia en la regulación inmunitaria, las transfusiones y los trasplantes de órganos y tejidos. Existen varios antígenos en la superficie celular de las plaquetas, algunos de los cuales son compartidos con otro tipo de células. Los anticuerpos significativos que reaccionan con plaquetas caen dentro de tres grupos: anticuerpos anti ABO, anticuerpos anti HLA y anticuerpos a antígenos específicos plaquetarios.<sup>5</sup>

Los genes de los antígenos del sistema HLA están localizados en el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), en el brazo corto del cromosoma 6 que se hereda en bloque como un haplotipo, distribuidos en diferentes loci estrechamente ligados y denominados como Clase I = A, B, C y Clase II = DR, DQ, DP. Estos genes contribuyen al reconocimiento de los antígenos propios y no propios ante la respuesta inmunitaria a un estímulo antigénico, coordinando así la respuesta de

inmunidad celular y humoral. Los productos del gen HLA son moléculas de glicoproteínas que se encuentran expresados con intensidades variables sobre la membrana de la mayoría de las células del cuerpo humano incluyendo: linfocitos, granulocitos y monocitos, además de plaquetas. Los eritrocitos maduros pierden la expresión de antígenos HLA, aunque como normoblastos nucleados si lo expresan. Después del sistema de antígenos ABO (que es el más importante), sigue el sistema HLA y están directamente relacionado con:

1. El éxito en el trasplante de medula ósea y en la selección del “donante ideal” para un trasplante.
2. Generación de anticuerpos anti-HLA relacionadas a la presentación de reacciones adversas a la transfusión como:
  - Refratariedad plaquetaria mediada por reacción inmunológica.
  - Reacciones febriles no hemolíticas.
  - Daño Pulmonar Agudo Asociado a la Transfusión (TRALI).
  - Enfermedad Injerto *versus* Hospedero post-transfusión (EIVH).

### **3.1.1. Antígenos HLA Clase I.**

La presencia y expresión de estos antígenos esta codificada genéticamente y localizada en los loci A, B y C. Son antígenos formados por dos cadenas: una de glicoproteínas pesadas (alfa) y una ligera (beta, muy similar a la beta 2 microglobulina). La función biológica de este grupo de antígenos HLA clase I es intervenir en el brazo eferente de la inmunidad celular, destruir células con antígenos extraños a la propia constitución corporal del individuo e interaccionan con linfocitos T citotóxicos, (Linfocitos T CD8<sup>+</sup>). (Figura 3).

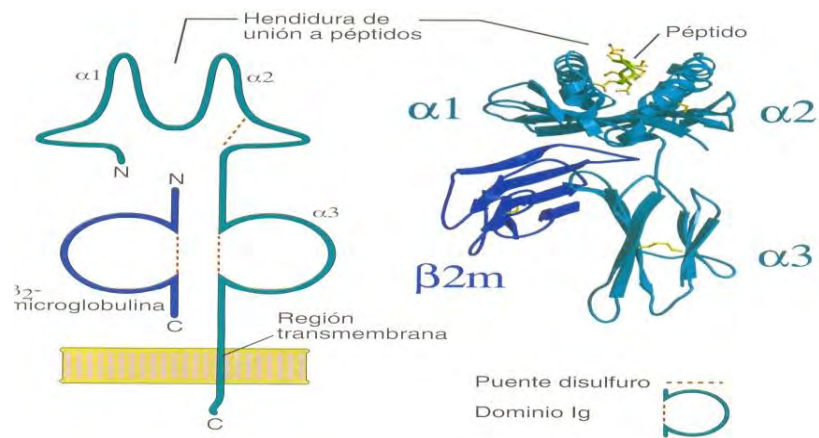


Fig. 3 Estructura de las moléculas de Clase I. [Abbas. Inmunología Celular y Molecular, cuarta Ed]

### 3.1.2. Antígenos HLA Clase II.

La presencia y expresión de estos antígenos está codificada por estos genes ubicados en los loci DR, DQ, DP; están constituidos por dos cadenas glucoprotéicas alfa y beta e intervienen en el brazo aferente de la inmunidad, diseñada para conocer nuevos antígenos mediante interacción con los linfocitos T cooperadores (T CD4<sup>+</sup>). (Figura 4).

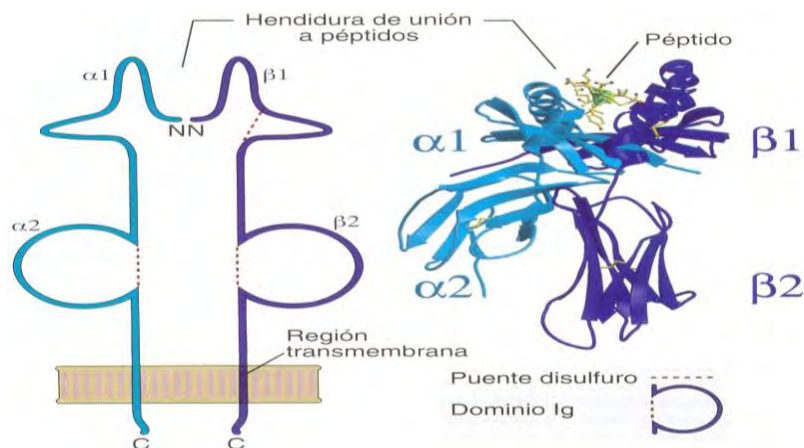


Fig. 4. Estructura de las moléculas de Clase II. [Abbas. Inmunología Celular y Molecular, cuarta Ed]

### 3.1.3. Anticuerpos Anti-HLA.

Los anticuerpos específicos anti-HLA son inducidos por embarazos, trasplantes o transfusiones, pero la mayoría de los que son encontrados en pacientes

multitransfundidos son transitorios y multiespecíficos de la clase IgM e IgG y tienden a ser dirigidos a diferentes epítomos. Anticuerpos anti-HLA han sido identificados en aproximadamente 20% de mujeres multigestas y en un 30 – 50% de pacientes multitransfundidos. Los anticuerpos anti HLA también han sido detectados en el suero de donadores hombres saludables no aloinmunizados y han demostrado ser dirigidos contra moléculas HLA E (clase I) y probablemente inducidos por reacciones cruzadas por antígenos bacterianos y/o péptidos derivados de la ingesta de alimentos o alérgenos <sup>6,7</sup>.

La aloinmunización o presencia de anticuerpos anti-HLA se presentan generalmente en personas que han recibido transfusiones o en las que han tenido un trasplante, por lo que han sido estimulados por los antígenos del MHC del donante o en las mujeres que han estado embarazadas y que han sido aloinmunizadas por leucocitos fetales que han pasado transplacentariamente a la madre. Estos anticuerpos son por ello de origen inmunitario de clase IgG con propiedades citotóxicas y leucoaglutinantes.

La existencia de estos anticuerpos “pre-formados”, en el paciente que está sujeto a recibir un órgano o transfusión de otro individuo, pueden favorecer que el rechazo del órgano o reacción adversa de la transfusión ocurra en el plazo inmediato o mediano, por lo que el detectarlos de manera previa al acto quirúrgico del trasplante o a la transfusión en pacientes altamente aloinmunizados, coadyuva al éxito del mismo<sup>6</sup>.

De igual manera, la determinación de anticuerpos anti-HLA, es una prueba que en los países más desarrollados se utiliza de manera cotidiana en la evaluación periódica de los pacientes multitransfundidos.

Igualmente importante, es el uso de las pruebas como marcadores del estado inmunológico del paciente transfundido, ya que permite prevenir el evento de reacción transfusional y por ende, incrementar su inocuidad.<sup>6</sup>

### **3.2. Antígenos MICA.**

El gen MICA (*MHC class I chain-related gene A*), pertenece al grupo de genes no clásicos dentro de la clase I y codifica para una glicoproteína de 383 aminoácidos la cual se expresa en la superficie de tumores, epitelio gastrointestinal, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos y médula tímica.

MICA es reconocida por un receptor (activador) de superficie de tipo lectina denominado NKG2D (*Natural Killer Group 2D*) que se expresa en células NK y linfocitos  $\gamma\delta$  mayoritariamente; gracias a la estructura cristalina del complejo MICA – NKG2D se sabe que el receptor se une como homodímero a una molécula de MICA.

Hasta julio de 2013 se tenían reportados 91 alelos de MICA, lo que indica que es un gen polimórfico, además se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el loci HLA-B y HLA-C. Hasta la fecha se desconoce si los polimorfismos de MICA afectan de alguna manera la afinidad hacia su receptor. De manera general los niveles de MICA en la superficie celular es baja, sin embargo, infecciones o



transformaciones malignas hacen que estos niveles se eleven y que se secreten citocinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$ .

Durante un trasplante se desarrolla el síndrome de isquemia – reperfusión en el cual las células entran en un estado de estrés provocado por la hipoxia y la activación de genes de la respuesta inmunitaria, se propone que algunas citocinas y algunos mediadores pro-inflamatorios regulan positivamente la expresión de MICA en la superficie células endoteliales del órgano permitiendo así su interacción con el receptor y desencadenando la función citotóxica de éstas células.

Debido a su naturaleza polimórfica y codominante se asume que MICA puede jugar un papel importante como aloantígeno.

### **3.2.1. Anticuerpos Anti-MICA.**

Se han detectado anticuerpos contra MICA en el suero de pacientes trasplantados con diferentes episodios de rechazo, estos anticuerpos estaban ausentes antes del trasplante, además tienen la capacidad de desarrollar citotoxicidad mediada por anticuerpos.

El alelo más frecuente en población caucásica es el MICA\*008, además este alelo es el que presentan la mayoría de los pacientes que han rechazado el trasplante. Existen estudios que demuestran que pacientes que no tenían el alelo MICA\*008 y que recibieron un riñón MICA - no compatible desarrollaron anticuerpos en un periodo de 6 meses a un año. Los pacientes que poseían el alelo y recibían un riñón no compatible no desarrollaba anticuerpos pero perdían la función del

órgano totalmente. Por último los pacientes de tenía el alelo y recibían un órgano compatible no desarrollaron anticuerpos y la función del órgano no se vio comprometida.

A causa de la importancia clínica que han tomado los anticuerpos anti-MICA existen otros estudios en los cuales se evalúan otros alelos con alta frecuencia, específicamente MICA\*00201 y MICA\*004.

Gracias a estos estudios se ha encontrado que además del alelo \*008 existen otros con una frecuencia superior al 20% en pacientes con rechazo, tal es el caso de los alelos MICA\*001, \*007 y \*009. La frecuencia de los anticuerpos anti-MICA en un trasplante renal varía entre el 9% y el 26.6%, en un trasplante de corazón entre un 29% y 30% mientras que la frecuencia en trasplantes de hígado es alrededor del 31%. La búsqueda de anticuerpos anti-MICA de manera clínica puede suponer una disminución en las respuesta de rechazo agudo al trasplante.<sup>8</sup>

### **3.3. Antígenos Eritrocitarios**

#### **3.3.1. Antígenos del sistema ABO.**

Los antígenos del sistema ABO se detectan sobre los eritrocitos entre la quinta y la sexta semana del embrión y no se desarrollan completamente hasta después del nacimiento. Durante el crecimiento, se van adicionando los azúcares terminales sobre la cadena de oligosacáridos en la membrana de los eritrocitos, dando origen a cada uno de los antígenos de forma específica. Entre los 2 y 4 años de edad, los antígenos A y B están completamente desarrollados y permanecen constantes durante toda la vida.<sup>9</sup>

### **3.3.2. Antígenos de otros sistemas no ABO.**

Numerosos estudios bioquímicos, genéticos y de biología molecular han conducido por más de dos décadas al descubrimiento de los grupos sanguíneos lo que ha contribuido significativamente al conocimiento de la genética humana, recientemente la ISBT (International Society of Blood Transfusion) reconoció 308 grupos sanguíneos, 270 de los cuales pertenecen a uno de los 29 sistemas existentes, además también hay colecciones y series de antígenos de alta frecuencia (HFA) y series de antígenos de baja frecuencia (LFA) (Ver tabla 2).<sup>10</sup>

### **3.3.3. Anticuerpos Anti-Eritrocitos del sistema ABO.**

Cuando una persona no tiene un antígeno particular en sus eritrocitos, se espera que su suero contenga un anticuerpo dirigido contra ese antígeno que carece, sin embargo, la presencia de este anticuerpo depende de si el sistema inmunológico de la persona ha sido expuesto y ha respondido a este antígeno o a un antígeno similar previamente. Por lo tanto, los anticuerpos contra el sistema ABO se forman como resultado de la exposición a antígenos A, B o similares. Esta exposición previa puede darse *in utero* o inmediatamente postparto, en el caso de los antígenos A y B, o como respuesta a una exposición a antígenos similares en partículas de polen, alimentos, bacterias y virus. Es así como sólo se generan anticuerpos dirigidos contra los antígenos ausentes en los eritrocitos de cada persona. Los anticuerpos anti-A y anti-B pueden ser detectables en los niños entre los 3 y 6 meses de vida, luego del nacimiento. La mayoría de los anticuerpos anti-A y anti-B presentes en el cordón umbilical son de origen materno, adquiridos por

la transferencia placentaria de IgG materna; por lo tanto, los anticuerpos anti-A y anti-B en el suero de recién nacidos o niños menores de 6 meses, no se consideran válidos. La producción de anticuerpos se incrementa, alcanzando el nivel de los adultos entre los 5 y 10 años de edad, y disminuyen posteriormente en adultos de edad avanzada. Los adultos mayores tienen niveles menores de anti-A y anti-B que los adultos jóvenes. Los anticuerpos ABO son una mezcla de IgM e IgG, sin embargo, los anticuerpos anti-A y anti-B de las personas con grupos sanguíneos A y B son predominantemente del tipo IgM, en tanto que las personas con grupo sanguíneo O son de tipo IgG predominantemente. Algunas veces los anticuerpos anti-A y anti-B se encuentran como autoanticuerpos. Seudoanticuerpos anti-A o anti-B se pueden encontrar en personas A, B o AB que han recibido trasplante de médula ósea o de órgano sólido de grupo O.

La respuesta inmunológica a los antígenos del sistema ABO tiene como resultado la producción de altos títulos de anticuerpos IgM, los cuales se conocen con el nombre de isohemaglutininas. Estos anticuerpos activan el complemento luego de unirse a los eritrocitos causando hemólisis intravascular. Por otra parte, la presencia de complejos inmunes antígeno-anticuerpo puede llevar a una falla renal, choque, coagulación intravascular diseminada y muerte.

Una respuesta inmunológica a los antígenos del sistema ABO puede ser el resultado de transfusiones incompatibles, administración de crioprecipitados, concentrados de factor IX y, finalmente también puede ser el resultado de la aloinmunización por los antígenos A y B durante el embarazo.<sup>9,11</sup>

**Tabla 2. Numeración y Símbolos de la *International Society of Blood Transfusion* para los Antígenos más importantes de los sistemas de grupos sanguíneos**

Sistema de grupo sanguíneo		Antígenos			
Nombre del Sistema	Número de ISBT	Nombre	Número ISBT	Símbolo ISBT	Nombre Alternativo
ABO	001	A	001.001	ABO1	
		B	001.002	ABO2	
		A,B	001.003	ABO3	
		A <sub>1</sub>	001.004	ABO4	
MNS (MNSs)	002	M	002.001	MNS1	
		N	002.002	MNS2	
		S	002.003	MNS3	
		S	002.004	MNS4	
		U	002.005	MNS5	
P	003	P <sub>1</sub>	003.001	P <sub>1</sub>	
Rh (Rhesus)	004	D	004.001	RH1	Rh <sub>0</sub>
		C	004.002	RH2	rh''
		E	004.003	RH3	rh''
		c	004.004	RH4	hr'
		e	004.005	RH5	hr''
		f	004.006	RH6	ce; hr
		Ce	004.007	RH7	rh <sub>i</sub>
		C <sup>w</sup>	004.008	RH8	Willis;rh <sup>w1</sup>
LU (Lutheran)	005	Lu <sup>a</sup>	005.001	LU1	
		Lu <sup>b</sup>	005.002	LU2	
KEL (kell)	006	K	006.001	KEL1	Kell; K1
		k	006.002	KEL2	Cellano; K2
		Kpa	006.003	KEL3	Penney; K3
		Kpb	006.004	KEL4	Rauterberg; K4
		Js <sup>a</sup>	006.006	KEL6	Sutter; K6
		Js <sup>b</sup>	006.007	KEL7	Matthews; K7
LE (Lewis)	007	Le <sup>a</sup>	007.001	LE1	
		Le <sup>b</sup>	007.002	LE2	
FY (Duffy)	008	Fy <sup>a</sup>	008.001	FY1	
		Fy <sup>b</sup>	008.002	FY2	
JK (Kidd)	009	JK <sup>a</sup>	009.001	JK1	
		JKb	009.002	JK2	
DI (Diego)	010	Di <sup>a</sup>	010.001	DI1	Wright;
		Wr <sup>a</sup>	010.003	DI2	700.001; 211.001

## 4. Reacciones adversas a la transfusión.

### 4.1. Clasificación de las reacciones adversas a la transfusión.<sup>12,30</sup>

La transfusión de componentes sanguíneos son procedimientos que nos permiten corregir las deficiencias hematológicas para la cual fue indicada. Sin embargo en la actualidad a pesar de los estrictos controles que anteceden a la transfusión, los receptores pueden presentar efectos no deseables, los que se conocen como efectos adversos o reacciones adversas de la transfusión. Las cuales pueden ser:

1. **Agudas:** Aparecen durante el acto transfusional o poco tiempo después (hasta 24 horas).

*De origen inmunológico:*

- Reacción hemolítica aguda
- Reacción febril no hemolítica
- Reacción alérgica
- Daño Pulmonar Aguda Asociado a Transfusión (TRALI)
- Aloimmunización con destrucción plaquetaria inmediata

*De origen no inmunológico:*

- Contaminación bacteriana
- Sobrecarga circulatoria
- Hipotensión

2. **Tardías:** Tienen lugar más allá de las 24 horas después del inicio de la transfusión.

*De origen inmunológico:*

- Reacción hemolítica retardada

- Aloinmunización frente antígenos eritrocitarios, plaquetarios, leucocitarios o proteínas plasmáticas.
- Púrpura postransfusional.
- Enfermedad injerto contra el hospedero postransfusional.
- Inmunomodulación

*De origen no inmunológico:*

- Transmisión de agentes infecciosos
- Hemosiderosis postransfusional
- Transfusiones masivas

#### **4.2. Relevancia Clínica del Sistema HLA en Transfusiones sanguíneas.**

La transfusión o trasplante de células o tejidos que expresan moléculas de membrana que difieren de los presentes en el receptor resultan en su reconocimiento y subsecuente desarrollo de una fuerte respuesta humoral y celular. Los Antígenos del Sistema HLA son particularmente eficientes en la obtención de la respuesta inmune ya que pueden ser reconocidas directa o indirectamente por las células del sistema inmune<sup>1</sup>. La vía directa involucra el reconocimiento directo de las moléculas HLA en las células presentadoras de antígeno (CPA) del donador en sangre o tejido trasplantado y es particularmente efectivo en la activación inmunológica de células T naive. La vía indirecta sigue la misma vía de reconocimiento de antígenos nominal y en este caso involucra el procesamiento y presentación de péptidos de HLA del donador por las CPA del receptor; esta vía opera más eficientemente en individuos con sensibilización previa acarreado células T de memoria que pueden rápidamente responder al

desafío antigénico. Otro factor contribuyente a la eficiencia inmunogénica de los antígenos HLA es su alto grado de polimorfismo el cuál es diferentemente expresado a través de diferentes grupos de poblaciones y con lo cual incrementa la probabilidad de incompatibilidad en transfusiones o trasplantes de productos de la sangre, tejidos u órganos induciendo una respuesta inmune<sup>5</sup>.

El sistema HLA juega un papel crítico en muchas áreas de la medicina clínica y las transfusiones sanguíneas. La aloinmunización HLA es inducida por embarazos, transfusiones múltiples o trasplantes, entre otros y se ha demostrado ser la responsable de algunas de las complicaciones serias ocurridas durante la transfusión de sangre o productos de la misma. Algunas de las reacciones severas por transfusión mediadas por la aloinmunización HLA son: daño pulmonar agudo asociado a transfusión (TRALI), refractariedad plaquetaria inmunológica, reacción febril transfusional no hemolítica y enfermedad injerto contra hospedero asociado a transfusión (EICHT).<sup>6,7</sup>

Los anticuerpos y antígenos del sistema HLA juegan un papel muy importante en una serie de eventos relacionados a la transfusión, como:

- *Refractariedad plaquetaria mediada por reacción inmune:*

Se reporta en un 60% de los receptores que han sido multitransfundidos. La aloinmunización HLA se genera contra antígenos Clase I que ha sido provocada por los leucocitos residuales presentes en los hemocomponentes celulares (concentrados plaquetarios, paquetes globulares y/o sangre total). Estudios clínicos han demostrado que niveles de leucocitos de  $5 \times 10^6$ /mL puede ser una dosis de inmunización. Los receptores con este tipo de aloinmunización y



refractoriedad a plaquetas deben ser transfundidos con unidades de concentrados plaquetarios obtenidas por aféresis de un donante HLA compatible. Se produce en receptores con anticuerpos anti-HLA o anti antígenos plaquetarios específicos por transfusiones o embarazos previos. Estos anticuerpos producen la destrucción de las plaquetas que contengan el antígeno correspondiente, manifestándose generalmente en un mínimo incremento en el recuento plaquetario inmediatamente después de la transfusión de plaquetas y una pobre respuesta terapéutica. Debe diferenciarse de aquellos casos de supervivencia acortada de las plaquetas por razones no inmunológicas (CID, sepsis, esplenomegalia, etc.). La refractoriedad plaquetaria es una complicación relativamente frecuente en receptores que reciben soporte crónico con concentrados plaquetarios (30-50%).<sup>15,25</sup>

- *Reacciones transfusionales febriles no hemolíticas:*

Las reacciones de este tipo están relacionadas con anticuerpos Anti-HLA específicos tanto de granulocitos como de plaquetas. Los anticuerpos reaccionan con los antígenos del donador provocando la liberación de citocinas que causan fiebre.<sup>13</sup>

- *TRALI:*

La incidencia real de TRALI es desconocida. Muchos expertos coinciden en que probablemente el TRALI es una complicación transfusional subdiagnosticada. Es observado como un edema pulmonar no cardiogénico agudo. Esto es por anticuerpos Anti-HLA en la sangre del donador que reaccionan con la fijación de complemento a antígenos tisulares del receptor, ocasionando daño capilar y

edema pulmonar. No existe certeza en relación con la patogénesis del TRALI, aunque en todos los supuestos juega un papel preponderante la infusión pasiva de anticuerpos del donante, que reaccionan directamente con los correspondientes antígenos presentes en los leucocitos del receptor. Una de las hipótesis más aceptadas es la denominada “teoría de los dos eventos” en la que se postula que el TRALI estaría ocasionado por dos eventos independientes, el primero respondería a circunstancias clínicas propias del receptor que provocarían daño endotelial pulmonar y el segundo vendría ocasionado por la infusión pasiva de anticuerpos o modificadores de la respuesta biológica, incluyendo lípidos activos procedentes del donante.<sup>16,21,26</sup>

- *Enfermedad Injerto contra Hospedero:*

Aquí se ven involucrados varios factores relacionados con la inmunidad del receptor y la viabilidad de los linfocitos del componente transfundido y el grado de compatibilidad HLA entre el donador y el receptor. Se trata de una complicación casi siempre fatal originada por la transfusión de linfocitos T viables a receptores con una inmunodepresión intensa (receptores de progenitores hematopoyéticos, transfusión intrauterina, enfermedad de Hodgkin, SIDA, entre otros) o receptores inmunocompetentes que comparten algún haplotipo con el donante (familiares en primer o segundo grado, o receptores transfundidos con productos HLA compatibles seleccionados). Los linfocitos injertan y proliferan atacando diversos órganos y tejidos del receptor.<sup>17,18,31</sup>

## CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

### 1. Planteamiento del problema

En nuestro país se transfunden 1,200 000 personas al año, con un promedio de transfusiones de 2.3 unidades por paciente, siendo los concentrados eritrocitarios los más solicitados para transfusión, seguido del plasma, como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3. Componentes transfundidos y bajas durante 2012.**

<b>Componente</b>	<b>Transfusiones</b>	<b>Bajas</b>
Sangre total	13,746	50,769
Concentrado eritrocitario	1,380,605	106,484
Concentrado plaquetario	521,380	215,247
Plasma	609,765	853,462
Crioprecipitado	75,879	15,412
<b>Total</b>	<b>2,601,375</b>	<b>1,241,374</b>

Fuente: OMS/OPS

Un riesgo atribuible a la transfusión de Plasma fresco congelado es el TRALI. Estos casos se han relacionado con la transfusión de componentes de la sangre que tienen gran proporción de plasma<sup>5</sup>. El riesgo de TRALI es teóricamente mayor cuando se transfunde gran cantidad de plasma, como en el caso de la transfusión masiva. Sin embargo, como esto ocurre frecuentemente en pacientes traumatizados, paradójicamente el plasma favorece una menor mortalidad y un menor riesgo de falla orgánica múltiple. En los pacientes no traumatizados, el riesgo de TRALI es casi tres veces mayor.

Los componentes sanguíneos de donantes implicados en casos de TRALI inmunológico proceden por lo general de mujeres multigestas, consecuencia de la exposición durante el embarazo a antígenos leucocitarios paternos presentes en el

feto. Los anticuerpos linfocitotóxicos o HLA están presentes entre el 1 y 20 % en la sangre de las mujeres que han parido, los anticuerpos reactivos contra granulocitos entre el 1 y 20 % y los anticuerpos específicos de granulocitos entre el 0,1 y 1 %. El porcentaje se incrementa con el número de embarazos. Recientemente, Palfi y colaboradores (2001) demostraron el significado clínico del plasma procedente de mujeres multigestas.<sup>19,20</sup>

## **CAPÍTULO III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **1. Hipótesis**

Las donadoras de sangre con tres o más embarazos llevados a término presentan anticuerpos anti-HLA Clase I, anti-HLA Clase II, anti-MICA y anti-Eritrocitos mientras que las donadoras nuligestas no los presentan.

## **2. Objetivos.**

### **2.1. General.**

- ▶ Determinar el grado de aloinmunización que presentan las mujeres multigestas donadoras de sangre del Banco Central de Sangre y su relación con una posible reacción postransfusional al administrar sus componentes sanguíneos como medida terapéutica.

### **2.2. Particulares.**

- ▶ Determinar el porcentaje de anticuerpos anti-HLA Clase I y Clase II en mujeres multigestas donadoras de sangre e identificar diferencias estadísticas al comparar los resultados con donadoras nuligestas.
- ▶ Determinar la especificidad de los anticuerpos anti-HLA Clase I y Clase II en mujeres multigestas donadoras de sangre e identificar diferencias estadísticas al comparar los resultados con donadoras nuligestas.
- ▶ Determinar la presencia de anticuerpos Anti-MIC A en mujeres multigestas donadoras de sangre e identificar diferencias estadísticas al comparar los resultados con donadoras nuligestas.
- ▶ Determinar la presencia y especificidad de anticuerpos Anti-Eritrocitos en mujeres multigestas donadoras de sangre e identificar diferencias estadísticas al comparar los resultados con donadoras nuligestas.

## **CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA**

### **1. Estudio de investigación.**

La estructura de investigación de la presente tesina se enfoca en un estudio basado en un diseño observacional, analítico, transversal y prospectivo.

### **2. Muestras.**

Se estudiaron muestras del suero de 100 donadoras de sangre entre 18 y 65 años, con tres o más embarazos previos llevados a término que acuden a donar al Banco Central de Sangre del CMN SXXI del IMSS, así como 20 controles de mujeres sin embarazos previos que acuden a donar sangre. Estas muestras fueron tomadas en el área de atención al donador del mismo Banco de Sangre.

#### ***Criterios de aceptación.***

**Criterios de inclusión:** mujeres que acuden a donar sangre al Banco Central de Sangre del CMN SXXI, que tengan más de tres embarazos llevados a término, de 18 a 65 años, clínicamente sanas de acuerdo a la NOM-253-SSA1-2012, "Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos" y que firmen la carta de consentimiento informado (Anexo 3).

**Criterios de no inclusión:** mujeres que acuden a donar sangre al Banco Central de Sangre del CMN SXXI, que tengan menos de tres embarazos llevados a término, menores de 18 o mayores de 65 años, clínicamente no sanas de acuerdo a la NOM-253-SSA1-2012, "Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos" o que no firmen la carta de consentimiento informado.

*Operacionalización de variables.*

Definición de paridad para aceptación.

*Paridad:* número total de embarazos (los previos + el actual) (n Gesta), especificando el número de partos/cesáreas previos (n Para), y el número de abortos previos (n Abortos). Se suele escribir utilizando la siguiente fórmula: nG nP nA. Así, una mujer que se ha quedado embarazada tras un aborto le correspondería esta fórmula: 2G 0P 1A. En base la paridad se utiliza la siguiente nomenclatura:

= Nuligesta (o nuligravida): ningún embarazo.

= Primigesta (o primigravida): primer embarazo, ningún parto.

= Primípara: primer parto.

= Secundípara: segundo parto.

= Multípara o multigesta:  $\geq 3$  partos.

### **3. Método empleado para la determinación de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA (Anexo 1).<sup>22</sup>**

Se utilizó una técnica en fase sólida mediante la cual perlas de poliestireno teñidas con fluorocromos son recubiertas con antígenos específicos para HLA, *LABScreen Mixed kit (One Lamda, CA, USA)*; los cuales fueron utilizados para detectar anticuerpos en el suero de las donadoras. La proporción exacta de dos fluorocromos crea 100 perlas claramente coloreadas, cada una de ellas cubierta



con un antígeno diferente. Las perlas se incubaron con el suero del donador y la reacción se llevó a cabo usando anticuerpo IgG anti-humano (específico para Fc) conjugado con Ficoeritrina (*One Lamda, CA, USA*). La reacción positiva o negativa se leyó usando un analizador Luminex<sup>®</sup> (*Luminex Corporation, Texas, USA*).

**a) Escrutinio de Anticuerpos Anti-HLA (Screening)**

Esta prueba, permitió en una sola determinación, detectar la presencia de anticuerpos contra los antígenos de compatibilidad HLA, tanto Clase I como Clase II; de igual manera, permitió detectar la presencia de los anticuerpos dirigidos contra antígenos denominados MIC-A. En esta prueba se utilizó un PANEL de 55 perlas recubiertas con antígenos purificados específicos para HLA Clase I, Clase II y MICA. El producto utilizado fue *LABScreen Mixed kit (One Lamda, CA, USA)*

**b) Determinación del porcentaje del Panel Reactivo de Anticuerpos específico Anti-HLA (%PRA)**

Esta prueba, permitió conocer el grado de sensibilización de las donadoras y la especificidad contra antígenos de Clase I o Clase II y la caracterización respecto a la especificidad de dichos anticuerpos. Para ello se empleó un PANEL de 100 perlas con diferentes tonalidades de color rojo, recubiertas con antígenos purificados para HLA Clase I y Clase II.<sup>22</sup>

**4. Técnicas empleadas en la determinación de anticuerpos Anti-Eritrocitos (Anexo 2).<sup>24</sup>**

La detección de anticuerpos Anti-Eritrocitos libres en el suero se realizó enfrentando el suero (y como segunda opción el plasma) de las muestras en

estudio, contra eritrocitos de fenotipo conocido que son representativos de la población del paciente o receptor (PANEL).

Los eritrocitos de fenotipo conocido empleados fue de 4 células que abarcaron la mayoría de los antígenos poco frecuentes de una población (K, Di<sup>a</sup>, Le<sup>a</sup>, Kp<sup>a</sup>, Lu<sup>a</sup>, etc) (Ver Tabla 2) y la ausencia de los antígenos que son frecuentes en la misma, incluyendo sangres negativas a: s, P1, Fy<sup>a</sup>, K, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, Le<sup>b</sup>, Di<sup>b</sup>, Kp<sup>b</sup>.

### **5. Análisis Estadístico.**

Para determinar cualquier diferencia estadísticamente significativa en la detección de anticuerpos Anti-HLA, Anti-MICA y Anti-Eritrocitos, entre las muestras y los controles se utilizó tablas de contingencia 2 X 2 usando Chi<sup>2</sup> de Pearson y análisis exacto de Fisher con un nivel de significancia de  $p < 0.005$  y 95% de intervalo de confianza. Todos los análisis se desarrollaron empleando el programa SPSS v.20.0.

## CAPÍTULO V. RESULTADOS.

### 1. FRECUENCIAS.

#### 1.1 GRUPOS SANGUÍNEOS

Tabla 4. Frecuencia de hemotipos (grupo sanguíneo sistema ABO y sistema Rh/Hr) en donadoras multigestas (muestras)

MUESTRAS			
HEMOTIPO	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
A-	1	1.0	1.0
B-	1	1.0	2.0
O-	2	2.0	4.0
B+	12	12.0	16.0
A+	18	18.0	34.0
O+	66	66.0	100.0
Total	100	100.0	

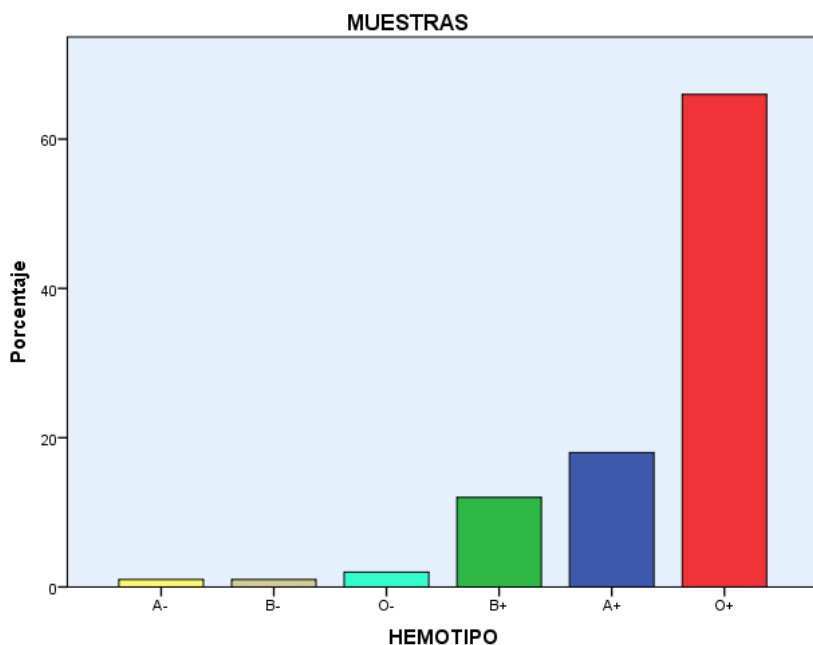


Figura 5. Frecuencia de hemotipos en las muestras estudiadas. 100 donadoras de sangre que han tenido al menos tres embarazos llevados a término. Hemotipo O+ 66% (en rojo), A+ 18% (en azul oscuro), B+ 12% (en verde), O- 2% (en azul claro), B- 1% (en café), A- 1% (en amarillo).

**Tabla 5. Frecuencia de hemotipos en donadoras nuligestas (controles)**

CONTROLES				
HEMOTIPO		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
	B+	2	10.0	10.0
	A+	6	30.0	40.0
	O+	12	60.0	100.0
	Total	20	100.0	

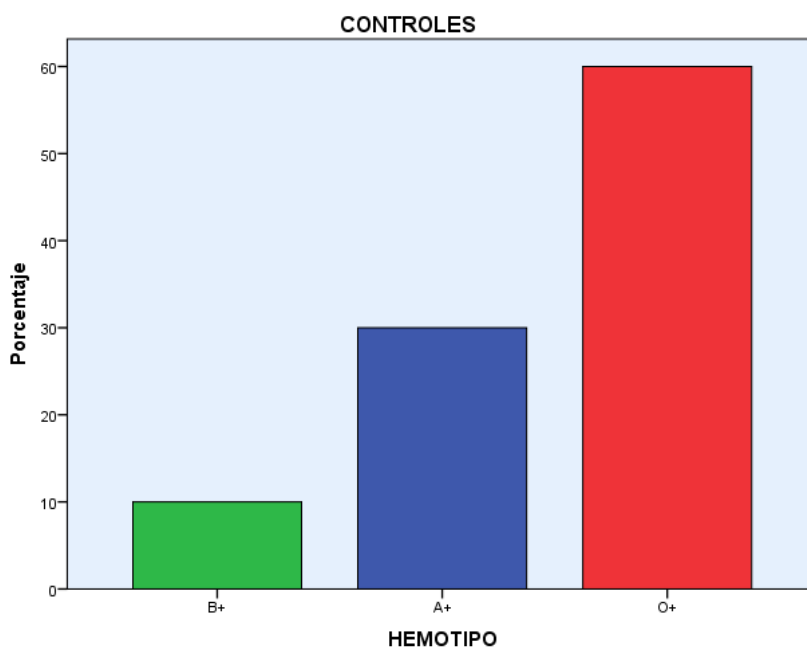


Figura 6. Frecuencia de hemotipos en los controles estudiados. 20 donadoras de sangre que no han tenido embarazos llevados a término o abortos previos. Hemotipo O+ 60% (en rojo), A+ 30% (en azul oscuro), B+ 10% (en verde).

La frecuencia por hemotipo (grupo sanguíneo sistema ABO y sistema Rh/Hr) O+, no mostró diferencias con lo reportado en las frecuencias a nivel nacional (56% del por el Banco Central de Sangre CMN SXXI, 1999 y 65% reportado por La Cruz Roja Mexicana, 2012)<sup>49</sup>, siendo el hemotipo O+ el más frecuente con un 66% en las donadoras multigestas (tabla 4) y 60% para los controles (tabla 5); los resultados para los demás hemotipos concuerdan con la literatura.

## 1.2 EDAD

Tabla 6. Frecuencia de edades en donadoras multigestas (muestras)

MUESTRAS			
EDAD	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
18-29	6	6.0	6.0
30-39	30	30.0	36.0
40-49	40	40.0	76.0
50-59	19	19.0	95.0
60-65	5	5.0	100.0
Total	100	100.0	

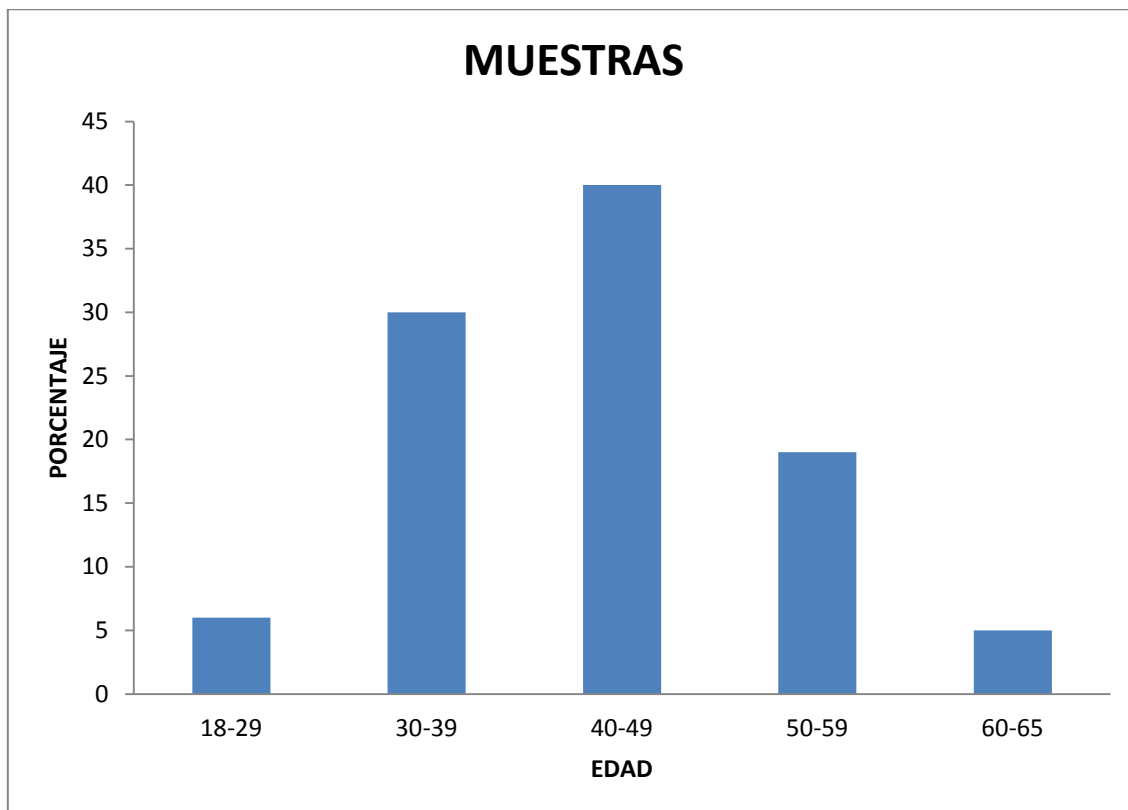


Figura 7. Frecuencia de edad en las muestras estudiadas. 100 donadoras de sangre que han tenido al menos tres embarazos llevados a término.

**Tabla 7. Frecuencia de edades en donadoras nuligestas (controles)**

<b>CONTROLES</b>			
EDAD	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
18-25	8	40.0	40.0
26-30	9	45.0	85.0
31-35	2	10.0	95.0
36-40	1	5.0	100.0
Total	20	100.0	

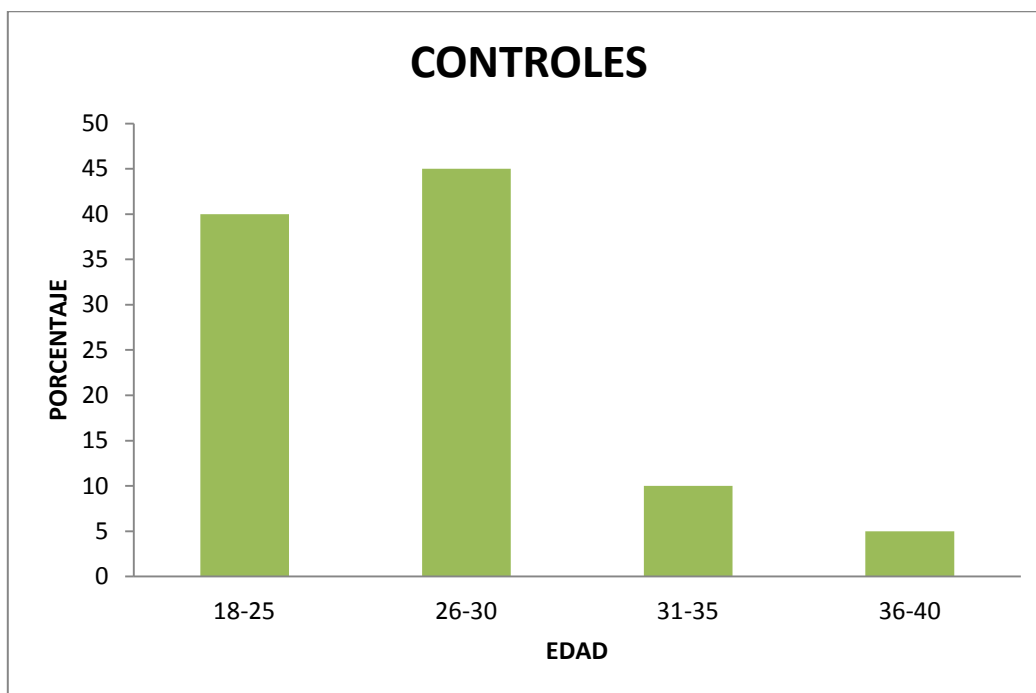


Figura 8. Frecuencia de edad en los controles estudiados. 20 donadoras de sangre que no han tenido embarazos llevados a término o abortos previos.

El Intervalo de edades en las mujeres multigestas que acudieron a donar al BCS fue de 18 a 65 años, siendo 40% (40 mujeres) entre los 40 y 49 años la mayor frecuencia (tabla 6). En el caso de los controles de mujeres nuligestas, el 45% (9 mujeres) correspondió a edades de 26 a 30 años (tabla 7).

### 1.3 GESTAS

Tabla 8. Número de gestas en donadoras multigestas (muestras)

MUESTRAS			
GESTAS	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
7	2	2.0	2.0
8	3	3.0	5.0
6	7	7.0	12.0
5	10	10.0	22.0
4	32	32.0	54.0
3	46	46.0	100.0
Total	100	100.0	



Figura 9. Frecuencia de gestas en las muestras estudiadas. 100 donadoras de sangre que han tenido al menos tres embarazos llevados a término. Gestas incluye Partos, Cesáreas y Abortos. Los controles no serán graficados ya que todas las donadoras son nuligestas.

En la Tabla 8, se observa que la mayor frecuencia de gestas fue de 3 embarazos llevados a término en 46 mujeres (46%) de las muestras, seguido por 4 embarazos llevados a término en 32 mujeres (32%).

#### 1.4 RASTREO DE ANTICUERPOS (SCREENING)

Tabla 9. Resultados del rastreo de anticuerpos anti-HLA CI/CII en donadoras multigestas (muestras)

MUESTRAS			
RESULTADO SCREENING	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
POS CI/NEG CII	14	14.0	14.0
NEG CI/POS CII	1	1.0	15.0
POS CI/CII	66	66.0	81.0
NEG CI/CII	10	10.0	91.0
IND CI/NEG CII	1	1.0	92.0
IND CI/POS CII	1	1.0	93.0
POS CI/ IND CII	7	7.0	100.0
NEG CI/IND CII	0	0.0	0.0
IND CI/ IND CII	0	0.0	0.0
Total	100	100.0	

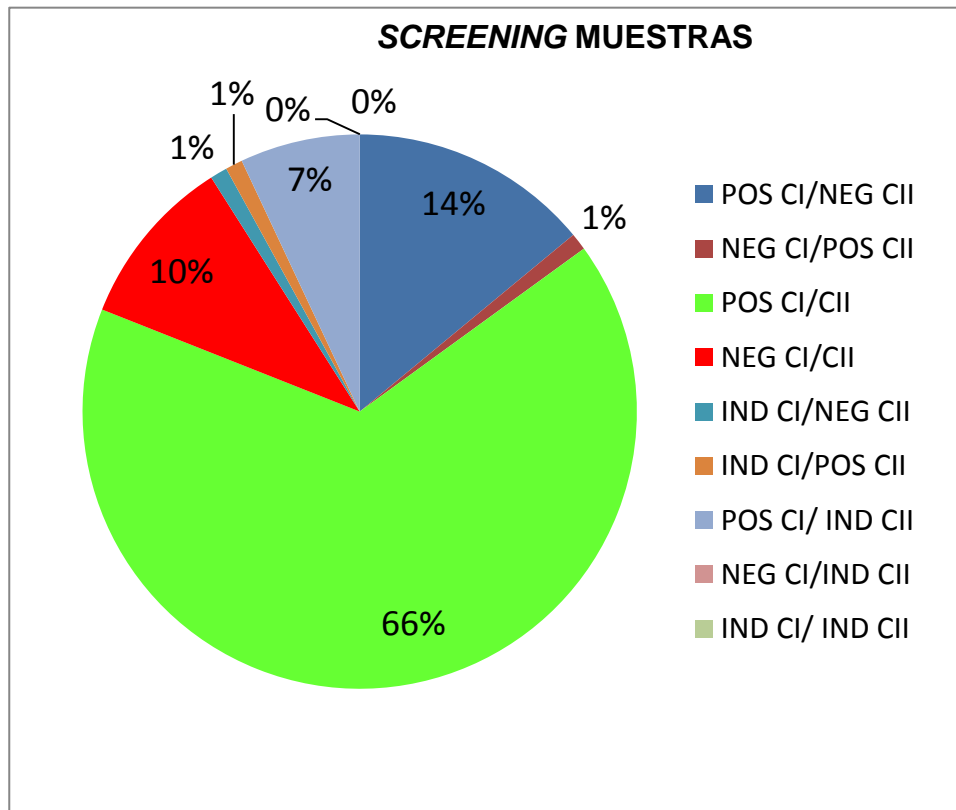


Figura 10. Resultados de Screening (rastreo de anticuerpos anti-HLA CI/CII) en las muestras estudiadas. 100 donadoras de sangre que han tenido al menos tres embarazos llevados a término.



**Tabla 10. Resultados del rastreo de anticuerpos (*screening*) anti-HLA CI/CII en donadoras nuligestas (controles).**

<b>CONTROLES</b>			
RESULTADO SCREENING	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
POS CI/NEG CII	2	10.0	10.0
NEG CI/POS CII	0	0.0	10.0
POS CI/CII	12	60.0	70.0
NEG CI/CII	1	5.0	75.0
IND CI/NEG CII	3	15.0	90.0
IND CI/POS CII	0	0.0	90.0
POS CI/ IND CII	2	10.0	100.0
NEG CI/IND CII	0	0.0	0.0
IND CI/ IND CII	0	0.0	0.0
Total	20	100.0	

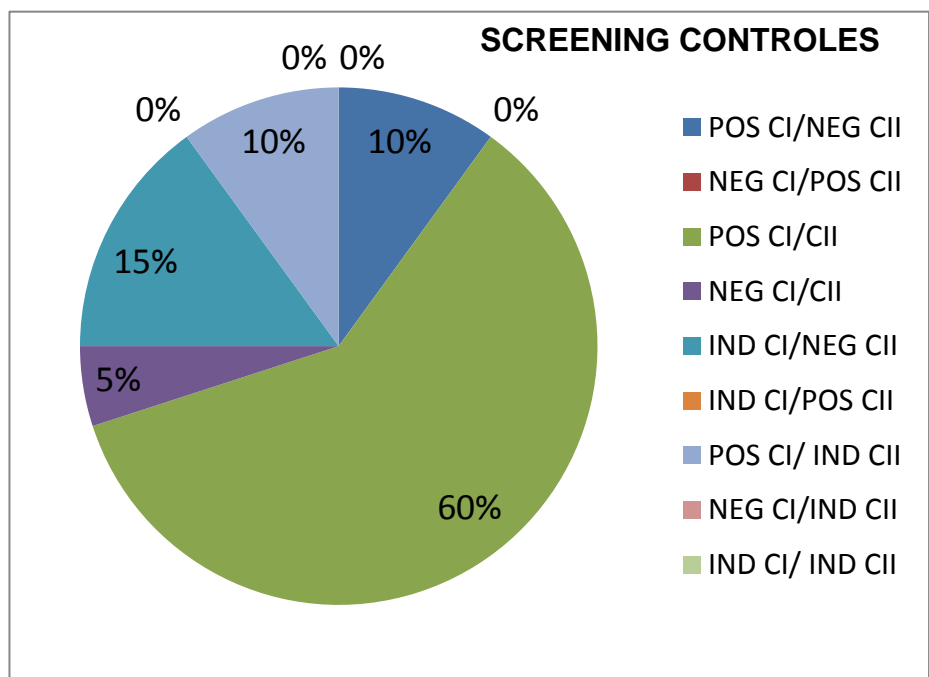


Figura 11. Resultados de Screening (rastreo de anticuerpos anti-HLA CI/CII) en los controles estudiados. 20 donadoras de sangre que no han tenido embarazos llevados a término o abortos previos.

El análisis por rastreo de anticuerpos (screening) mostró que el 66% (66 de las mujeres) de las muestras de mujeres multigestas resultó positivo para anticuerpos Anti-HLA contra Clase I y Clase II, el 14% (14 mujeres) positivo para anticuerpos Anti-HLA Clase I y negativo para Clase II, el 10% (10 mujeres) negativo para anticuerpos Anti-HLA Clase I y negativo para Clase II y el 7% (7 mujeres) positivo para anticuerpos Anti-HLA Clase I e indeterminado para Clase II. (tabla 9). En el caso de controles (mujeres nuligestas), el análisis mostró que el 60% (12 mujeres) resultó positivo para anticuerpos Anti-HLA contra Clase I y Clase II, 15% (3 mujeres) indeterminado para anticuerpos Anti-HLA Clase I y negativo para Clase II, y el 10% (2 mujeres) positivo para anticuerpos Anti-HLA Clase I y negativo para Clase II (tabla 10).

### 1.5 MIC A

Tabla 11. Resultados de la búsqueda de anticuerpos anti-MIC A en donadoras multigestas (muestras)

MUESTRAS			
RESULTADOS MIC A	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
IND	14	14.0	14.0
POS	37	37.0	51.0
NEG	49	49.0	100.0
Total	100	100.0	

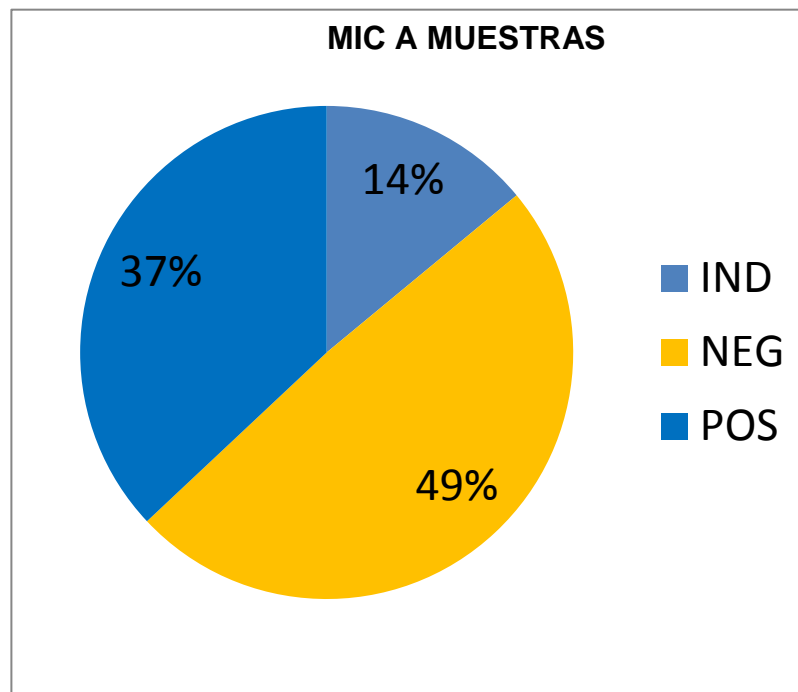


Figura 12. Resultados de la búsqueda de anticuerpos anti-MIC A en las muestras estudiadas. 100 donadoras de sangre que han tenido al menos tres embarazos llevados a término.

**Tabla 12. Resultados de la búsqueda de anticuerpos anti-MIC A en donadoras nuligestas (controles)**

<b>CONTROLES</b>			
RESULTADOS MIC A	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
POS	3	15.0	15.0
IND	6	30.0	45.0
NEG	11	55.0	100.0
Total	20	100.0	

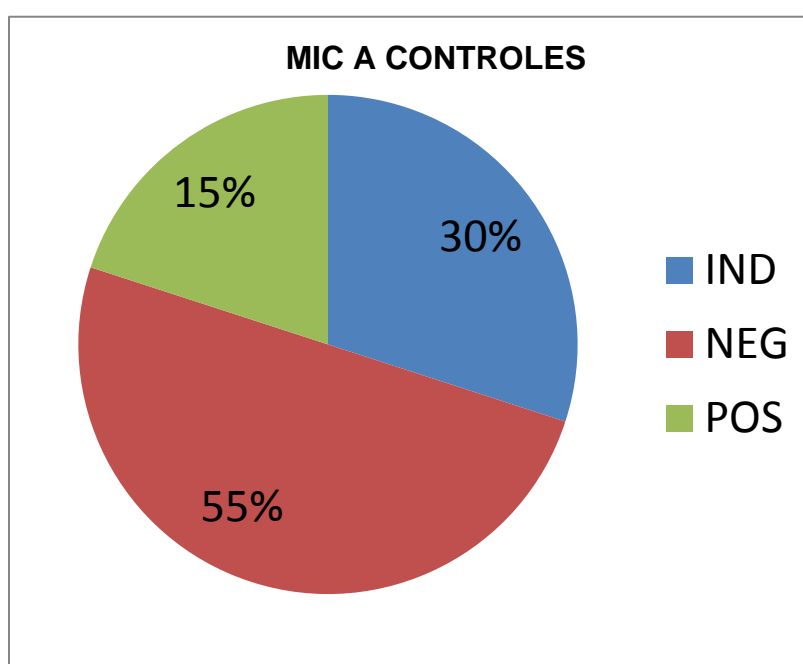


Figura 13. Resultados de la búsqueda de anticuerpos anti-MIC A en los controles estudiados. 20 donadoras de sangre que no han tenido embarazos llevados a término o abortos previos.

En la búsqueda de anticuerpos anti-MIC A, el 37% (37 mujeres) de las donadoras multigestas resultó positivo, 49% (49 mujeres) negativo y 14% (14 mujeres) indeterminado para MIC A (tabla 11). El resultado de los controles mostró que el 15% (3 mujeres) fue positivo para anticuerpos anti-MIC A, 55% (11 mujeres) negativo y 30% (6 mujeres) indeterminado (tabla 12).

## 1.6 %PRA ESPECÍFICO

**Tabla 13. Resultados de PRA específico. Identificación de anticuerpos anti-HLA CI/CII en donadoras multigestas (muestras)**

MUESTRAS			
RESULTADOS %PRA	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
POS CI/NEG CII	31	31.0	31.0
NEG CI/POS CII	15	15.0	46.0
POS CI/CII	24	24.0	70.0
NEG CI/CII	30	30.0	100.0
Total	100	100.0	

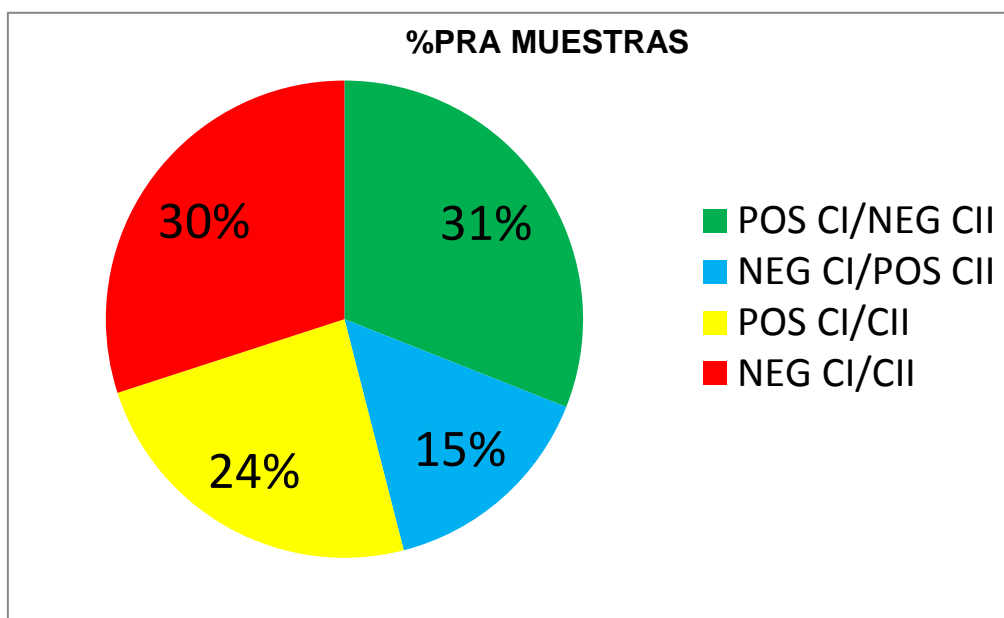


Figura 14. Resultados de la identificación de anticuerpos anti-HLA CI/CII en las muestras estudiadas. 100 donadoras de sangre que han tenido al menos tres embarazos llevados a término.

**Tabla 14. Resultados de PRA específico. Identificación de anticuerpos anti-HLA CI/CII en donadoras nuligestas (controles)**

<b>CONTROLES</b>			
RESULTADOS %PRA	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
POS CI/NEG CII	1	5.0	5.0
NEG CI/POS CII	0	0.0	5.0
POS CI/CII	1	5.0	10.0
NEG CI/CII	18	90.0	100.0
Total	20	100.0	

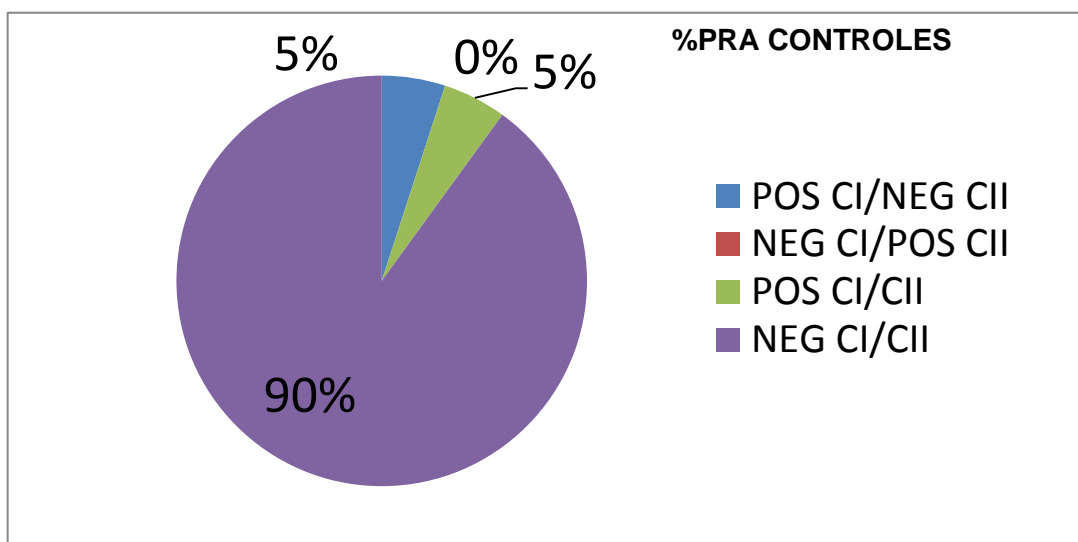


Figura 15. Resultados de la identificación de anticuerpos anti-HLA CI/CII en los controles estudiados. 20 donadoras de sangre que no han tenido embarazos llevados a término o abortos previos.

El 70% de las donadoras multigestas (70 mujeres) mostró positividad en el %PRA específico para Clase I, Clase II o ambas Clases, donde: el 24% (24 mujeres) positivo en Clase I y Clase II; 31% (31 mujeres) positivo para Clase I y negativo para Clase II y 15% (15 mujeres) positivo para Clase II y negativo para Clase I (tabla 13). Para los controles (mujeres nuligestas) el 90% (18 mujeres) resultó negativo tanto para Clase I como en Clase II; 5% (1 mujer) positivo para Clase I y Clase II y 5% (1 mujer) positivo en Clase I y negativo en Clase II (tabla 14).

**Tabla 15. Especificidades de anticuerpos contra HLA CI encontrados en el suero de las donadoras multigestas a través de %PRA específico**

Especificidad	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
A1	7	1.4	1.4
A11	7	1.4	2.7
A2	14	2.7	5.4
A23	7	1.4	6.8
A24	10	1.9	8.7
A25	15	2.9	11.6
A26	8	1.5	13.1
A29	4	0.8	13.9
A3	3	0.6	14.5
A30	5	1.0	15.4
A31	7	1.4	16.8
A32	11	2.1	18.9
A33	6	1.2	20.1
A34	9	1.7	21.8
A36	6	1.2	23.0
A49	1	0.2	23.2
A66	5	1.0	24.1
A68	11	2.1	26.3
A69	6	1.2	27.4
A74	3	0.6	28.0
A75	1	0.2	28.2
A80	6	1.2	29.3
B13	14	2.7	32.0
B18	3	0.6	32.6
B27	17	3.3	35.9
B35	6	1.2	37.1
B37	8	1.5	38.6
B38	4	0.8	39.4
B39	6	1.2	40.5
B41	2	0.4	40.9
B42	7	1.4	42.3
B44	13	2.5	44.8
B45	11	2.1	46.9
B46	2	0.4	47.3
B47	11	2.1	49.4
B48	12	2.3	51.7
B49	12	2.3	54.1
B50	9	1.7	55.8
B51	13	2.5	58.3
B52	12	2.3	60.6

**Tabla 15. Especificidades de anticuerpos contra HLA CI encontrados en el suero de las donadoras multigestas a través de %PRA específico (continuación)**

Especificidad	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
B53	6	1.2	61.8
B54	4	0.8	62.5
B55	6	1.2	63.7
B56	7	1.4	65.1
B57	18	3.5	68.5
B58	19	3.7	72.2
B59	4	0.8	73.0
B60	20	3.9	76.8
B61	17	3.3	80.1
B62	5	1.0	81.1
B63	6	1.2	82.2
B64	5	1.0	83.2
B65	5	1.0	84.2
B67	10	1.9	86.1
B7	14	2.7	88.8
B71	6	1.2	90.0
B72	7	1.4	91.3
B73	4	0.8	92.1
B75	6	1.2	93.2
B76	6	1.2	94.4
B78	8	1.5	95.9
B8	5	1.0	96.9
B81	9	1.7	98.6
Cw10	1	0.2	98.8
Cw12	1	0.2	99.0
Cw15	3	0.6	99.6
Cw6	1	0.2	99.8
Cw7	1	0.2	100.0
Total	518	100	

En cuanto a la identificación de las especificidades obtenidas en %PRA específico para CI (Tabla 15), el anticuerpo con mayor frecuencia encontrado fue contra el antígeno HLA-B60, identificado en 20 de las muestras positivas (3.9%), seguido de HLA-B58 encontrado en 19 de las muestras positivas (3.7%); y de HLA-B57 encontrado en 18 de las muestras positivas (3.5%).



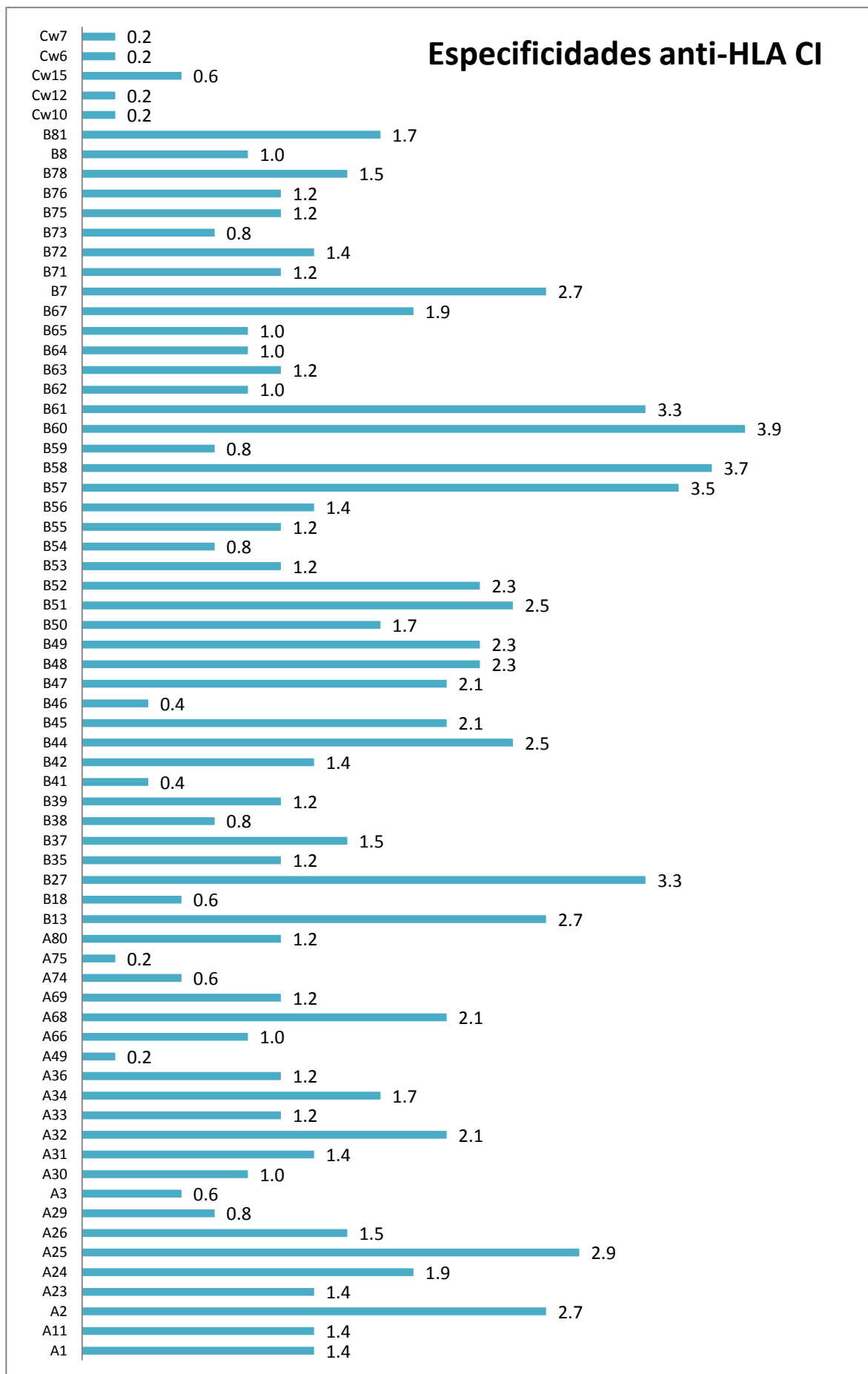


Figura 16. Frecuencia y especificidad de los anticuerpos encontrados contra HLA CI

**Tabla 16. Especificidades de anticuerpos contra HLA CII encontrados en el suero de las donadoras multigestas a través de %PRA específico**

Especificidad	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
DP13	1	0.5	0.5
DP3	2	0.9	1.4
DQ2	1	0.5	1.9
DQ4	6	2.8	4.7
DQ5	2	0.9	5.6
DQ6	5	2.3	8.0
DQ7	4	1.9	9.9
DQ8	11	5.2	15.0
DQ9	10	4.7	19.7
DR1	6	2.8	22.5
DR10	5	2.3	24.9
DR103	9	4.2	29.1
DR11	13	6.1	35.2
DR12	14	6.6	41.8
DR13	16	7.5	49.3
DR14	13	6.1	55.4
DR15	6	2.8	58.2
DR16	6	2.8	61.0
DR17	15	7.0	68.1
DR18	14	6.6	74.6
DR4	9	4.2	78.9
DR51	8	3.8	82.6
DR52	10	4.7	87.3
DR53	1	0.5	87.8
DR7	7	3.3	91.1
DR8	10	4.7	95.8
DR9	9	4.2	100.0
Total	213	100.0	

En este estudio los anticuerpos dirigidos contra antígenos HLA CII (Tabla 16) encontrados con mayor frecuencia fueron contra HLA-DR13 presentes en 16 de las muestras positivas (7.5%), seguido de HLA-DR17 encontrado en 15 de las muestras positivas (7.0%); y de HLA-DR12 y HLA-DR18 encontrado en 14 de las muestras positivas (ambos con 6.6%).

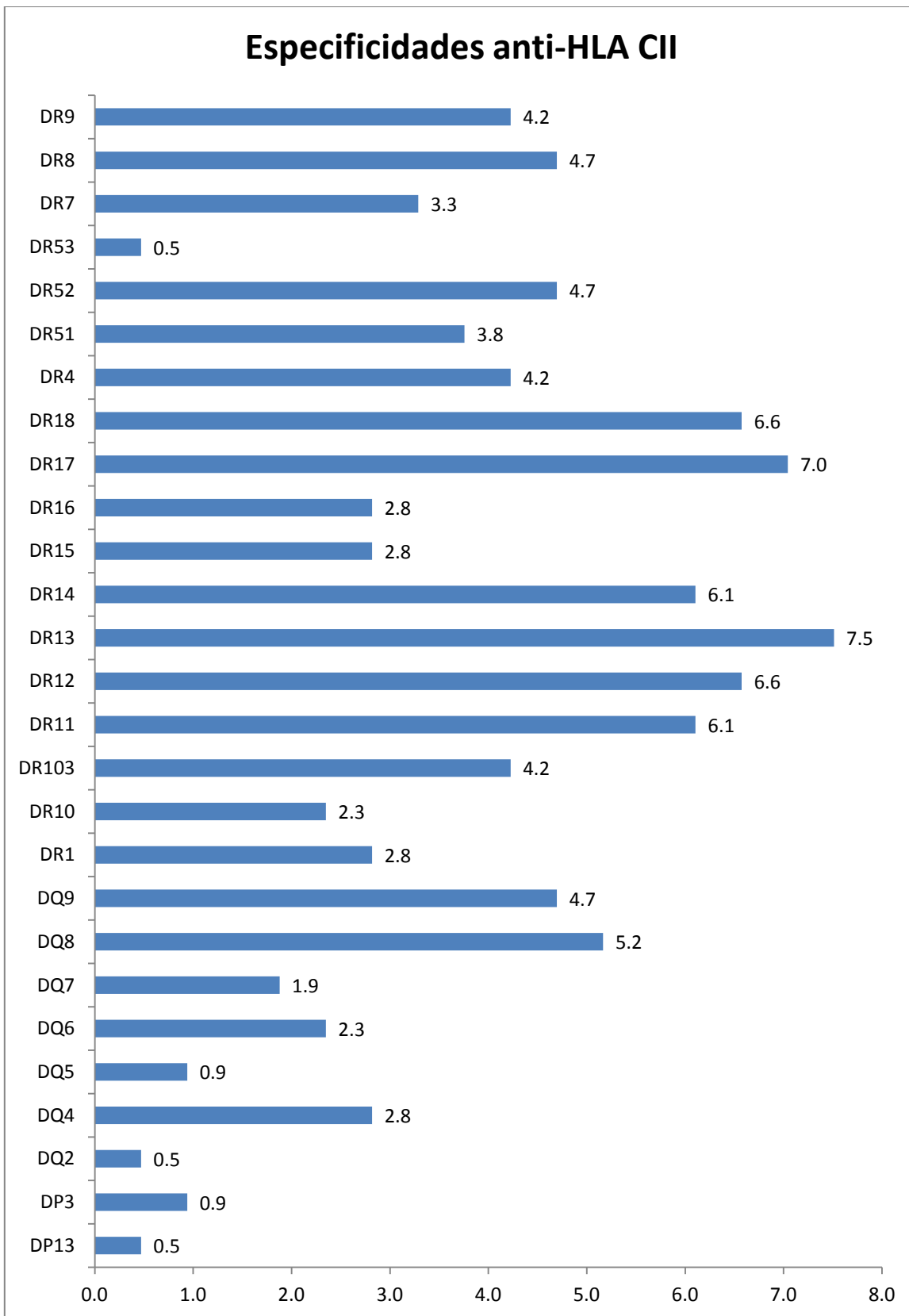


Figura 17. Frecuencia y especificidad de los anticuerpos encontrados contra HLA CII

## 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 2.1 MIC A MUESTRAS vs. CONTROLES

**Tabla 17. Tabla de contingencia GRUPO \* MIC A**

Recuento

		MIC A		Total
		POSITIVOS	NEGATIVOS	
GRUPO	CONTROLES	3	11	14
	MUESTRAS	37	49	86
Total		40	60	100

**Tabla 18. Pruebas de chi-cuadrada**

**Pruebas de chi-cuadrada**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2.339 <sup>a</sup>	1	.126		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	1.526	1	.217		
Razón de verosimilitudes	2.513	1	.113		
Estadístico exacto de Fisher				.152	.106
N de casos válidos	100				

a. 0 casillas (0.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 5.60.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

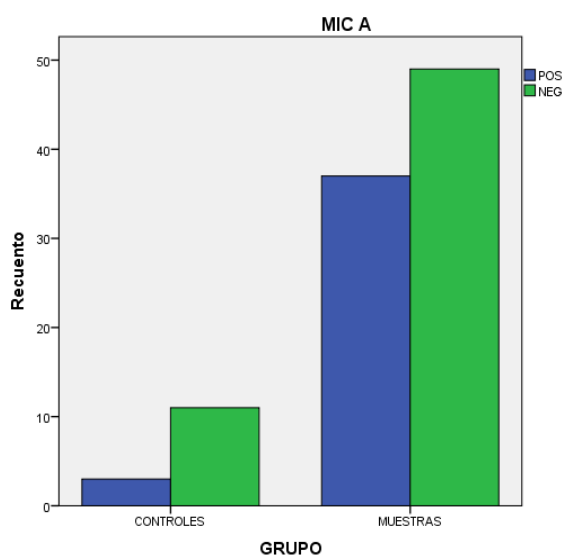


Figura 18. Gráfica de comparación de anticuerpos MIC A Muestras vs. Controles

Para la realización del análisis estadístico entre muestras y controles en la búsqueda de anticuerpos anti-MIC A, únicamente se consideraron los resultados negativos y positivos, eliminando los resultados indeterminados, por no contar con el estudio de pruebas específicas para esta determinación (tabla 17). El análisis estadístico mostró una  $p=0.106$  ( $p>0.05$ ), lo cual indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa en la determinación de anticuerpos anti-MIC A entre muestras y controles, en el método empleado para su determinación (tabla 18).

## 2.2 SCREENING CI DE MUESTRAS vs. CONTROLES

**Tabla 19. Tabla de contingencia GRUPO \* SCREENING CI**

Recuento

		SCREENING CI		Total
		POSITIVOS	NEGATIVOS	
GRUPO	CONTROLES	15	2	17
	MUESTRAS	87	11	98
Total		102	13	115

**Tabla 20. Pruebas de chi-cuadrada**

Pruebas de chi-cuadrada

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.004 <sup>a</sup>	1	.948		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	.000	1	1.000		
Razón de verosimilitudes	.004	1	.948		
Estadístico exacto de Fisher				1.000	.607
N de casos válidos	115				

a. 1 casillas (25.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1.92.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

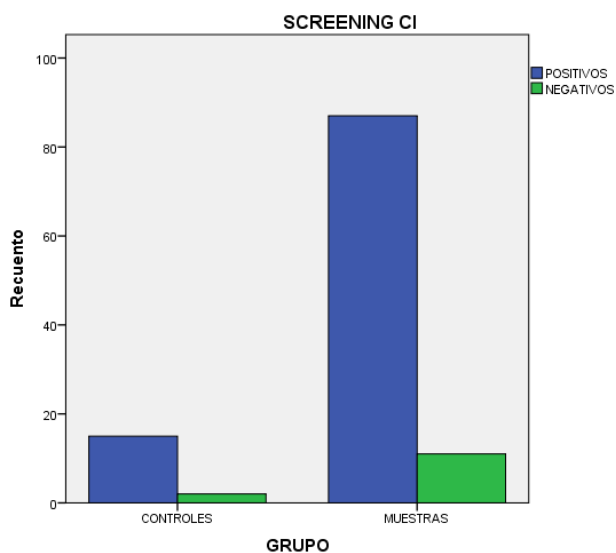


Figura 19. Gráfica de comparación del rastreo de anticuerpos anti-HLA CI Muestras vs. Controles

## 2.3 SCREENING CII DE MUESTRAS vs. CONTROLES

**Tabla 21. Tabla de contingencia GRUPO \* SCREENING CII**

Recuento

		SCREENINGCII		Total
		POSITIVOS	NEGATIVOS	
GRUPO	CONTROLES	11	7	18
	MUESTRAS	68	25	93
Total		79	32	111

**Tabla 22. Pruebas de chi-cuadrada**

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.060 <sup>a</sup>	1	.303		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	.555	1	.456		
Razón de verosimilitudes	1.012	1	.314		
Estadístico exacto de Fisher				.394	.225
N de casos válidos	111				

a. 0 casillas (0.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 5.19.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

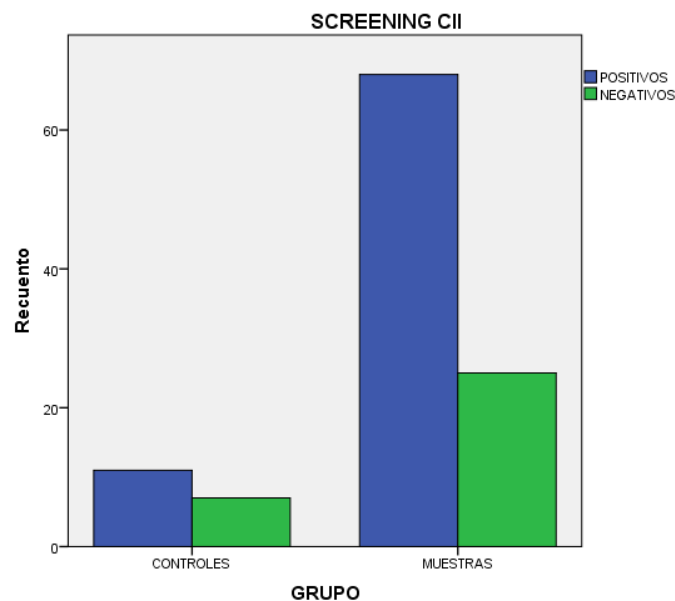


Figura 20. Gráfica de comparación del rastreo de anticuerpos anti-HLA CII Muestras vs. Controles

El análisis estadístico de la prueba de screening CI y Clase II entre muestras y controles, mostró una  $p=0.607$  ( $p>0.05$ ) para Clase I (tabla 20) y una  $p=0.225$  ( $p>0.05$ ) para Clase II (tabla 22), lo cual indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre muestras y controles en la prueba de rastreo para Clase I y Clase II, en el análisis no se tomó en cuenta los resultados indeterminados, por no poder ubicarse en negativos o positivos (tablas 19, 21).



## 2.4 %PRA CI MUESTRAS vs. CONTROLES

**Tabla 23. Tabla de contingencia GRUPO \* PRA CI**

Recuento		PARA CI		Total
		POSITIVOS	NEGATIVOS	
GRUPO	CONTROLES	2	18	20
	MUESTRAS	55	45	100
Total		57	63	120

**Tabla 24. Pruebas de chi-cuadrada**

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	13.534 <sup>a</sup>	1	0.000234		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	11.789	1	0.000596		
Razón de verosimilitudes	15.424	1	0.000086		
Estadístico exacto de Fisher				0.000175	0.000153
N de casos válidos	120				

a. 0 casillas (0.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 9.50.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

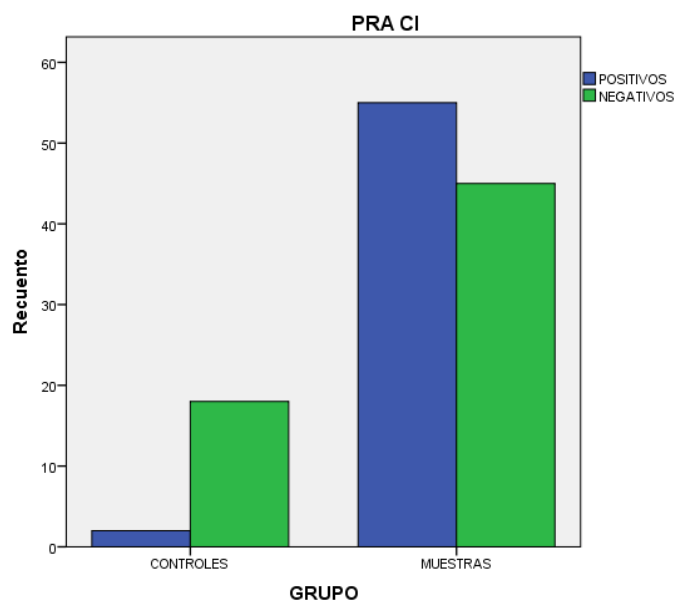


Figura 21. Gráfica de comparación del PRA específico anti-HLA CI Muestras vs. Controles

## 2.5 PRA CII MUESTRAS vs. CONTROLES

**Tabla 25. Tabla de contingencia GRUPO \* PRA CII**

Recuento

		PARA CII		Total
		POSITIVOS	NEGATIVOS	
GRUPO	CONTROLES	1	19	20
	MUESTRAS	39	61	100
Total		40	80	120

**Tabla 26. Pruebas de chi-cuadrada**

Pruebas de chi-cuadrada

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8.670 <sup>a</sup>	1	.003		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	7.208	1	.007		
Razón de verosimilitudes	11.073	1	.001		
Estadístico exacto de Fisher				.003	.002
N de casos válidos	120				

a. 0 casillas (0.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 6.67.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

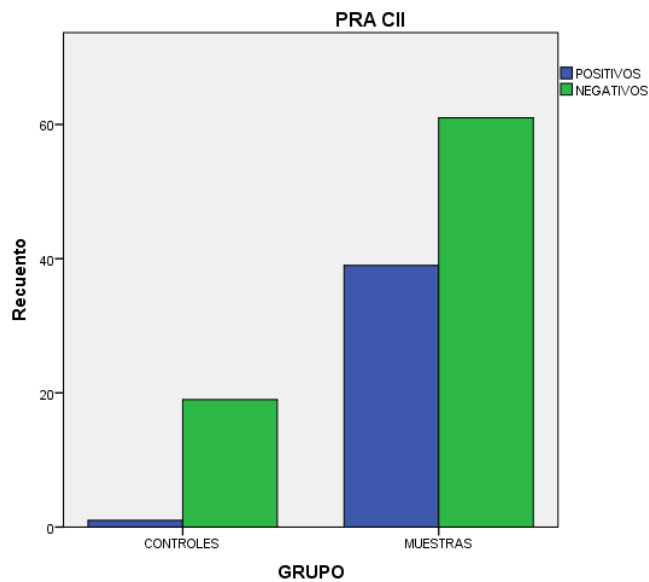


Figura 22. Gráfica de comparación del PRA específico anti-HLA CII Muestras vs. Controles

El análisis estadístico entre muestras y controles en la determinación del % de PRA específico Clase I y Clase II mostró una  $p=0.000153$  ( $p<0.05$ ) para Clase I (tabla 24) y una  $p=0.002$  ( $p<0.05$ ) para Clase II (tabla 26), lo que indica que existe diferencias estadísticamente significativas entre las determinaciones para detectar anticuerpos anti-HLA Clase I y anti-HLA Clase II entre muestras y controles.

## CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.

La identificación de estos anticuerpos es muy importante ya que si se llegan a infundir a través del plasma como medida terapéutica a un paciente, y éste presenta el antígeno específico contra el cual está dirigido el anticuerpo, podría desencadenar una respuesta inmunológica contra él. El TRALI es uno de los eventos adversos más comunes asociado al uso de plasmas de mujeres con embarazos previos.

En el estudio se pudo identificar la presencia de anticuerpos anti-HLA en el 70% de las donadoras multigestas y el 10% de las donadoras sin antecedentes aloimmunizantes por medio de la prueba %PRA específico. Es importante destacar que las diferencias encontradas entre las pruebas de rastreo de anticuerpos (*screening*) y el % de PRA específico se debe a las sensibilidades de ambos métodos, siendo el % de PRA específico más sensible que la prueba de *screening*, dado por el número de antígenos purificados unido a cada perla coloreada.

Los anticuerpos anti-leucocitos que se encuentran con mayor frecuencia en los casos detectados de TRALI están dirigidos contra los antígenos HLA Clase I. De todos estos anticuerpos, los que con mayor frecuencia están involucrados en el TRALI son contra HLA-A2.<sup>33</sup> , en este estudio el anticuerpo anti-A2 tuvo una frecuencia de 2.7% (se encontró en 14 de las muestras positivas).

Recientemente, anticuerpos contra antígenos HLA-II, han sido detectados en casos de TRALI.<sup>34-37</sup> En este estudio los anticuerpos dirigidos contra antígenos

HLA CII encontrados con mayor frecuencia fueron contra HLA-DR13 presentes en 16 de las muestras positivas (7.5%), seguido de HLA-DR17 encontrado en 15 de las muestras positivas (7.0%); y de HLA-DR12 y HLA-DR18 encontrado en 14 de las muestras positivas (ambos con 6.6%). Anticuerpos anti-HLA CII presentes en el plasma del donador puede inducir TRALI en un receptor de transfusión vía activación de monocitos. Una vez activados, los monocitos estimulan neutrófilos para producir especies reactivas de oxígeno, lo cual lleva a un incremento en la permeabilidad endotelial y subsecuente edema pulmonar. Esta cascada depende de la compatibilidad entre los anticuerpos del donador y los antígenos HLA CII del receptor<sup>38</sup>.

Estudios realizados en Inglaterra por Lucas G. y cols, demostraron la presencia de anticuerpos anti-HLA CI y/o CII en un 27.23% de un total de 1157 donadoras multigestas. Diversos estudios han desarrollado programas de rastreo de anticuerpos en donadores (Tabla 27). Hay una variación considerable entre los resultados de estos estudios en cuanto a la incidencia de anticuerpos anti-HLA CI y anti-HLA CII, resultados de positividad desde un 8.25%<sup>39</sup> hasta un 68.75%<sup>40</sup>.

**Tabla 27. Prevalencia de anticuerpos anti-HLA en población de donadores. Diferentes autores.**

Publicación	Tamaño de la muestra	Anticuerpos anti-HLA CI (Metodología)	Anticuerpos anti-HLA CII (Metodología)	Anticuerpos anti-HLA CI y CII (Metodología)	Grado de inmunización total
MacLennan <i>et al.</i> , [44]	1166 (mujeres)	78 (6.69%) (ELISA)	47 (4.03%) (ELISA)	52 (4.46%) (ELISA)	15.18%
Fadeyi <i>et al.</i> , [40]	96 (hombres y mujeres)	34 (35%) (microperlas)	18 (19%) (microperlas)	42 (44%) (microperlas)	68.75% (sólo en mujeres)
Middelburg <i>et al.</i> , [43]	1094 (multigestas)	-	-	29-35% (depende del número de partos/ fecha última de parto) (microperlas)	29-35%
Reil <i>et al.</i> , [39]	5332 (multigestas)	294 (5.51%) (ELISA)	89 (1.67%) (ELISA)	57 (1.07%) (ELISA)	8.25%
Triulzi <i>et al.</i> , [42]	3992 (multigestas)	10.4% (microperlas)	11.7% (microperlas)	Mayor a 45.4% con cuatro o más embarazos (microperlas)	67.5%
Powers <i>et al.</i> , [41]	497 (multigestas)	-	-	42.5% (microperlas)	42.5%
Lucas <i>et al.</i> , [45]	1157 (mujeres)	132 (11.41%) (microperlas)	73 (6.31%) (microperlas)	110 (9.51%) (microperlas)	27.2%
Estudio del BCS CMN SXXI Fuentes <i>et al.</i>	100 (multigestas)	31 (31%) (microperlas)	15 (15%) (microperlas)	24 (24%) (microperlas)	70%

ELISA, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; microperlas, ensayo por fluorescencia con microperlas.

Esta variación depende en parte de la población, técnica y estrategia utilizada para detectar estos anticuerpos, además la diferencia entre los resultados probablemente se refleje por el incremento de sensibilidad del ensayo con microperlas comparado con ELISA para la detección de anticuerpos anti-HLA. Otros estudios utilizando Luminex para la detección de anticuerpos anti-HLA han

reportado también alta incidencia de aloinmunización HLA en donadoras de sangre (25.4%)<sup>41</sup>. La prevalencia de anticuerpos anti-HLA incrementa con el número de embarazos previos. 11.2% (uno), 22.5% (dos), 27.5% (3) y 32.3% (cuatro o más embarazos)<sup>42,43</sup>

Las transfusiones por si solas no resultan en un incremento significativo en la prevalencia de anticuerpos anti-HLA, Se han identificado en el 1.7% de mujeres sin embarazos previos, 1% de hombres sin antecedentes transfusionales y en el 1.7% de hombres transfundidos. La razón para la presencia y, desde luego, el significado clínico de la formación de anticuerpos anti-HLA en mujeres sin antecedentes gineco- obstétricos y en hombres sin transfusiones previas es incierta.

La incidencia de TRALI ha sido reportada en diversas partes del mundo, la FDA en Estados Unidos y el SHOT en Inglaterra lo reportan como la causa de morbilidad más frecuente relacionada con transfusión<sup>46</sup>. La incidencia reportada de TRALI por el SHOT ha disminuido significativamente desde 2003<sup>47,48</sup> después de la introducción de una variedad de estrategias, sin embargo el TRALI no ha sido eliminado por completo a pesar de todas las medidas preventivas. Las últimas iniciativas sobre el rastreo de anticuerpos en donadoras y donadores con antecedentes de aloinmunización debe reducir importantemente la incidencia de esta patología.

Los ensayos para la identificación de anticuerpos anti-HLA utilizados en el Banco Central de Sangre son altamente sensibles y han mostrado tener gran relevancia clínica en rechazo a trasplantes.

La Cruz Roja de Alemania y el Instituto Paul Ehrlich indican que el plasma que se utilice con fines terapéuticos debe provenir de donadores sin antecedentes de embarazos<sup>41</sup>. La sangre proveniente de donadoras con antecedentes de embarazo puede ser utilizada para la producción de plasma terapéutico si el concentrado es negativo para anticuerpos anti-HLA CI y CII.

Los resultados correspondientes a la determinación de anticuerpos anti-eritrocitos no se muestran debido a que en todos los casos (muestras y controles) el resultado fue negativo, no encontrándose anticuerpos contra eritrocitos. Sin embargo es importante destacar que Holuskova y cols, en un estudio de 33 818 mujeres con antecedentes gineco-obstétricos previos encontraron anticuerpos anti-Eritrocito en un 1.4% del total de muestras, encontrando mayor frecuencia en anticuerpos anti-E (0.51%), seguido de anti-D (0.38%) y anti-M (0.13%)<sup>32</sup>.

La técnica empleada para la determinación de anticuerpos anti-HLA Clase I y Clase II ha demostrado ser altamente sensible y específica, lo que es apoyado por diferentes autores que han realizado estudios similares.

Dentro del IMSS no se ha reportado algún trabajo como éste para comprobar la presencia de anticuerpos anti-HLA Clase I y Clase II en donadoras de sangre con antecedentes de embarazos, por lo que este estudio se puede utilizar como referente en la materia.



El número de muestras y controles se determinó de acuerdo a la cantidad de donadoras que acuden a donar al BCS y que cumplieron con los criterios de inclusión, sin pasar por alto el costo de este tipo de estudios que puede ser elevado.

En nuestro país la NOM-253-SSA1-2012, para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos, menciona en su apartado 6.10.5.23: *los donantes de plasma mediante aféresis, que tengan antecedentes de aloinmunización, tales como las personas que se hubiesen transfundido o las mujeres que tengan antecedentes de embarazos previos será motivo de exclusión permanente para donar plasma mediante aféresis.* Si bien, este apartado menciona el plasma como hemocomponente, sería importante realizar estudios similares a éste que compruebe la inocuidad o nula presencia de anticuerpos anti-HLA de Clase I y/o Clase II en plaquetas obtenidas por aféresis, toda vez que éstas se encuentran suspendidas en plasma.

## **CAPÍTULO VII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.**

### **1. CONCLUSIÓN**

Con el presente trabajo se comprobó que la presencia de anticuerpos anti-HLA están presentes en la mayoría de las mujeres multigestas y el uso de sus plasmas como terapia transfusional podría desencadenar eventos adversos posteriores a su administración, como lo es el TRALI.

La identificación de anticuerpos anti-HLA a través de la prueba de Screening no mostró diferencias estadísticamente significativas al comparar a las donadoras multigestas con las donadoras nuligestas ( $p= 0.607$  para Clase I y  $p= 0.225$  para Clase II); sin embargo la prueba más sensible (%PRA) mostró diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos, para Clase I se identificó una  $p= 0.000153$  y para Clase II una  $p= 0.002$

La identificación de anticuerpos anti-MIC A únicamente se realizó a través de la prueba de Screening, al hacer la comparación estadística entre las muestras y los controles no se encontraron diferencias significativas con una  $p=0.106$

El rastreo de anticuerpos irregulares fue negativo para las 120 donadoras (multigestas y nuligestas) por lo que no se puede asociar su presencia con una posible reacción postransfusional.

## **2. PERSPECTIVAS**

Se busca implementar metodologías que comprueben la presencia de anticuerpos anti-HLA como pruebas de rutina en los grandes bancos de sangre, además de la realización de estudios para identificar anticuerpos anti-neutrófilos y anti-plaquetas en una mayor cantidad de muestras y controles, esto contribuiría en gran medida en muchas de las decisiones clínicas del médico y manejo adecuado del paciente.

Sería recomendable hacer estudios más sensibles y específicos para la búsqueda de anticuerpos anti-MIC A.

## CAPÍTULO VIII. ANEXOS.

### Anexo 1. Guía para determinar anticuerpos anti-MIC A y anti-HLA CI y CII (LABSCREEN®)

1. Agite las perlas **LABSCREEN®** suavemente en vórtex.
2. En cada pozo de la placa combine 5  $\mu\text{L}$  de perlas por cada 20  $\mu\text{L}$  de suero a estudiar. No olvide un pozo con control negativo. Selle la placa.
3. Incube en la obscuridad por 30 minutos 20-25 °C
4. Diluir el buffer de lavado de 10x a 1x (se necesitan 1050  $\mu\text{L}$  de buffer por muestra)
5. Remueva el sello y adicione 150  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado.
6. Selle, agite en vórtex suavemente y centrifugue a 1300 g 5 minutos.
7. Haga flick para eliminar el buffer de lavado
8. Adicione a cada pozo 200  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado
9. Selle, agite en vórtex suavemente y centrifugue a 1300 g 5 minutos
10. Repetir los pasos 9 y 10 una vez más.
11. Haga flick para eliminar el buffer de lavado
12. Por cada pozo utilizado: Mezcle 1  $\mu\text{L}$  de IgG-PE 100x con 99  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado 1x. Prepara un excedente de 2 pozos.
13. Añada 100  $\mu\text{L}$  de IgG-PE a cada pozo
14. Selle la placa y agite en vórtex
15. Incube en obscuridad por 30 minutos 20-25 °C
16. centrifugue a 1300 g 5 minutos
17. Haga Flick para eliminar el buffer de lavado
18. Adicione a cada pozo 200  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado
19. Selle, agite en vórtex suavemente y centrifugue a 1300 g 5 minutos
20. Repetir los pasos 19 y 20 una vez más.
21. Haga flick para eliminar el buffer de lavado.
22. Añada 80  $\mu\text{L}$  de PBS 1x. Selle, agite en vórtex
23. Adquirir las muestras en el equipo Luminex
24. La muestra se puede almacenar hasta 24 h. en obscuridad a 2-5 °C

## **Anexo 2. Guía para determinar anticuerpos anti-Eritrocitos (Rastreo de Anticuerpos Irregulares fuera del sistema ABO). Técnica en tubo**

1. Marcar los tubos de acuerdo al número de células que contenga el panel más el autotestigo (AT).
2. Colocar dos gotas de suero o plasma problema.
3. Adicionar 1 gota de la suspensión de eritrocitos al tubo correspondiente de eritrocitos del panel y eritrocitos problema (marcado como AT).
4. Mezclar:
  - Centrifugar
  - Leer e interpretar
5. Incubar a 37°C. El tiempo dependerá del medio de reacción empleado. Ver indicaciones del fabricante.
  - Solución salina: una hora
  - Albúmina
  - LISS
  - Enzimas
6. Lavar cada tubo de tres a cuatro veces con solución salina, decantando el sobrenadante cada vez, resuspender el botón.
7. Adicione 1 a 2 gotas de suero de Coombs:
  - Mezclar y centrifugar
  - Leer
  - Anotar el resultado
8. El resultado se interpreta como:
  - Positivo: si se presenta aglutinación en alguno de los tubos
  - Negativo: ausencia de aglutinación en cualesquiera de los tubos.
9. A todos los tubos con resultado negativo en fase de Coombs se les adiciona 1 gota de eritrocitos sensibilizados:
  - Mezclar y centrifugar
  - Leer
  - Anotar el resultado

### Anexo 3. Carta de consentimiento bajo información.



## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Entiendo que para este estudio se me tomarán muestras de sangre, las cuales serán empleadas para obtener suero y realizar la determinación de anticuerpos específicos lo que servirá para establecer el grado de sensibilización adquirido de acuerdo a mis embarazos, que recibiré información detallada sobre cualquier duda en cualquier momento del estudio y que estoy en mi derecho de abandonar el estudio en el instante en que yo así lo desee, sin ninguna afectación a la atención que recibo por parte del IMSS

El protocolo de investigación no representa ningún riesgo para la salud de los participantes, quizás un riesgo mínimo en la toma de muestras sanguíneas; entre las posibles molestias esta el dolor, la posibilidad de la formación de un "moretón" en el sitio de punción o una doble punción en el caso de venas difíciles.

No recibiré ninguna retribución por su participación en este estudio, tampoco representa un gasto para usted. Al aceptar participar se realizarán estudios de laboratorio completos para conocer el grado de sensibilización que ha adquirido por previos embarazos que contribuirá a que el uso de la sangre y sus componentes se utilicen de la manera más adecuada.

También he sido informada que mi identidad será confidencial todo el tiempo y que no será divulgada en ningún tipo de publicación.

Nombre	Firma
Donador _____	_____
Investigador _____	_____
Testigo _____	_____
Testigo _____	_____

El presente trabajo está aprobado por el Sistema de Registro Electrónico en línea de la Coordinación de investigación en Salud (SIRELCIS) con número R-2012-3601-213

## CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA.

1. Murphy K, Travers P, Walport M. Inmunobiología de Janeway. McGraw-Hill, Séptima Edición. México 2009. p. 17, 111, 120
2. Rojas-espinosa. Inmunología (de memoria). Panamericana, Tercera Edición. México 2012. p. 97, 187-188, 211-219
3. Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología Fundamentos. Panamericana, Décimo Primera Edición. México 2010. p.39, 40, 145-147
4. The Biology Project, University of Arizona [Disponible en: <http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/antibody/structure.html>] (consultada: 4 de noviembre de 2013).
5. Charron D. HLA, immunogenetics, pharmacogenetics and personalized medicine. *Vox Sang* 2011; 100:163-166.
6. Brown C.J. Clinical relevance of the HLA system in blood transfusion. *Vox Sang* 2011; 101:93-105.
7. Martínez-Álvarez JC. Simposium Seguridad Transfusional. *Gac Méd Méx* 2013; 149(1):81-89.
8. Rene J. D, Mosteckí J, Hariharan J, and Balazs I. A Structurally Based Epitope Analysis of MICA Antibody Specificity Patterns. *Hum Immunol* 2008 December; 69(12): 826–832.
9. Arbeláez C. Sistema de Grupo Sanguíneo ABO. *Med & Lab* 2009; 7(8): 329-347.

10. Overbeeke MA, Vreeswijk NJ, Ligthart PC. Immunohaematology. Sanquin editores, The other blood group systems ,3th ed. Amsterdam; Sanquin Blood Supply press 2009. p 4-1 – 4-20.
11. Stormey CA, Stack G. The characterization and classification of concurrent blood group antibodies. *Transfusion* 2009; 49: 2709-2718.
12. World Health Organization, Blood transfusion safety, Handbook The Clinical use of Blood, 2011.
13. Resink H, Panzer S, Gonzalez C, *et al.* Haemovigilance for the optimal use of blood products in the hospital. *Vox Sang* 2010; 99:278-293.
14. Fedeyi EA, Adams S, Sheldon S, *et al.* A preliminary comparison of the prevalence of transfusion reactions in recipients of platelet components from donors with and without human leucocyte antigen antibodies. *Vox Sang* 2008; 94:324-328.
15. Ralf K, Rodeina D, Paul A, *et al.* Guidelines for use of RFID technology in transfusion medicine. *Vox Sang* 2010; 98(2): 1-24.
16. Davis A, Mandal R, Johnson M, *et al.* A touch of TRALI. *Transfusion* 2008; 48:541-545.
17. Agbaht K, Altintas ND, Topeli A, *et al.* Transfusion-associated graft-versus-host disease in immunocompetent patients: case series and review of the literature. *Transfusion* 2008; 47:1405-1411.
18. Traherne JA: Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *Int J Immunogenet* 2008; 35:179-192.



19. Roback JD, Caldwell S, Carson J, Davenport R et al. Evidencebased practice guidelines for plasma transfusion. *Transfusion* 2010; 50: 1227-1239.
20. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, et al.: "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in non alloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008; 86:1111-1115.
21. Ravindranath MH, Taniguchi M, Chen CW, et al.: HLA-E monoclonal antibodies recognize shared peptide sequences on classical HLA class Ia: relevance to human natural HLA antibodies. *Mol Immunol* 2010; 47:112111-112131.
22. Tait BD, Hudson F, Cantwell L, et al.: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14:247-254.
23. Serious Hazard of Transfusion Annual Report 2001-2002. [Disponible en: <http://www.shot-uk.org>.] (Fecha última de consulta: septiembre 2013).
24. Martínez JC, Bravo A, Alcaraz J, Guzman E et al. Inmunohematología Recomendaciones de expertos de la Asociación Mexicana de medicina Transfusional A.C.AMMTAC, Primera Edición. Distrito Federal, México. 2011.
25. Chapman L, Aggrey A, Field D, et al. Platelets Present Antigen in the Context of MHC Class I. *J Immunol* 2012; 189(2): 916–923.
26. Sayah D, Looney M, and Toy P. Transfusion Reactions: Newer Concepts on the Pathophysiology, Incidence, Treatment and Prevention of Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI). *Crit Care Clin* 2012; 28(3): 363–372.

27. Sanchez A, Fernandez M, Middleton D, *et al.* Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology* 2011; 133(2): 143–164.
28. Robinson J, Halliwell J, McWilliam H, and Marsh S. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(D1): D1222–D1227.
29. Zúñiga J, Neng Yu, Alosco S, *et al.* HLA Class I and Class II Conserved Extended Haplotypes and Their Fragments or Blocks in Mexicans: Implications for the Study of Genetic Diversity in Admixed Populations. *PLoS One* 2013; 8(9): e74442.
30. Sood R, Makroo R, Riana V, and Rosamma N. Detection of alloimmunization to ensure safer transfusion practice. *Asian J Transfus Sci* 2013; 7(2): 135–139.
31. Mendonça V, Juliano P, Soares S, *et al.* Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2012; 34(3): 206–211.
32. Holuskova I, Lubusky M, Galuszkova D, *et al.* Journal compilation 2010 International Society of Blood Transfusion *Vox Sanguinis* 2010; 99 (Suppl.1), 400.
33. Bux J. Transfusión-related acute lung injury. *Infus Ther Transf Med* 2002;29:271-6.
34. Kopko PM, Popovsky MA, Mackenzic MR, Pagliaroni TG, Muto KN, Holland PV. Human leucocyte antigen class II antibodies in transfusion related acute lung injury. *Transfusion* 2001;41:317-22.

35. Wallis JP, Lubenko A, Wells AW, Chapman CE. Single hospital experience of TRALI. *Transfusion* 2003;43:1053-9.
36. Nicolle AL, Chapman CE, Carter V, Wallis JP. Transfusión-related acute lung injury caused by two donors with anti-human leucocyte antigen class II antibodies: A look-back investigation. *Transf Med* 2004;64:225-30.
37. Virchis AE, Patell RK, Contreras M, Navarrete C, Kaczmarek RS, Jan-Mohamed R. Acute non-cardiogenic lung oedema after platelet transfusion. *Br Med J* 1997;314:880-2.
38. Sachs U, Wasel W, Reil A, et al. Journal compilation 2010 International Society of Blood Transfusion *Vox Sanguinis* 2010; 99 (Suppl.1), 459.
39. Reil A, Keller-Stanislawski B, Gunay S, et al.: Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. *Vox Sang* 2008; **95**:313-317
40. Fadeyi E, Adams S, Peterson B, et al.: Analysis of a high throughput HLA antibody screening assay for use with platelet donors. *Transfusion* 2008; **48**: 1174-1179
41. Powers A, Stowell CP, Dzik WH, et al.: Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy. *Transfusion* 2008; **48**: 2549-2555
42. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, et al.: The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA Alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion* 2009; **49**:1825-1835

43. Middelburg RA, Porcelijn L, Lardy N, *et al.*: Prevalence of leucocyte antibodies in the Dutch donor population. *Vox Sang* 2011; **100**:327-335.
44. MacLennan S, Lucas G, Brown C, *et al.*: Prevalence of HLA and HNA antibodies in donors: correlation with pregnancy and transfusion history. *Vox Sang* 2004; **87** (S3), 4
45. Lucas G, Win N, Calvert A, *et al.*: Reducing the incidence of TRALI in the UK: the results of screening for donor leucocyte antibodies and the development of national guidelines. *Vox Sang* 2012; **103**: 10-17.
46. Fatalities reported to FDA following blood collection and transfusion – annual summary for fiscal year 2010. 2011. <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/UCM254860.pdf> (último acceso 6 de diciembre de 2013)
47. Chapman CE, Stainsby D, Jones H, *et al.*: Ten Years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma. *Transfusion* 2009; **49**: 440-452.
48. Knowles S (ed.), Cohen H, *et al.*: The 2010 Annual SHOT report (2011). <http://www.shotuk.org> (último acceso 6 de diciembre de 2013)
49. Cruz Roja Mexicana. <http://www.cruzrojadf.org.mx/donacion-de-sangre/> (último acceso 6 de diciembre de 2013)