

“Inmunización feto materna contra antígenos de HLA en mujeres de una población paraguaya”

PROYECTO 14-INV-178



Con el apoyo de:



Fondo para la Excelencia de la
Educación y la Investigación

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

Investigador Principal

- Dra. Fernanda Prieto. Especialista Certificada en Histocompatibilidad (CHS) por el Board Americano de Histocompatibilidad e Inmunogénica (ABHI). Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción, PARAGUAY.

Investigadores Asociados

- Bqca. Claudia Cabañas Gadea. Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción, PARAGUAY
- Bqca. Sonia Figueredo López. Máster de Inmunología Avanzada. Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción, PARAGUAY
- Dra. Verónica Villagra Carrón. Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción, PARAGUAY

Asesor Extranjero

- Robert C. Scott, CHS(ABHI), MT(ASCP). UPMC Pinnacle HLA Laboratory. PA, USA



Con el apoyo de:



INTRODUCCION

El embarazo es una condición inmunológica, en la que el feto actúa como un injerto semialogénico expresando antígenos heredados del padre, los que al ser reconocidos como "no propios por la madre" deberían generar una respuesta inmune de rechazo. En condiciones normales este hecho no se da, y la madre no rechaza al feto.

Sin embargo, durante la gestación hay paso de leucocitos fetales a través de las membranas placentarias, por lo que la madre puede sensibilizarse al ponerse en contacto con estos leucocitos portadores de los antígenos HLA paternos. Es decir, durante el embarazo puede producirse una respuesta inmunológica materna dirigida contra el HLA paterno heredado del feto, lo que lleva a la producción de anticuerpos específicos contra los antígenos HLA paternos del feto.

Aunque estos anticuerpos no tienen un impacto sobre el feto, si lo tienen en el trasplante de órganos. El embarazo es la única causa natural de aloinmunización anti-HLA, a pesar de ello la sensibilización HLA a causa de las gestaciones ha sido pobremente estudiada, la mayoría de los datos se obtuvieron mediante el uso de ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) menos sensibles que las técnicas actuales de fase sólida.



Con el apoyo de:



Fondo para la Excelencia de la Educación y la Investigación

OBJETIVOS

Objetivo General: Determinar el porcentaje de mujeres multíparas que presentan anticuerpos anti- HLA en la población paraguaya.

Objetivos Específicos:

- Determinar el porcentaje la sensibilización por antígenos HLA en mujeres nulíparas, uníparas y multíparas que acuden al Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP).
- Determinar la relación del número de gestas con el porcentaje de sensibilización por antígenos HLA.
- Obtener sueros con alto título de anticuerpos específicos contra antígenos de HLA, para ser utilizados como controles y reactivos en el laboratorio de Histocompatibilidad.
- Desarrollo profesional de técnicos e investigadores a través de la adquisición de conocimientos, experiencias y destrezas, resultando en una mayor calidad de los servicios prestados por el LCSP.
- Aportar información a la comunidad científica dedicada al trasplante de órganos y a la transfusión sanguínea, sobre el efecto de los embarazos en la formación de anticuerpos anti-HLA.



Con el apoyo de:



MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio descriptivo, prospectivo, de corte transversal de 319 mujeres paraguayas, que acudieron al Laboratorio Central de Salud Pública entre abril de 2017 y abril de 2018.

Criterios de exclusión: antecedentes de transfusiones sanguíneas, antecedentes de trasplante alogénico, primer trimestre de embarazo.

Recolección de datos: cada paciente fue informado de los objetivos del estudio, firmó un consentimiento informado y completó una encuesta para obtener datos de edad, procedencia y antecedentes obstétricos (trimestre de embarazo si correspondía, número de embarazos, número de abortos, tiempo transcurrido desde el último embarazo, número de padres biológicos).

Muestra: 3 – 5 mL de sangre extraída por punción venosa periférica y colectada en un tubo sin anticoagulante. Suero separado por centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos, alicuotado y almacenado a -80 °C, hasta su procesamiento.

Procedimiento de detección de anticuerpos anti-HLA

Se utilizó la plataforma LUMINEX, adaptación de la citometría de flujo estándar que utiliza microperlas fluorescentes recubiertas de antígenos HLA. Primeramente, a todas las muestras se realizó la prueba de cribaje de anticuerpos anti-HLA de Clase I y II utilizando el reactivo LIFECODES LifeScreen Deluxe de IMMUCOR de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la identificación de los anticuerpos de las muestras positivas se utilizaron los kits de Antígeno Aislado (Single Antigen) LIFECODES LSA Class I y LIFECODES LSA Class II de IMMUCOR siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se interpretaron con ayuda del programa “MATCH IT: Antibody Software”.

Para hallar cPRA (calculated Panel Reactive Antibodies) se utilizó la calculadora de la página web de la Organización Nacional de Procuración y Trasplante (UNOS), del Ministerio de Salud de los Estados Unidos.



Con el apoyo de:



MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis estadísticos

Teniendo en cuenta el número de embarazos efectivos (número de embarazos – número de abortos) las muestras fueron distribuidas en 6 grupos de tratamiento. Grupo 0: mujeres sin historial de embarazo (grupo control); Grupo 1: mujeres con antecedente de un (1) embarazo; Grupo 2: mujeres con dos (2) embarazos; Grupo 3: mujeres con tres (3) embarazos; Grupo 4: mujeres con cuatro (4) embarazos; Grupo 5: mujeres con cinco (5) o más embarazos.

Los datos de las encuestas y los obtenidos de los análisis de anticuerpos se introdujeron en una planilla y se analizaron utilizando herramientas de estadística descriptiva.

Para evaluar la asociación entre variables se utilizaron tablas de contingencia de dos por dos, test de chi cuadrado y razón de momios (odd ratio). Para todas las pruebas de hipótesis se fijó un nivel de significación de $p < 0,05$.

Asuntos Éticos

El protocolo fue revisado y aprobado por el comité de ética (que cuenta con Certificación Internacional FWA N° FWA00020088) de la Institución con Código de Aprobación CEI-LSCP N° 60/200615.



Con el apoyo de:



RESULTADOS

319 mujeres
edad promedio : 39 años (rango: 18 a 85 años)
número de embarazos: de 0 a 10
rango tiempo transcurrido desde última gestación : 0 a 50 años.

101 (31.7%) positivos
60% mujeres multíparas (≥ 2 embarazos), anti-HLA 46% .

34% Clase I
32% Clase II
34% ambas Clases de Anticuerpos.

Se detectaron anticuerpos contra todas las perlas tanto del kit de Antígeno Aislado Clase I como del de Clase II.



Con el apoyo de:



Relación entre número de embarazos y presencia de anticuerpos HLA.



Número de Embarazos	Anticuerpos anti HLA negativo	Anticuerpos anti HLA positivo	Razón de Momios (Odds Ratio)	Nivel de Significancia
0	60	2	Grupo Control	Grupo Control
1	54	10	5.5556	P = 0.0314
2	35	22	18.8571	P = 0.0001
3	35	30	25.7143	P < 0.0001
4	18	15	25.0000	P = 0.0001
≥5	16	22	41.2500	P < 0.0001



Con el apoyo de:



Fondo para la Excelencia de la Educación y la Investigación

Tabla II. Sensibilización a antígenos HLA en los diferentes grupos

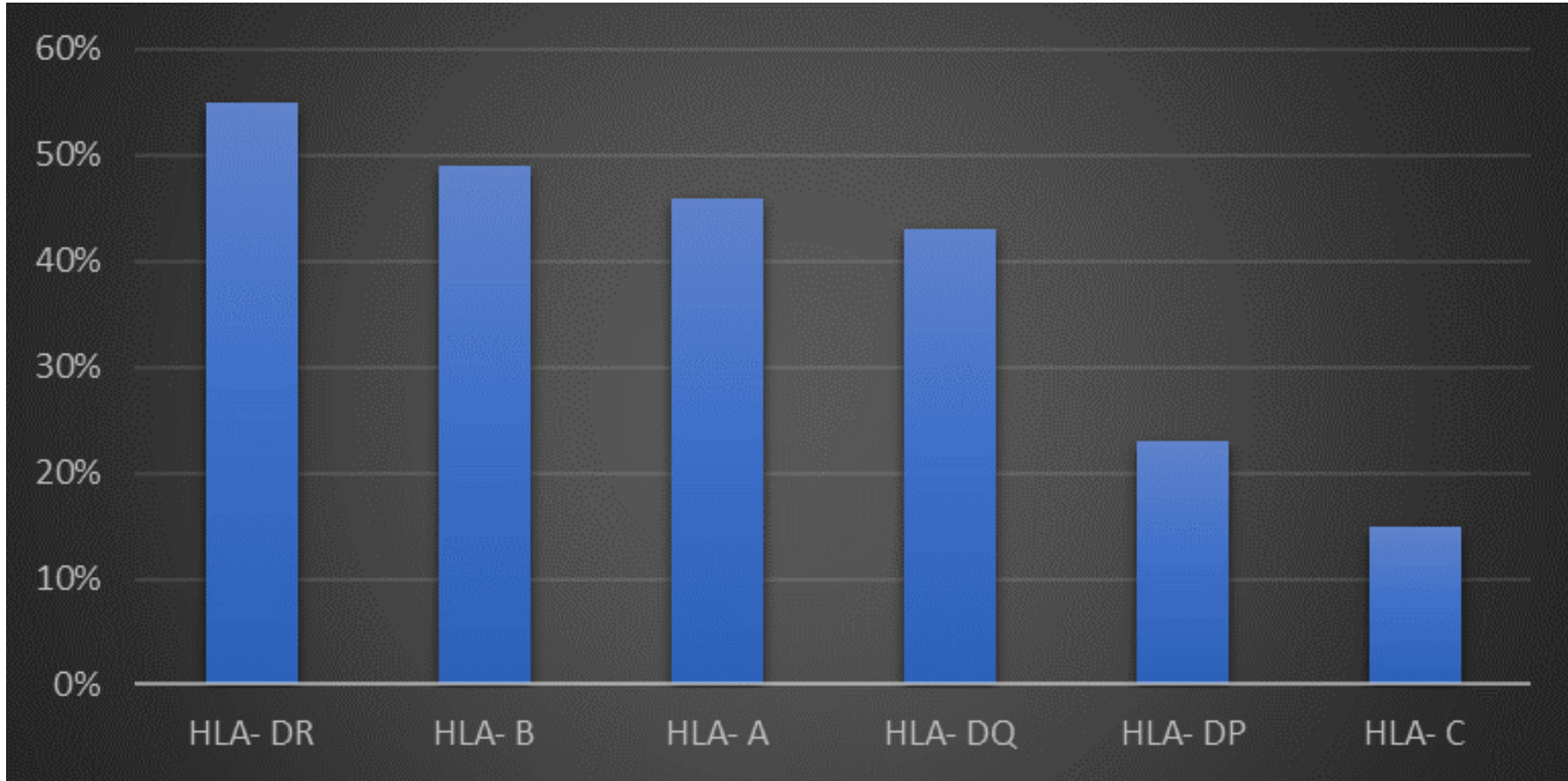
Número de embarazos	0 (n=62)	1 (n=64)	2 (n=57)	3 (n=65)	4 (n=33)	≥ 5 (n=38)
Presencia de anticuerpos HLA	3%	16%	40%	45%	46%	55%
cPRA promedio de todas las muestras	1%	11%	27%	32%	30%	44%
cPRA promedio de las muestras positivas	40%	70%	71%	69%	65%	77%
Rango de valores de MFI máximo de cada muestra positiva	1201 - 1845	1331 - 12451	1208 - 14645	810 - 20032	1162 - 17817	1258 - 21433
Promedio de MFI máximo de muestras positivas	1523	6530	6219	7507	5592	9141



Con el apoyo de:



Fondo para la Excelencia de la Educación y la Investigación



Con el apoyo de:

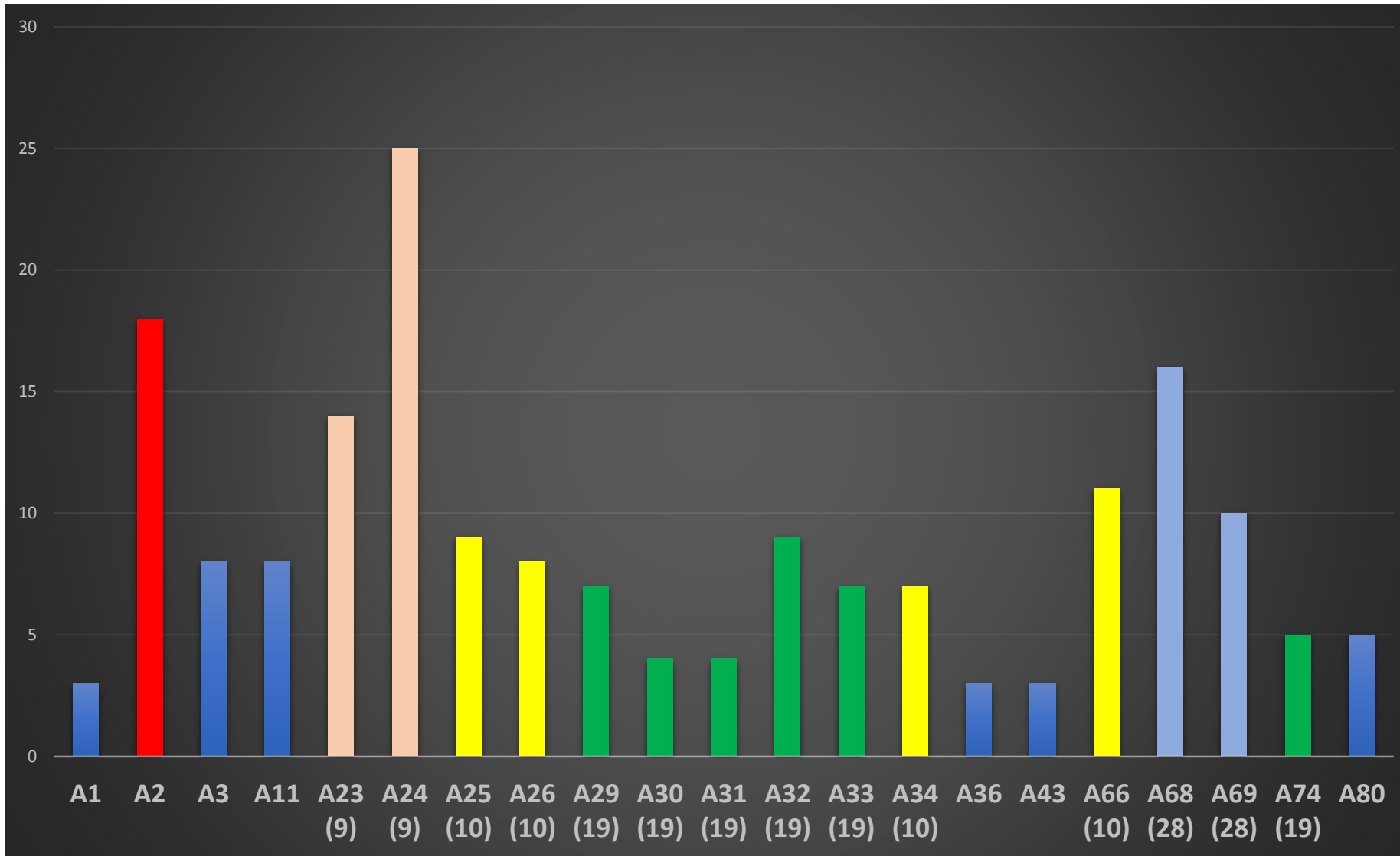


LOCUS	A	B	C	DR	DQ	DP
N	47	51	15	54	41	25
MFI más bajo	933	773	893	1018	894	1033
MFI más alto	18325	21433	16874	20517	20032	9116
MFI promedio	4749	6183	5794	7549	3881	3489



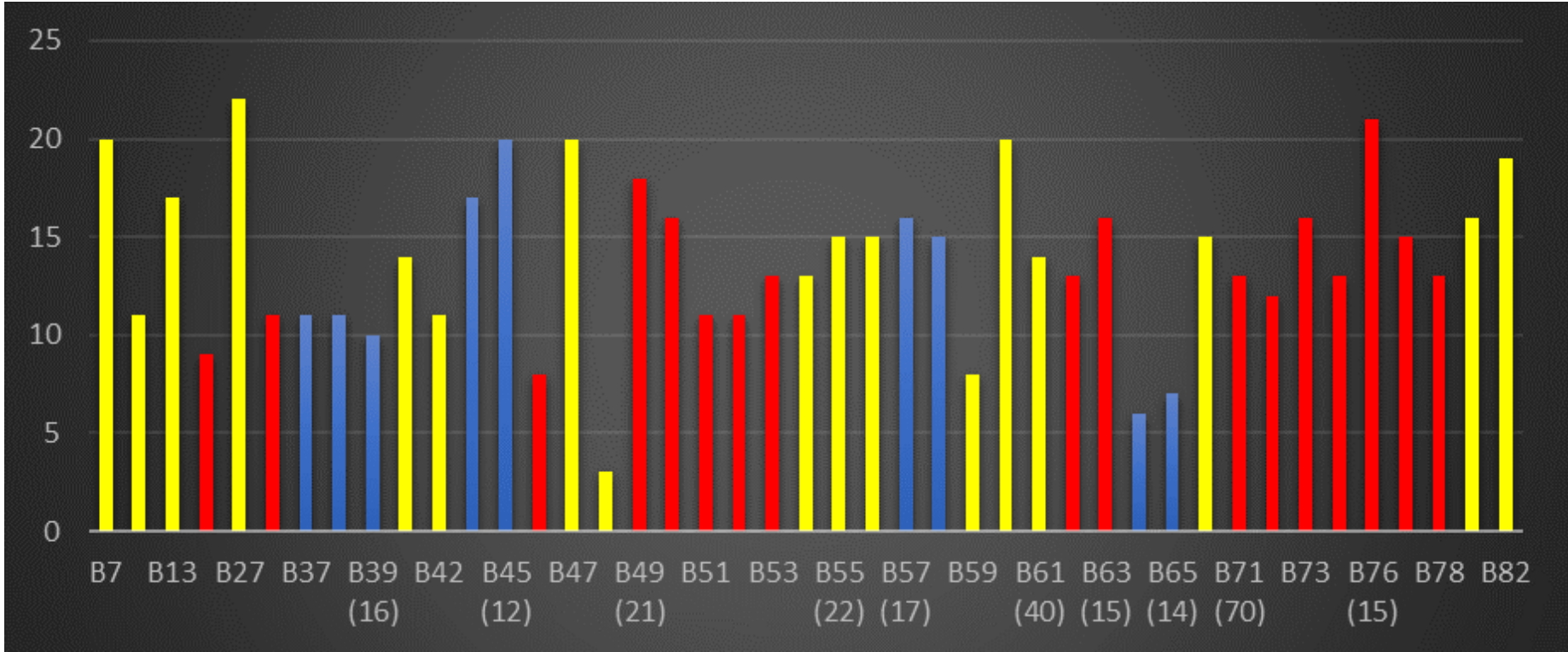
Con el apoyo de:





Con el apoyo de:

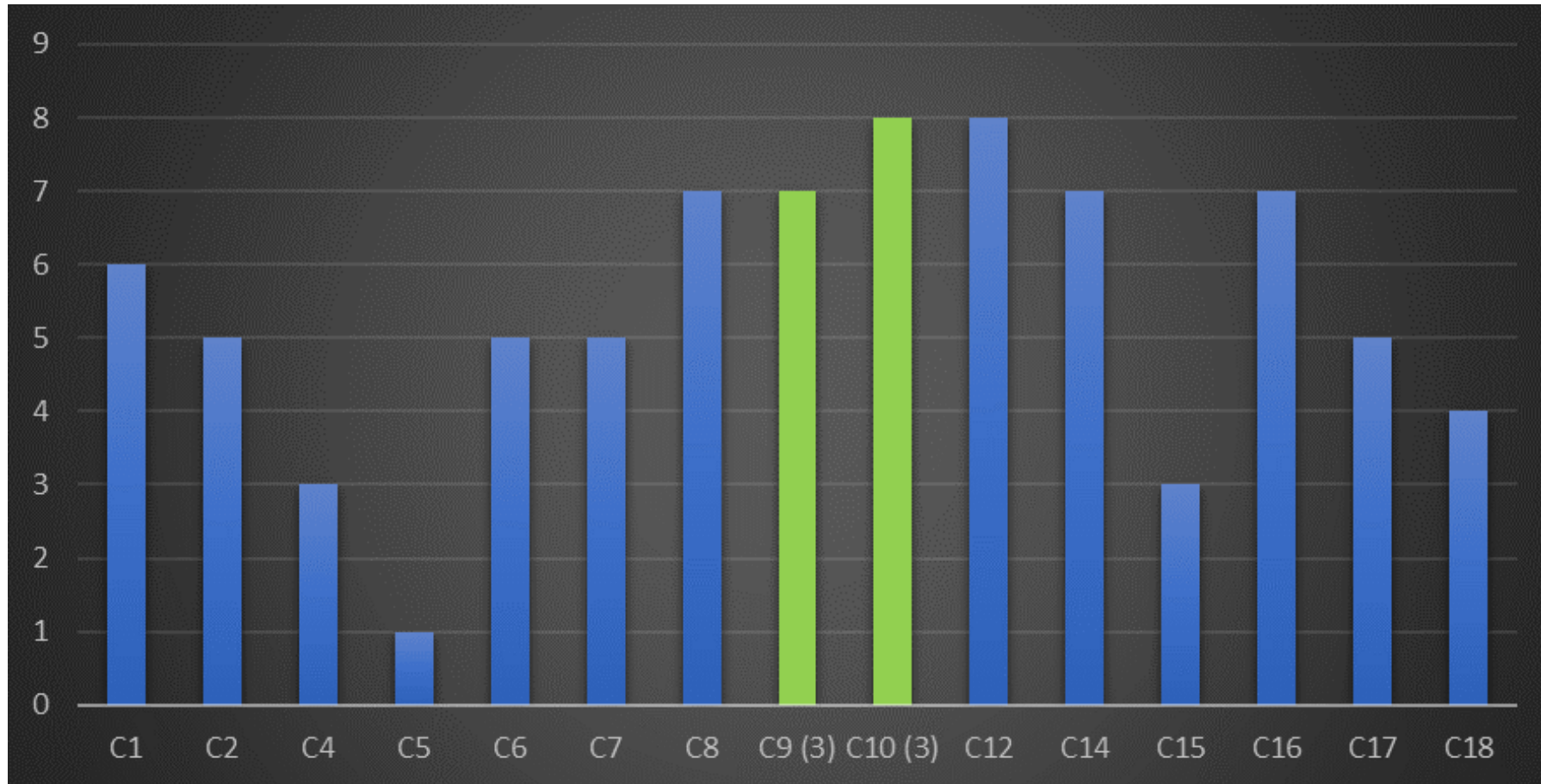




Con el apoyo de:

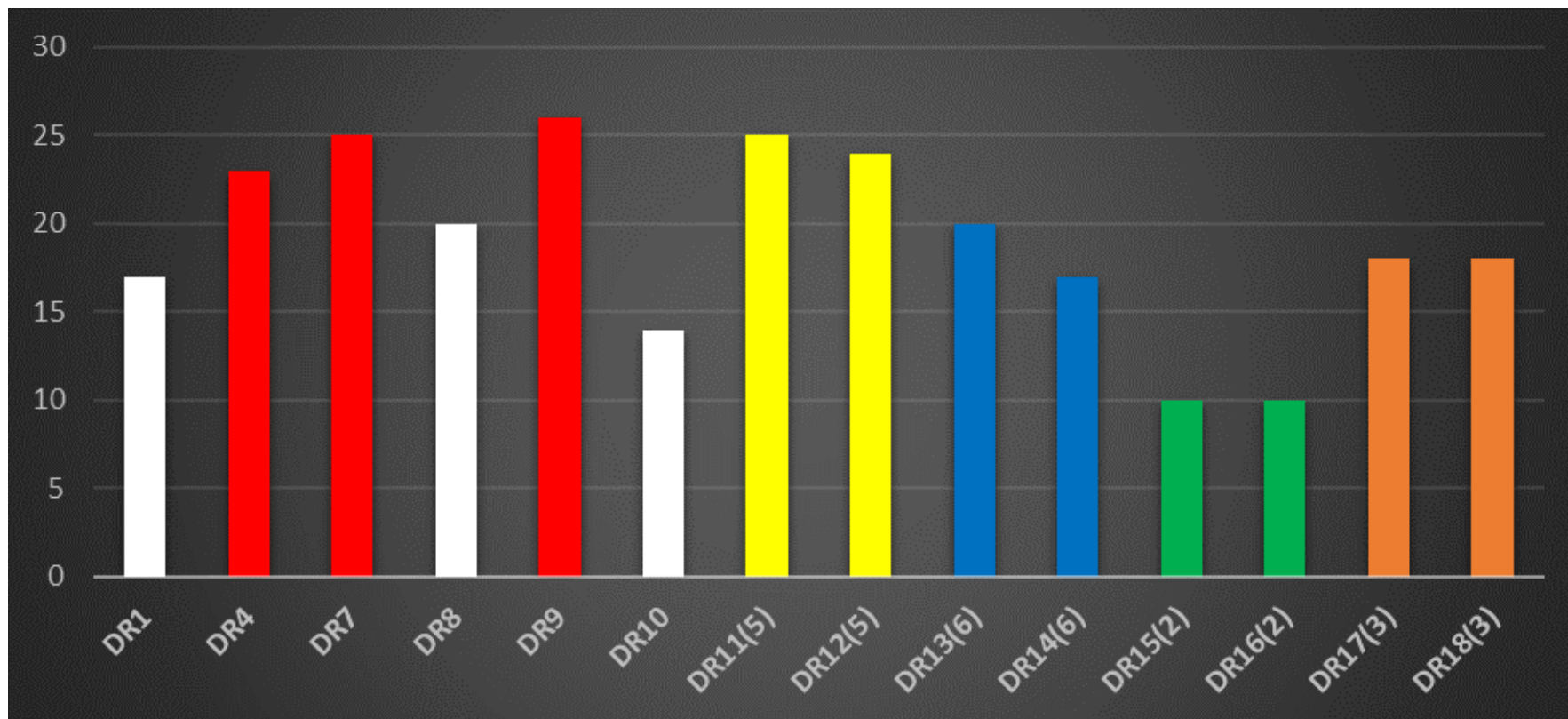


Fondo para la Excelencia de la Educación y la Investigación



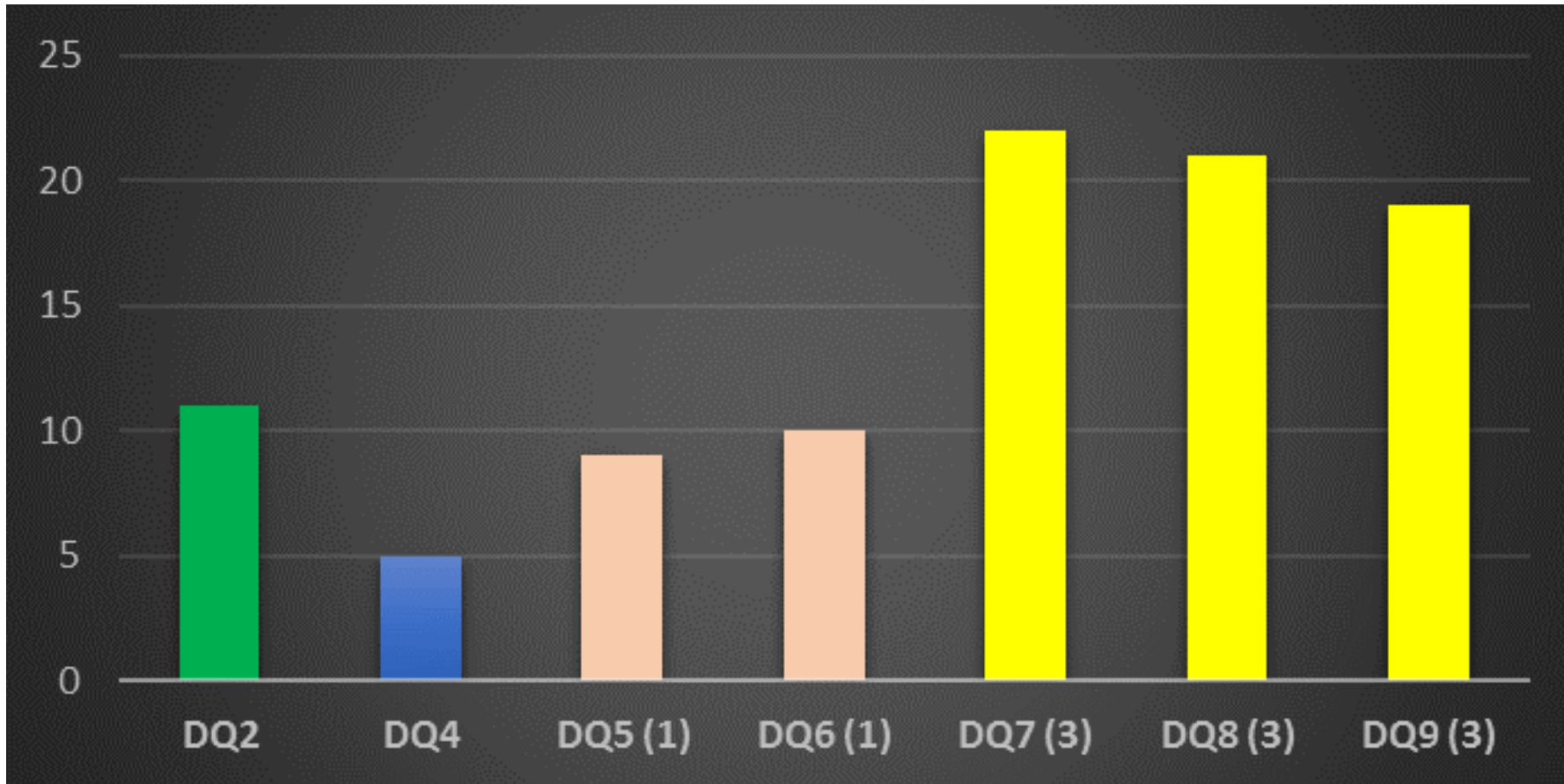
Con el apoyo de:





Con el apoyo de:





Con el apoyo de:



Efecto de la cantidad de padres biológicos $p=0.3732$,
odds ratio=1.3184

Efecto de los abortos $p=0.0011$,
odds ratio=2.2877

Especificidad mayoría poliespecíficos
7 epítipo privado

**Tiempo transcurrido ultimo embarazo parece no estar relacionado.
Hemos encontrado sueros con anticuerpos provenientes de mujeres
ancianas cuya última gestación fue hace 50 años**



Con el apoyo de:



CONCLUSIONES

Encontramos mayor número de mujeres sensibilizadas al aumentar la cantidad de embarazos. En este sentido es importante destacar que al aumentar el número de gestas no solo aumenta la probabilidad de una mujer de desarrollar anticuerpos, sino que también aumenta el porcentaje de PRA (CREGS) y el valor de MFI.



Con el apoyo de:



El orden de antigenicidad encontrado fue DR>B>A>DQ>DP>C, por lo que correspondería que el puntaje asignado a los pacientes en lista de espera de trasplante renal para un determinado donante cadavérico esté en relación con el grado de match priorizando este mismo orden.

Más del 50% de las pacientes sensibilizadas presentaron anticuerpos contra antígenos de HLA-DR. Consideramos que el sistema de puntaje de adjudicación de riñones debe favorecer el match HLA-DR entre la pareja donante-receptor.

Más del 40% de los pacientes positivos para anticuerpos HLA presenta anticuerpos específicos contra antígenos HLA-DQ, lo que demuestra la importancia de una tipificación HLA-DQ del donante y el receptor para obtener una prueba cruzada virtual precisa y confiable.

Aunque la frecuencia de anticuerpos anti HLA-C no fue alta, es importante que el laboratorio de Histocompatibilidad tenga en cuenta estos anticuerpos. En caso de identificarse en el receptor anticuerpos anti-HLA-C puede resultar conveniente ampliar la tipificación del donante a este locus.



Con el apoyo de:



El hecho de que los anticuerpos formados durante el embarazo sean dirigidos contra antígenos HLA del padre, tiene implicancias cuando hablamos de trasplantes vivos entre esposos cuando la mujer es la receptora o cuando los hijos desean donar a sus madres. Frente a esta situación sugerimos que el Crossmatch previo al trasplante sea realizado con la técnica más sensible disponible que es la citometría de flujo.

Actualmente la técnica de Crossmatch por Citometría de Flujo no se en nuestro medio, y aunque gracias a la detección de anticuerpos HLA donante específicos por tecnología Luminex se han evitado muchos trasplantes que podrían haber sido un fracaso, es importante que el laboratorio de Histocompatibilidad cuente también con un citómetro de flujo para realizar estudios de Crossmatch en pacientes hipersensibilizados.



Con el apoyo de:



EJECUCIÓN DE FONDOS

Gs. 411.250.000



Con el apoyo de:

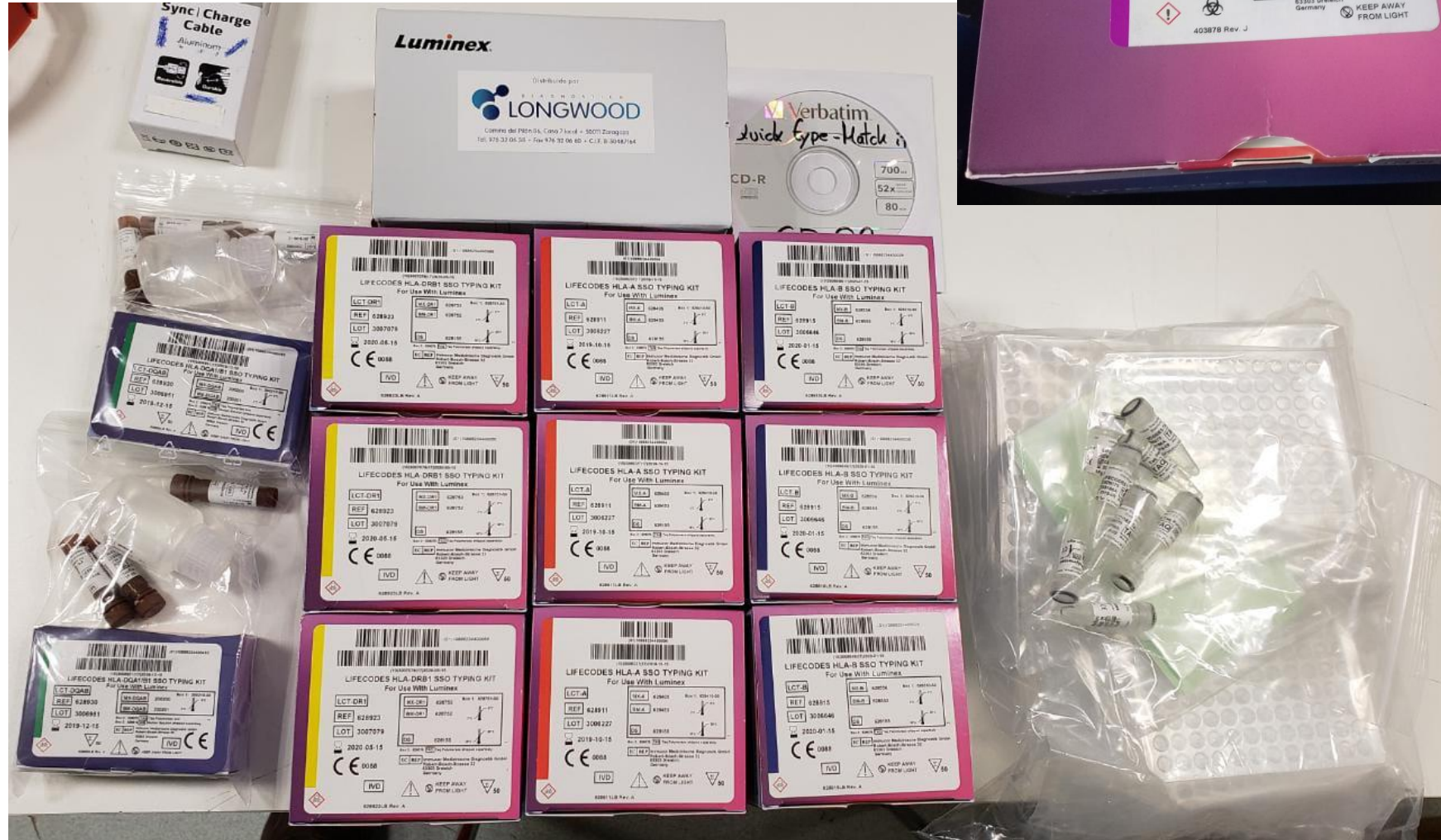


Fondo para la Excelencia de la
Educación y la Investigación

REACTIVOS



Con el apoyo de:





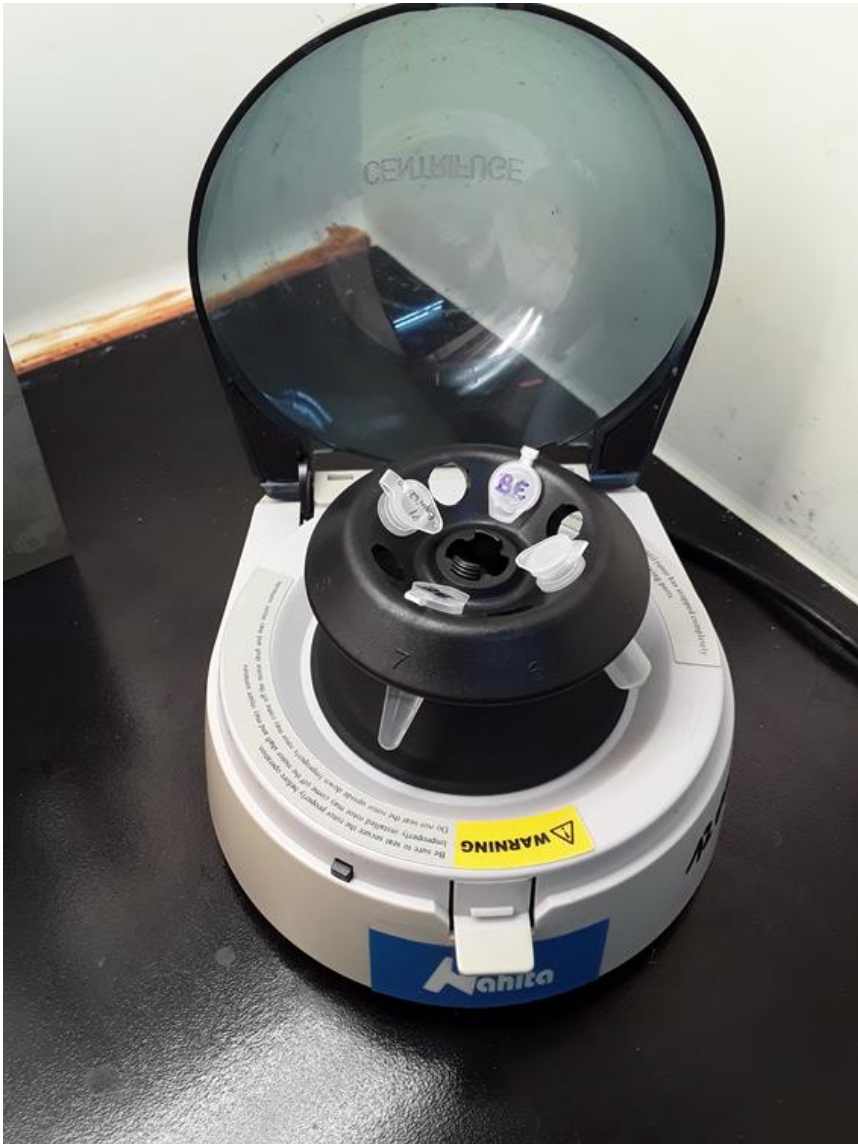
EQUIPOS



Con el apoyo de:



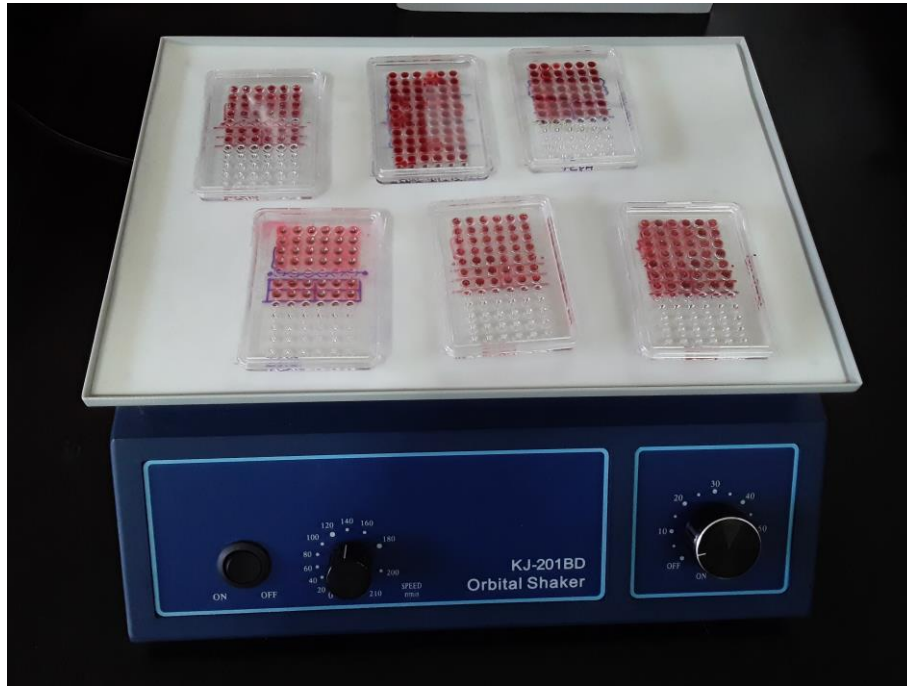
Fondo para la Excelencia de la Educación y la Investigación



Con el apoyo de:



Fondo para la Excelencia de la Educación y la Investigación



Con el apoyo de:



Fondo para la Excelencia de la Educación y la Investigación

CAPACITACIONES



Con el apoyo de:



Fondo para la Excelencia de la Educación y la Investigación



Con el apoyo de:



¡Muchas Gracias por
su Atención!



Con el apoyo de:



Fondo para la Excelencia de la
Educación y la Investigación