

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E
INVESTIGACION EN SALUD**



“DETERMINACIÓN DEL VALOR DIAGNOSTICO DE LA PRUEBA DE ANTICUERPOS REACTIVOS A PANEL (PRA), EN PACIENTES CON ANTECEDENTES DE TRANSFUSIONES, EMBARAZOS Y TRANSPLANTES PREVIOS EN EL INSTITUTO SELADIS DEL 2005 AL 2007”

ELABORADO POR:

LIC. NATIVIDAD MAGALI PAZ GARCIA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE ESPECIALIDAD EN DIAGNOSTICO DE LABORATORIO EN SALUD MENCIÓN “INMUNOLOGIA”

LA PAZ – BOLIVIA

2010

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E
INVESTIGACION EN SALUD**



“DETERMINACIÓN DEL VALOR DIAGNOSTICO DE LA PRUEBA DE ANTICUERPOS REACTIVOS A PANEL (PRA), EN PACIENTES CON ANTECEDENTES DE TRANSFUSIONES, EMBARAZOS Y TRANSPLANTES PREVIOS EN EL INSTITUTO SELADIS DEL 2005 AL 2007”

ELABORADO POR:

LIC. NATIVIDAD MAGALI PAZ GARCIA

ASESORADO POR:

DR. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE ESPECIALIDAD EN DIAGNOSTICO DE LABORATORIO EN SALUD MENCIÓN “INMUNOLOGIA”

LA PAZ – BOLIVIA

2010

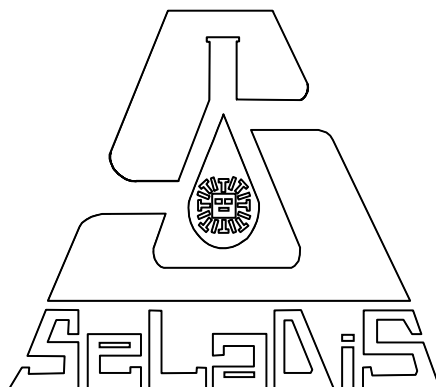
AGRADECIMIENTOS

Al Señor nuestro Dios por haberme dado salud, bienestar y una razón de vivir para llegar a cumplir la meta establecida.

A mi asesor de esta tesis el Dr. Fernando Sosa, el espejo donde cualquier “aprendiz” de Histocompatibilidad e Inmunogenética quisiera verse reflejado, ejemplo de profesionalidad, y de razonamiento por excelencia.

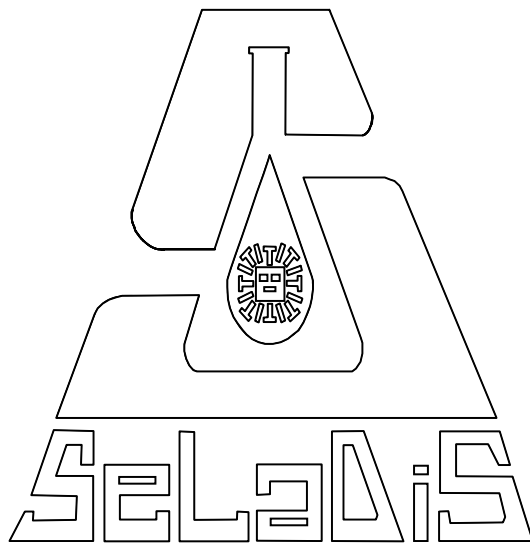
Agradezco al Dr. Rolando Sánchez por su colaboración en todo momento y por sus palabras de ánimo en instantes de desaliento.

Al personal de SELADIS, por la ayuda y apoyo prestado durante mi permanencia en esta Institución.



DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mis padres: David Paz Portugal, Ana García Paredes, a mi tío Andrés García Paredes, a mis hermanas y hermano: Rose Mary, Viviana y Edson, por el amor, comprensión y el apoyo que me brindaron sin los cuales, no hubiera sido posible realizar esta tesis.



INDICE

I.	INTRODUCCION	1
II.	JUSTIFICACION	4
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
A.	Formulacion de la pregunta de investigacion	7
IV.	ANTECEDENTES	8
V.	MARCO TEORICO	10
I.	Transplantes	10
A.	Historia de Trasplante Renal	10
1.	Revision Historica	10
II.	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)	11
A.	Organización Genetica	11
1.	Localizacion Funcion de las regiones del MHC	11
a)	Haplotipos	11
b)	Estructura	12
c)	Regiones HLA	14
(1)	Region de Clase I	14
(i)	Genes HLA de Clase I "No Clásicos"	14
(2)	Region de Clase II	15
(3)	Region de Clase III	15
2.	Mapa Genetico del Sistema HLA	16
3.	Estructura de los Antigenos Clase I	18
a)	Estructura Proteica de los Antigenos Clase I	18
b)	Estructura Proteica de los Antigenos Clase II	21
(1)	Region de la Clase II	24
4.	Polimorfismo	16
5.	Sistema HLA	29
6.	Presentacion y procesamiento de Antigenos Asociados a las Moléculas Clase I y Clase II	30
III.	Factores Predisponentes de la Formacion de Anticuerpos	32
A.	Inmunizacion	32
1.	Pacientes en dialisis	32
2.	Pacientes con Trasplante renal	33
3.	Pacientes con Síndrome Nefrotico	34
B.	Inmunologia de la Reproduccion	34
1.	Placenta	35
2.	Tolerancia Maternofetal	36

	3.	Expresion de moleculas HLA no classicas	36
	a)	HLA-G	37
	4.	Expresion de Antigenos Paternos y produccion de Anticuerpos	37
	a)	Respuesta aloinmune	38
	5.	Mecanismo de Tolerancia de los Grupos Sanguineos	38
	C.	Transfusiones Sanguineas	38
	1.	Antigenos de los Grupos Sanguineos	38
IV.		Formacion de Anticuerpos	39
	A.	Anticuerpos anti HLA Donante Especifico	39
	1.	Tecnicas Directas	39
	2.	Tecnicas Indirectas	39
	3.	Deteccion de Anticuerpos Donante Especifico Pre-Trasplante	39
	4.	Deteccion de Anticuerpos Donante Especifico Post-Trasplante	40
V.		Tecnicas	40
	A.	Ensayo de Citotoxicidad Dependiente de Complemento(CDC)	40
	I.	Analisis de Anticuerpos HLA en pacientes	51
	J.	La dinamica de produccion de Anticuerpos	52
	K.	Posibles Causas de persistencia de Anticuerpos	52
	1.	Otras fuentes pontenciales de Antigenos	53
	L.	Conceptos Generales	54
	1.	Patron general de la tecnica	56
	a)	Selección de la Tecnica	56
	b)	Reacciones Negativas	56
	c)	Titulacion del suero	56
	d)	Comparacion de la reactividad del CDC y del AHG-CDC	57
	e)	Estabilidad del PRA	57
	f)	Normas de las tecnicas Especificas	57
	g)	Interpretacion	57
VI.		Caracteristicas de los Grupos de Reaccion Cruzada (GREC's)	58
	A.	GREC's de las moleculas HLA Clase I	58
	1.	Inmunoserologia	58
	C.	Genetica de poblaciones	68
	1.	Desequilibrio de Ligamento	68
	2.	Las frecuencias genicas	70
	D.	GREC's de las moleculas HLA clase II	72
	1.	Inmunoserologia	72
VII.		Rechazo	74
	A.	Clasificacion del Rechazo	74

1.	Criterios Clinicos	74
2.	Criterios Ecograficos y Doppler	74
3.	Diagnostico del Rechazo mediante Biopsia Renal del Injerto	75
a)	Criterios Histopatologicos	75
b)	Indicaciones de la Biopsia del Injerto Renal	75
B.	Cambios Histopatologicos Precoces	76
1.	Rechazo Hiperagudo	76
a)	Lesion por Isquemia-Reperfusion	76
2.	Rechazo Agudo	76
a)	Rechazo Agudo Celular Leve	76
b)	Rechazo Agudo Vascular Leve	77
c)	Rechazo Agudo Celular Moderado	77
d)	Rechazo Agudo Vascular Moderado	77
e)	Rechazo Agudo Celular Severo	78
f)	Rechazo Agudo Vascular Severo	78
g)	Rechazo Agudo en Resolucion	78
h)	Rechazo Agudo Humoral	78
3.	Rechazo Cronico	79
a)	Rechazo Cronico Leve	79
b)	Rechazo Cronico Moderado	79
c)	Rechazo Cronico Severo	79
B.	Tolerancia B	90
a)	Maduración de los Linfocitos T en el Timo	92
b)	Activación e inhibición de los Linfocitos T por las células dendríticas	92
c)	Clases de los Linfocitos CD4+ y sus funciones	95
d)	Linfocitos T citotoxicos	96
VI.	OBJETIVOS	100
A.	Objetivo General	100
B.	Objetivos Especificos	100
VII.	DISEÑO METODOLOGICO	101
A.	Diseño de Investigacion	102
B.	Objetivos, acciones y diseño de la investigacion	102
C.	Poblacion	103
1.	Criterios de Inclusion	103
2.	Criterios de exclusion	104
D.	Muestra	104
1.	Criterios de Selección	104
E.	Herramientas	104

F.	Tipo de Estudio	104
1.	Caracterizacion de la Investigacion	104
G.	Lugar de estudio	104
1.	Descripcion del ambiente	105
2.	Descripcion del ambito	105
H.	Materiales, Equipos y Reactivos	105
I.	Metodos	107
1.	Aislamiento de celulas mononucleares a partir de sangre periferica	107
a)	Protocolo	108
2.	Ajuste de la concentracion celular	109
a)	Viabilidad Celular	110
3.	Prueba cruzada con amplificador (Cross-Match) por el metodo de microlinfocitotoxicidad dependiente del complemento (CDC)	111
a)	Control de calidad del Cross-Match)	114
4.	Prueba de anticuerpos reactivos a panel de celula en Porcentaje (PRA%)	115
a)	Control de calidad del PRA porcentual	117
5.	Tecnica de anticuerpos reactivos a panel de celulas Especifico QUIK ID CLASS I (PRA especifico)	117
a)	Control de calidad del PRA especifico HLA - Clase I	119
b)	Interpretacion de los resultados	119
J.	Analisis estadistico	120
VIII.	RESULTADOS	121
IX.	DISCUSION	137
X.	CONCLUSIONES	143
XI.	SUGERENCIAS	144
XII.	BIBLIOGRAFIA	145
XIII.	ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Genes de moléculas HLA.	16
TABLA 2.	Localización del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.	29
TABLA 3.	Nomenclatura de los alelos del sistema Antígeno Leucocitario Humano (HLA).	30
TABLA 4.	Inmunizaciones recomendadas para pacientes con patología renal crónica.	33
TABLA 5.	Ventajas y desventajas de las dos técnicas utilizadas para detectar Anticuerpos Anti-HLA en suero.	46
TABLA 6.	Lista de las reacciones serológicas que se incluye dentro de los antígenos de Clase I.	62
TABLA 7.	A1 GREC (1C).	63
TABLA 8.	A10 CREG (10C).	63
TABLA 9.	A2 CREG (2C).	64
TABLA 10.	B5 CREG (5C).	64
TABLA 11.	B7 CREG 7C.	65
TABLA 12.	B8 CREG (8C).	66
TABLA 13.	B12 CREG (12C).	67
TABLA 14.	4C CREG (BW4) Y 6C CREG (BW6).	68
TABLA 15.	Comparación de frecuencias de los alelos de clase I , de acuerdo a los 3 diferentes grupos étnicos (Caucasoides, Mongoloides y Negroides).	70
TABLA 16.	Reacción de las especificidades de clase II.	73
TABLA 17.	Comparación de frecuencias de los alelos de clase II , de acuerdo a los 3 diferentes grupos étnicos (Caucasoides, Mongoloides y Negroides).	73
TABLA 18.	Interacciones medicamentosas.	84
TABLA 19.	Protocolos de inmunosupresión recomendados Donante vivo	87
TABLA 20.	Protocolos de inmunosupresión recomendados Donante Cadaverico Niña o mujer joven	88

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Genes de la región HLA clase I y clase II .	13
FIGURA 2.	Moléculas MHC Clase I presentan péptidos endógenos .	14
FIGURA 3.	Moléculas MHC Clase II presentan péptidos exógenos o del exterior.	15
FIGURA 4.	Mapa genético del MHC Humano .	17
FIGURA 5.	Características de la interacción entre el péptido y la molécula del MHC clase I.	19
FIGURA 6.	Estructura de los Antígenos de Histocompatibilidad clase I. Constan de una cadena de mayor tamaño (cadena pesada), que por un extremo se introduce a la membrana celular y que posee tres dominios extracitoplasmáticos (1, 2 y 3).	19
FIGURA 7.	Disposición de los bolsillos de la unión del péptido a la molécula HLA clase I.	20
FIGURA 8.	Estructura proteica de la molécula HLA de clase II.	22
FIGURA 9.	Estructura de los Antígenos de Histocompatibilidad clase II. consta de una cadena de mayor tamaño (cadena pesada), que por un extremo se introduce a la membrana celular y posee cuatro dominios extracitoplasmáticos (1, 2, 1 y 2).	23
FIGURA 10.	Sitios de unión de las moléculas clase II del MHC donde los AA con interacción no covalente están numerados .	25
FIGURA 11.	Polimorfismo de los genes HLA clase I y HLA clase II.	26
FIGURA 12.	Polimorfismo del MHC. A. Polimorfismo MHC clase I. La mayor variabilidad en aminoácidos en las diferentes posiciones a lo largo de la cadena alfa de las moléculas del MHC clase I, ocurre en las regiones alfa 1 y alfa 2. El mayor polimorfismo se encuentra en los aminoácidos que forman la pared y el piso del sitio de unión a péptido.	27

FIGURA 13.	Polimorfismo MHC clase II. El mayor polimorfismo para la cadena beta de las moléculas clase II se encuentra en los aminoácidos de la región beta 1, que forma la pared y el piso del sitio de unión al antígeno.	28
FIGURA 14.	La diversidad de las moléculas MHC que pueden ser definidas por anticuerpos (serología), es considerablemente menor que por secuenciación.	28
FIGURA 15.	Procesamiento de las proteínas para ser presentados a través de la molécula HLA clase I.	31
FIGURA 16.	Procesamiento y presentación de antígenos asociado a la molécula MHC Clase II.	31
FIGURA 17.	Reacción materno fetal en relación al grupo sanguíneo.	36
FIGURA 18.	Expresión de moléculas HLA Clase I a nivel de los espermatozoides.	37
FIGURA 19.	Pasos del Test de microlinfocitotoxicidad utilizado para el tipaje de moléculas HLA.	41
FIGURA 20.	Fundamento de la técnica de microlinfocitotoxicidad utilizado para el tipaje de moléculas HLA.	41
FIGURA 21.	Principio básico de la técnica de ELISA: Se tapiza la placa con el antígeno HLA específico frente al anticuerpo a determinar del receptor (suero). Se adiciona un segundo antianticuerpo, marcado con una enzima cuyo producto es coloreado.	42
FIGURA 22.	Pasos del proceso de detección de anticuerpos anti HLA, por CMF y diferenciación de la determinación de las células mononucleares en forma grafica.	44
FIGURA 23.	Esquema del fundamento del Luminex.	45
FIGURA 24.	Propuesta de protocolo de monitorización de Ac anti-HLA después el trasplante renal. En los primeros 3 meses después del trasplante renal la monitorización seria más intensiva para prevenir el rechazo agudo, mientras que posteriormente se realizaría anualmente, en busca de una posible evolución hacia rechazo crónico.	47

FIGURA 25.	Cinética de producción de anticuerpos anti-HLA según la fuente de sensibilización producida.	53
FIGURA 26.	Reacciones Cruzadas de HLA-A y HLA-B.	59
FIGURA 27.	Reacción cruzada determinada por serología para el Locus HLA-A.	60
FIGURA 28.	Reacción cruzada determinada por serología para el Locus HLA-B.	61
FIGURA 29.	Reacción cruzada determinada por serología para el Locus HLA-Cw.	61
FIGURA 30.	Organización general del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.	70
FIGURA 31.	Mecanismos celulares y humorales por lo cual el reconocimiento de antígenos de histocompatibilidad del donante por parte del sistema inmunitario del receptor puede desencadenar el rechazo hiperagudo, agudo y/o crónico del aloinjerto.	80
FIGURA 32	La muerte de los timocitos en todas estas circunstancias se consigue por apoptosis.	90
FIGURA 33.	Destino de los linfocitos Th según las citokinas que actúan.	94
FIGURA 34.	Destino de los linfocitos Th en la inflamación crónica e infección bacteriana.	96
FIGURA 35.	Separación de células mononucleares.	108
FIGURA 36.	Material y pasos que se deben tomar en cuenta para determinar la viabilidad celular.	110
FIGURA 37.	Cuadrantes de glóbulos rojos donde se realiza el recuento celular y viabilidad para la prueba del PRA porcentual.	111
FIGURA 38.	Representación esquemática del sembrado de sueros del receptor en una placa de terasaki de 72 pocillos Cross Match, para linfocitos totales.	112
FIGURA 39.	Score para la determinación del porcentaje de las células mononucleares.	113
FIGURA 40.	Representación esquemática del sembrado de sueros del receptor en seis placas de Terasaki de 432 pocillos para la prueba del PRA porcentual.	116

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se trata de demostrar el valor diagnóstico de la prueba de Anticuerpos Reactivos a Panel (PRA) para lo cual se tomó como universo poblacional a 222 pacientes de diferentes centros hospitalarios del país con diagnóstico de Insuficiencia Renal Crónica que habían solicitado la prueba de Cross-Match durante las gestiones del 2007 -2009, de los 222 pacientes 27 en más de una ocasión presentaron resultados positivos contra donante renal. La característica común de estos pacientes era haber estado en contacto con eventos sensibilizantes (embarazos múltiples, transfusiones sanguíneas y rechazo de un primer trasplante). De los 27 pacientes se analizaron 12 casos en los cuales se realizó la detección de Anticuerpos reactivos a Panel de donantes (PRA) por CDC y ELISA.

En pacientes sensibilizados la estrategia ideal es buscar entre la población de donantes uno con bajo riesgo de rechazo inmunológico, por lo que es de vital importancia determinar el porcentaje del isotipo y especificidad de los anticuerpos anti HLA del receptor contra donante evitando de esta manera los Antígenos HLA que son reconocidos como blanco de ataque del Sistema Inmunitario del receptor y prolongar el tiempo de vida funcional del sujeto trasplantado.

La insuficiencia Renal Crónica (IRC) es una enfermedad altamente invalidante debido a que se presentan complicaciones médicas, quirúrgicas, y sociales algunas de ellos debidos al propio tratamiento, como es el caso de la hemodiálisis que es una terapia alternativa que se realiza de 2 a 3 veces a la semana con sesiones de 4 horas/día al término de las mismas las personas salen muy debilitadas por tanto su calidad de vida está en disminución en forma progresiva.

El diseño de estudio aplicado es de tipo longitudinal y retrospectivo. Se ha observado que el principal factor desencadenante de la formación de anticuerpos anti HLA es el trasplante previo que provoca sensibilización incluso del 100% de PRA y como

segundo desencadenante tenemos a las constantes transfusiones sanguíneas debido a la anemia concomitante al daño renal crónico que presentan estos pacientes. Determinamos que pacientes con PRA del 100% para anticuerpos del isotipo IgG, en el lapso de un año disminuyen el nivel de anticuerpos en un 5%, un porcentaje similar de disminución de niveles de anticuerpos fue encontrado en el resto de los pacientes, lo cual indica que para conducir al trasplante a pacientes altamente sensibilizados estos deben ingresar a la terapia de desensibilización.

Para confirmar o descartar la validez de estos resultados se debe hacer el mismo con una población mayor de pacientes sensibilizados. En nuestro país se sabe que el 30% de los pacientes hacen rechazo al trasplante y/o están sensibilizados.

Palabras claves: Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), Sensibilización, Grupos de Reacción Cruzada (GREC), Anticuerpos Reactivos a Panel (PRA).

I. INTRODUCCIÓN

En nuestro medio se han incrementado los casos de insuficiencia renal crónica Terminal (IRCT), muchos de los cuales intentaron tratamientos alternativos como la hemodiálisis pero es un procedimiento que disminuye la calidad de vida y como otra alternativa esta el trasplante renal. Sin embargo, debido a que en los receptores se detecta la presencia de anticuerpos de los isotipos IgG e IgM por sensibilización contra las células mononucleares de sus donantes candidatos, debido a embarazos múltiples, transfusiones sanguíneas y rechazo de trasplantes previos, lo cual se definirá por el hallazgo de anticuerpos presentes en el suero de los receptores. La mayor importancia en este estudio son los anticuerpos IgG que son los de fase crónica que pueden estar presentes en el organismo por periodos muy prolongados hasta de 20 años lo que impediría realizarse la cirugía por el temor de rechazo de tipo agudo, provocando la pérdida del injerto.⁽¹⁾

El instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnostico e Investigación en Salud (SELADIS), a través de su laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética desde hace 13 años realiza pruebas de compatibilidad para trasplantes, y se ha observado mediante la prueba de Cross Match elevada concentración de anticuerpos, tanto en pacientes que desean ir a trasplante como en aquellos trasplantados, por lo que el laboratorio de acuerdo a las necesidades de esta población esta incursionando en pruebas de sensibilización como ser la determinación de Anticuerpos Reactivos a Panel, para determinar cuantitativamente el grado de sensibilización y hacia que antígenos de HLA están sensibilizados los receptores de trasplante, ya sean estos a los antígenos mas frecuentes en nuestra población (antígenos públicos), o aquellos que son específicos (antígenos privados) que provocarían que el receptor disminuya la probabilidad de encontrar un adecuado donante.⁽²⁾

Dentro de las pruebas para los trasplantes de órganos se realiza la prueba de Cross Match (prueba cruzada), mediante la cual se buscan anticuerpos preformados en el suero del receptor contra moléculas HLA presentes en las células de los donantes, si esta prueba presenta un reporte positivo es interpretado como contraindicación para continuar con los pasos subsecuentes hacia el trasplante renal.

La prueba de Cross Match planteado por Terasaki en 1976, ha sufrido modificaciones para mejorar su sensibilidad y especificidad pero aún así presenta limitaciones, debido a que puede detectar anticuerpos irrelevantes no HLA, como ser anticuerpos provocados por otras circunstancias de tipo transitorio, retardando el trasplante. Además no indica la especificidad del anticuerpo debido a su poca sensibilidad porque solo identifica anticuerpos fijadores de complemento, siendo que no todas las subunidades de los isotipos IgG fijan complemento y los que lo hacen requieren cierta concentración mínima para establecer la unión del C1q; con la consecuente activación de la vía clásica del complemento.

Estas pruebas están basadas en la técnica de Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC) y el ensayo inmunoenzimático mediante las cuales se puede determinar la concentración de anticuerpos de los isotipos IgG e IgM. También mediante el PRA-específico se puede determinar la especificidad de los anticuerpos presentes en el suero del receptor y mediante estos datos podemos determinar el grupo de reacción cruzada a la que pertenecen los anticuerpos formados.⁽²⁾

El primer trasplante de riñón fue realizado con éxito con un donante cadavérico en el Hospital Obrero No 1 de La Paz, en noviembre de 1979, por el equipo del doctor Orihuela Montero, donde se inició la terapia de sustitución de órganos como último recurso para salvar la vida de personas con insuficiencia renal Terminal. Y en 1987, en el Centro Médico Quirúrgico Boliviano Belga de Cochabamba a cargo del Dr. Silvestre Arce, luego en 1988 en Santa Cruz de la Sierra en la Clínica INCOR a cargo del Dr. Hernán Vaca Díez se iniciaron la terapia de sustitución de órganos.⁽⁴⁾ Actualmente se ha creado el Programa Renal a cargo del Ministerio de Salud y Deportes y considera la Insuficiencia Renal Crónica Terminal como la segunda

prioridad en nuestro medio por lo que esta tomando medidas para subvencionar los centros de hemodiálisis y las pruebas de laboratorio para que estos pacientes puedan optar al trasplante renal y de esta forma mejorar su calidad de vida.

Por tanto es necesario determinar el valor diagnostico de las pruebas de laboratorio que se aplican a pacientes sensibilizados por factores como las transfusiones sanguíneas, embarazos múltiples y rechazo de trasplantes previos. ⁽²⁾

II. JUSTIFICACIÓN

Algunas personas poseen anticuerpos preexistentes dirigidos contra el HLA, estos anticuerpos se forman después del contacto con las moléculas HLA extrañas como ser por el embarazo, transfusiones sanguíneas y trasplantes previos. La formación de anticuerpos específicos contra antígenos se conoce como sensibilización. Los anticuerpos preformados dirigidos contra antígenos del donador puede causar el rechazo hiperagudo.

En el caso del trasplante renal, los pacientes pasan largos períodos en diálisis. La consecuencia de este procedimiento es que en repetidas oportunidades requieren transfusiones sanguíneas, en este caso depende mucho de que paquete se ha transfundido al paciente ya que este nos puede orientar hacia que tipo de antígeno se ha sensibilizado el receptor, en ciertos casos les transfunden unidad completa, en otros solo plaquetas por tanto los pacientes llegan a sensibilizarse a los antígenos del Sistema ABO-Rh o a los antígenos HLA de las plaquetas.

En otros casos se llegan a sensibilizar por los embarazos múltiples por que el feto es considerado como un injerto y en otros casos por previos trasplantes debido a la poca compatibilidad a nivel del HLA entre donante y receptor. Estos factores provocan que muchos de estos pacientes no encuentren un órgano adecuado para el trasplante porque en muchas oportunidades poseen un "Cross Match" final contra dador positivo, por lo que el trasplante no se realiza. Esto alarga los tiempos de espera y de esa manera el ciclo "espera – factor de riesgo (Transfusiones, Embarazos...) - sensibilización - Cross Match positivo" se repite.

Desde el año 2002 el laboratorio de histocompatibilidad de SELADIS implemento un panel de células de 60 individuos al azar con tipificación HLA desconocido, para obtener datos porcentuales del grado de sensibilización del paciente frente a una determinada muestra de la población, sin embargo este dato nos indica sólo un dato porcentual sin tomar en cuenta la especificidad serológica hacia la cual el paciente esta sensibilizado.

En nuestro país ya se estableció dentro del Ministerio de Salud y Deportes el programa de Salud Renal para pacientes que presentan Insuficiencia Renal crónica, debido a que en nuestro medio se ha incrementado los casos por tanto es necesario frenar la aparición de nuevos casos ya que es una enfermedad que ocasiona problemas a varios niveles como ser familiares y socioeconómicos.

Se debe tomar en cuenta más estudios con relación a los Grupos de Reacción Cruzada (GREC) para evitar la elevada sensibilización que bloquea el trasplante o provoca el rechazo del mismo, dando lugar a una infinidad de problemas para el paciente y su entorno.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La insuficiencia renal es una enfermedad invalidante debido a que provoca problemas a nivel familiar por la desintegración progresiva ya que no todos los componentes familiares toleran este modo de vida de la persona que padece Insuficiencia Renal Crónica esto por que estas personas deben estar en constante vigilancia y control en los procesos de hemodiálisis los cuales deben efectuarse de 2 a 3 veces por semana durante periodos de tiempo de 3 a 4 horas tomando en cuenta que una vez que termine estas sesiones los pacientes salen muy débiles y esto afecta de gran manera en el desarrollo de las funciones que deberían desarrollar en sus respectivos trabajos y a su vez no en todos los lugares toleran el poco desempeño de sus trabajadores así que esto origina el despido de los mismos de sus fuentes de trabajo lo que ocasiona a su vez problemas sociales. Además debemos tomar en cuenta que las sesiones de hemodiálisis tiene el costo de 100Sus y no todos los pacientes pueden cubrir este gasto es por esta razón que una de las alternativas es el trasplante renal por lo que se dice que la Insuficiencia Renal Crónica es una enfermedad que empobrece a los ricos y mata a los pobres. También debemos tomar en cuenta que en este tipo de patología afecta en gran manera los valores morales y las creencias religiosas ya que nuestra sociedad aún no puede asimilar la idea del trasplante.

El proceso de sensibilización es por la presencia de anticuerpos anti HLA del receptor que constituye un problema al conducir a un paciente hacia el trasplante renal. En Bolivia más del 30% de los pacientes trasplantados hacen rechazo renal. Se sabe que pacientes con elevados porcentajes de sensibilización origina dificultades al tratar de encontrar un donante adecuado. Se debe tomar en cuenta la presencia y concentración de anticuerpos anti HLA, debido a que estos pacientes tienen un mayor riesgo inmunológico frente al trasplante, ya que una vez trasplantados, la sobrevida del injerto es incierta, siendo significativamente menor en relación a la sobrevida de los injertos de pacientes no sensibilizados.

La detección de los aloanticuerpos ya sean del Isotipo IgM o IgG contraindica el trasplante, debido a que ambos isotipos de anticuerpos pueden fijar el complemento produciendo como desenlace rechazo hiperagudo con pérdida del injerto.

Los pacientes con Cross-Match positivo son candidatos para la determinación del porcentaje de sensibilización, por ello se requiere implementar el procedimiento de determinación de anticuerpos reactivos a panel porcentual (PRA%) y anticuerpos anti HLA específico (PRA específico) que identifique a la(s) molécula(s) HLA causante(s) del proceso de sensibilización, para dar una oportunidad al paciente de ir al trasplante.⁽⁶⁾

Por tanto se debe realizar un buen análisis de los grupos de reacción cruzada (GREC) en nuestra población para evitar posteriormente una alta sensibilización, lo que provocaría a corto tiempo el rechazo del órgano.

A. FORMULACION DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el valor diagnóstico de la prueba de Anticuerpos Reactivos a Panel (PRA), en pacientes con antecedentes de transfusiones, embarazos, y trasplantes previos, en el instituto SELADIS del 2005 al 2007?

IV. ANTECEDENTES

Estudios recientes realizados respecto a la producción de anticuerpos ha sugerido, que la sensibilización del receptor predispone a un deterioro del injerto y en definitiva al rechazo crónico del mismo. ⁽⁷⁾

La especificidad de anticuerpos se ha detectado mediante la técnica de Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), a través de la prueba de Anticuerpos Reactivos a Panel (PRA), que ha mostrado que los niveles de PRA>50% ocasionan daño a los primeros trasplantes renales ocasionando previa sensibilización para los posteriores trasplantes, por otro lado niveles muy elevados de PRA, entre 76 y 99% son de grado significativo que provocaría un rechazo de tipo hiperagudo es decir en horas ya que esta activada la respuesta humoral. En pacientes en diálisis se observó una notable disminución de la sensibilización en el periodo en que se realizaron las transfusiones sanguíneas y se reemplazó mediante el uso de eritropoyetina para estimular la medula en la producción de glóbulos rojos. En datos observados en previos estudios se denota un aumento del 59% al 72% de pacientes con niveles de sensibilización (0 – 19%), en tanto que los más sensibilizados (PRA: 20-79% y > 80%) disminuyeron entre un rango de 22 a 18% y de 19 a 10%, respectivamente. ⁽⁸⁾

La sensibilidad inmunológica del receptor desempeña un papel importante en el desarrollo de anticuerpos HLA, la cual esta relacionada con el acervo genético de cada población donde se comprobó que los receptores caucásicos presentaron una reacción débil en el proceso de sensibilización en relación a los afroamericanos que presentaron baja supervivencia del injerto por presentar una elevada reacción inmunitaria (67% vs 90%; $p<0,01$). Aparentemente las pruebas de sensibilización presentan una mayor confiabilidad después del trasplante talvez podría deberse a la identificación de de la variabilidad de los anticuerpos en el lapso de tres meses.

Debemos tomar en cuenta que se determinaron anticuerpos con más frecuencia en mujeres que en hombres en una relación de 6:1. El embarazo fue el suceso que más se asoció con la presencia de estos anticuerpos (78.1%), mientras que solo el (4.1%) se relacionaba con las transfusiones sanguíneas. ⁽⁸⁾

En los Estados Unidos entre el 18 al 32% de los pacientes que están en la lista de espera para trasplantes están sensibilizados, lo cual hace que la probabilidad de conseguir donante sea menor y el tiempo en lista de espera sea mucho más prolongado. ⁽⁵⁾

La especificidad del donante se evita en tal sensibilización mediante técnicas apropiadas de Cross-Match, no obstante lo cual existe cierta propagación de la sensibilización que afecta adversamente el resultado del injerto, han demostrado que los niveles del PRA >50% perjudican el resultado de los primeros injertos renales, en tanto que si son inferiores perjudican también a los segundos; por otro lado, niveles muy altos de PRA, entre 76 y 99%, empeoran en grado significativo el resultado, por lo común inferior, de los trasplantes múltiples. En pacientes en diálisis hubo una notable (aunque no del todo imprevista) disminución de la sensibilización en el periodo en que se minimizaron las transfusiones mediante el uso de eritropoyetina. Datos de UNOS de julio 1995 indican que entre 1988 y 1993 hubo un aumento del 59 al 72% en el porcentaje de pacientes de menores niveles de sensibilización (0-19%), en tanto que los más sensibilizados (20-79% y >80%) disminuyeron de 22 a 18% y de 19 a 10%, respectivamente. No obstante, dado que la cantidad de individuos que esperan trasplante ha aumentado espectacularmente en términos absolutos en ese lapso, también aumentó la cifra absoluta de pacientes muy sensibilizados. ⁽⁷⁾

V. MARCO TEORICO

I. TRANSPLANTE:

El trasplante es la transferencia de células, tejidos u órganos vivos de un donante a un receptor con la intención de mantener la integridad funcional del material trasplantado en el receptor.

El trasplante es limitado, por el rechazo que puede generar, excepto por ejemplo la mayoría de los injertos de córnea, cartílago y los trasplantes entre gemelos idénticos.
(1)

A. HISTORIA DEL TRASPLANTE RENAL.

1. REVISIÓN HISTÓRICA.

En **1902**, en la ciudad de Viena, el Dr. Emerich Ullmann, trasplantó con éxito el riñón de un perro, de la fosa lumbar al cuello iliaco del animal.

En **1909**, en la ciudad de Berlín, el Dr. Alexis Carrel, llevo a cabo un trasplante renal de un perro *fox terrrier* a un *bóxer*, consiguiendo una correcta función renal durante 14 días.

En **1933**, en la Ex Unión Soviética, se realizó el primer trasplante renal humano con riñón de cadáver realizado por el Dr. Yun Voronoy.

En **1950**, en norteamericana –Chicago, el Lawler coloca el primer injerto renal en la cavidad abdominal.

En **1952**, en Paris, Vaysse y Oeconoms, realizaron el primer trasplante de donante vivo emparentado.

En **1954**, en Bostón, Murray, consigue realizar con éxito un trasplante entre hermanos gemelos univitelinos.

II. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC):

Es el sistema responsable del reconocimiento de péptidos ya sean propios o extraños, debido a su alto polimorfismo, está relacionado con la sobrevivencia del injerto.

A. ORGANIZACIÓN GENÉTICA.

1. LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS REGIONES DEL MHC.

El MHC es un conjunto de genes alineados en una región extensa y continua del genoma.

- En el ratón, se localiza en el cromosoma 17 y recibe el nombre de región H-2.
- En la especie humana se sitúa en el brazo corto del cromosoma 6 y se conoce como región HLA.

Aunque la organización de los genes es algo diferente en ambas especies, en las dos se pueden apreciar tres grandes zonas que determinan tres tipos de moléculas:

- Genes de Clase I (MHC-I): Determinan glucoproteínas de membrana que aparecen en las células nucleadas, que sirven para presentar antígenos peptídicos de células propias alteradas a los linfocitos T citotóxicos (Tc).
- Genes de Clase II (MHC-II): Determinan glucoproteínas de membranas de células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B), sirven para presentar antígenos peptídicos a linfocitos T, coadyuvantes (colaboradores; Th).
- Genes de Clase III (MHC-III): No todos ellos tienen que ver aparentemente con el sistema inmune, pero entre los que se tienen papeles inmunológicos cabe citar los genes de proteínas del complemento y el factor de necrosis tumoral (TNF).⁽¹⁵⁾

a) HAPLOTIPOS DEL MHC:

Los distintos loci del complejo MHC, están estrechamente ligados: En cada especie de mamífero los distintos loci del MHC, son muy polimórficos; de hecho poseen la

mayor variabilidad genética intraespecífica detectada en la genética de poblaciones. Es decir cada Locus concreto del complejo MHC, posee multitud de variantes alélicas dentro de las poblaciones naturales de cada especie.

Cada individuo hereda un juego de MHC del padre y otro juego de la madre, cada uno con sus distintos alelos. Cada juego completo de alelos del conjunto de genes heredado de un progenitor el que se denomina haplotipo.

En una población, en la que los cruces son al azar, los individuos de cada generación, suelen ser heterocigotos en múltiples loci del MHC.

Los dos alelos de cada locus son de expresión codominante: esto significa que un individuo heterocigoto para los distintos loci del MHC, puede expresar en una célula al mismo tiempo los dos tipos de variantes alélicas de cada locus.

b) ESTRUCTURA.

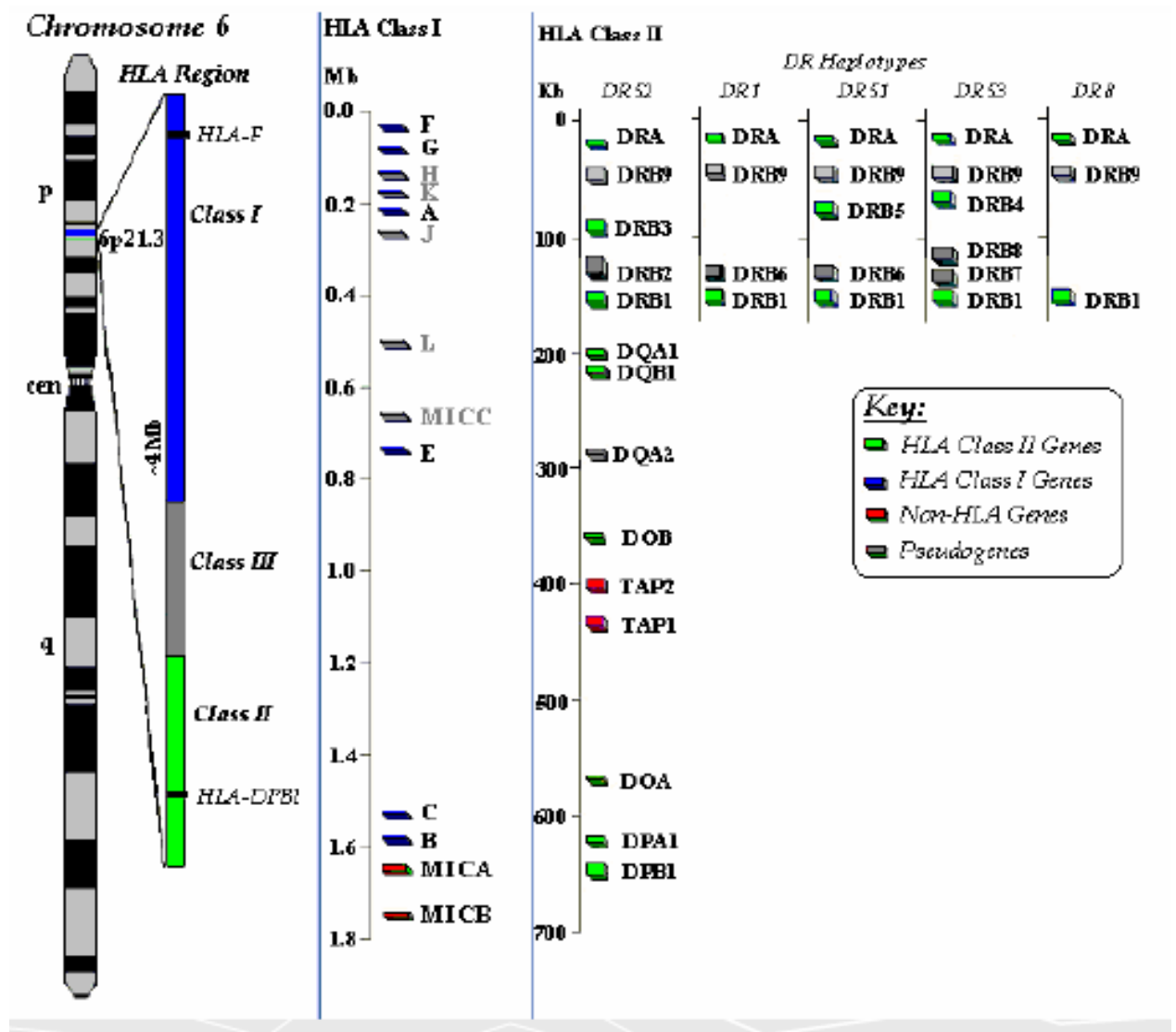
El sistema HLA, se localiza físicamente en el brazo corto del cromosoma 6, el complejo MHC, es bastante grande: Ocupa unos 2 – 3 cM; Es decir unos 4 millones de pares de bases (un 0,8% del genoma). La región HLA-I cubre unos 2.000 Kb, mientras que la HLA-II, supone unos 900 Kb. ⁽³⁾

En el primer mapa genético completo del sistema HLA, se han identificado entre 220 a 240 loci, de acuerdo a las etnias, de los cuales 128 podrían expresarse y el 40% de estos se les supone función inmunológica de tipo innata y adquirida. Dependiendo del origen genético y/o funcionalidad biológica de sus productos, el conjunto de genes de esta región tradicionalmente se ha dividido en 2-4 grandes grupos. ⁽⁴⁾

En la actualidad se admiten tres regiones bien definidas, aunque la caracterización funcional y evolutiva de otros genes en esta región no excluye una revisión futura de esta clasificación (Figura 1).

FIGURA 1.

Genes de la región HLA clase I y clase II:



Fuente: Conformational Changes Induces in Major Histocompatibility Complex. PNAS 95:10094. 1998.

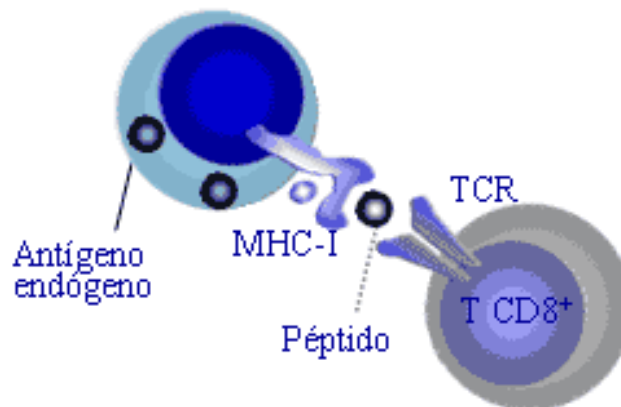
c) REGIONES HLA:

(1) REGIÓN DE CLASE I:

La molécula de clase I, consiste en un polipeptido polimórfico transmembranal (cadena α), con peso molecular de 44.000 enlazado de manera no covalente a un polipeptido no polimórfico (β_2 – microglobulina), con peso molecular de 12.000, que no se encuentra anclado a la membrana. Tres dominios extracelulares de la cadena α , son designados como α_1 , α_2 y α_3 . El sitio de unión para los péptidos antigénicos está formado por la hendidura formada entre los dominios α_1 y α_2 ; la molécula CD8 hace contacto con una porción del dominio α_3 . Se subdivide en tres regiones denominadas A, B y C. ⁽⁹⁾

FIGURA 2.

Moléculas MHC Clase I, presentan péptidos endógenos



Fuente: J. Peña y A. Cabello. CMH. Córdoba. 2007. p.55

(1) GENES HLA DE CLASE I "NO CLÁSICOS" O IB:

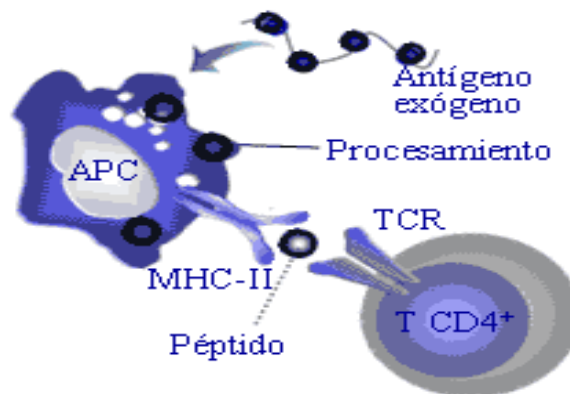
Los genes HLA no clásicos, se los conoce como HLA-E, -F y -G, codifican para proteínas estructuralmente similares a las de los genes clásicos. Se diferencian básicamente de los anteriores por su limitada expresión tisular, su menor polimorfismo y su diferente función aún poco conocidos.

(2) REGIÓN DE CLASE II.

Es la más centromérica y comprende unas 900 kilobases (Kb). Se divide a su vez en tres subregiones de centrómero a telómero: HLA-DP, -DQ y -DR. Los genes de clase II, se definen con la letra D, seguida de la inicial de la subregión (P, Q o R). Cada subregión se compone a su vez de varios genes. Las proteínas para las que codifican estos genes están implicadas en fenómenos de restricción del reconocimiento antigénico mediado por linfocitos T cooperadores CD4+. Su distribución tisular está prácticamente limitada a células del sistema inmune: linfocitos B, macrófagos, linfocitos T activados, etc. ⁽¹⁰⁾

FIGURA 3.

Moléculas MHC Clase II presentan péptidos exógenos o del exterior



Fuente: J. Peña y A. Cabello. CMH. Córdoba. 2007. p.57

(3) REGIÓN DE CLASE III.

Son 36 genes que han sido identificados en el fragmento cromosómico que corresponde a esta región. Estos genes, fuertemente ligados, abarcan un segmento de DNA de unas 100 Kb, no todos sus genes presentan función inmunológica. Así, esta región incluye factores del complemento de la vía clásica (C4A, C4B, C2) y de la vía alternativa (Bf). También mapean en esta zona los genes A y B de factores de necrosis tumoral (TNF y LT), genes para las proteínas inducidas por estrés (HSP70-1

y HSP70-2) y muchos otros, algunos de ellos de función desconocida. La presencia en esta región de genes sin relación funcional o evolutiva con los antígenos HLA, hace que muchos autores no la consideren como perteneciente al Sistema Principal de Histocompatibilidad. ⁽¹¹⁾

TABLA 1.

Genes de moléculas del Antígeno Leucocitario Humano (HLA).

Genes que codifican las moléculas de Histocompatibilidad		
Nomenclatura antigua	Nomenclatura actual	Rol Biológico
HLA A, B y C	HLA clase Ia	Presentación antigénica
HLA E, F y G	HLA clase Ib	Tolerancia materno-fetal
Localizadas en complejo HLA (MIC)	HLA clase Ic	Genes codificantes de otras moléculas polimorfitas (MICA y MICB), se detectan en células endoteliales y células epiteliales. Se expresan en situaciones de stress

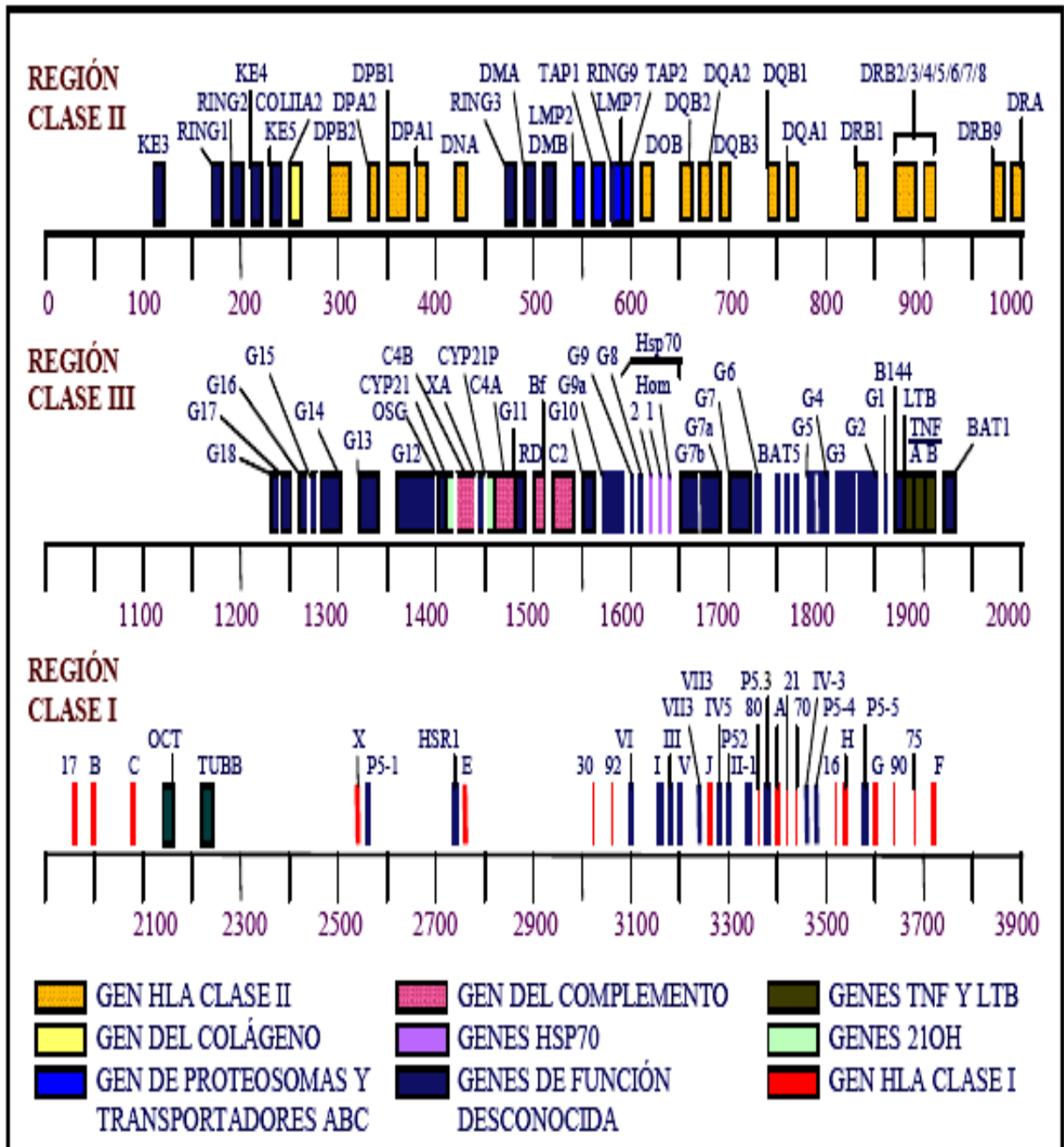
Fuente: D. Stites. 10ª Ed. ⁽⁹⁾

2. MAPA GENÉTICO DEL SISTEMA HLA.

La aplicación de técnicas de genética molecular ha permitido determinar la organización física de los loci del complejo HLA. El primer mapa genético completo del sistema HLA, se ha dado a conocer hace una década, con 224 loci identificados. El mapa genético previo ya constaba al menos de 209 loci, correspondientes a genes, pseudogenes y fragmentos génicos. ⁽¹²⁾

FIGURA 4.

Mapa genético del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)



Fuente: M. Muro et. al. Histocompatibilidad en trasplante. Granada.2009.p.94

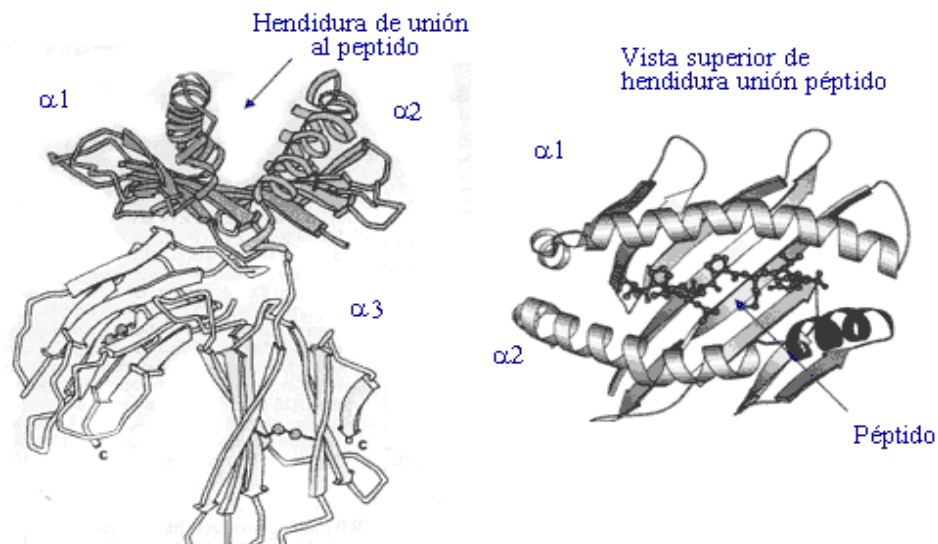
3. ESTRUCTURA DE LOS ANTÍGENOS HLA DE CLASE I.

a) ESTRUCTURA PROTEICA DE LOS ANTÍGENOS HLA DE CLASE I CLÁSICOS.

Los antígenos HLA de clase I clásicos (HLA-A, -B y -C), son glicoproteínas de membrana compuestas por dos cadenas polipeptídicas, una cadena pesada de unos 44 Kilodalton (Kd) codificada en el sistema HLA del cromosoma 6 y una cadena ligera de 12 Kd, la β_2 microglobulina (β_2 -m) cuyo gen se encuentra fuera del sistema HLA, concretamente en el cromosoma 15, la cadena pesada es el único miembro del heterodímero que atraviesa la membrana celular y cuyo extremo aminoterminal está orientado hacia el exterior de la célula. Ambas cadenas se unen no covalentemente en su porción extracelular. La cadena pesada está formada por 338 aminoácidos (aa) (HLA-B) y 341 aa (HLA-A y -C). La porción extracelular de esta cadena se divide en tres dominios globulares bien diferenciados de unos 90 aa cada uno, que pueden escindirse de la superficie celular bajo la acción proteolítica de la enzima papaína denominados: dominio 1 (aa-90, porción N-terminal de la cadena), dominio 2 (aa 91-182) y dominio 3 (aa 183-247), codificados cada uno por un exón. La porción transmembrana con estructura de α -hélice, de unos 25 aa, se continúa con un pequeño tallo citoplasmático de 30 aa aproximadamente, rico en tirosinas y serinas. Los dominios 1 y 2 de las cadenas pesadas con moléculas de clase I, son altamente polimórficos a diferencia de 3 que está más conservado. El dominio 3 y la cadena ligera β_2 -m presentan alta homología de secuencia y estructura con las regiones constantes de las inmunoglobulinas.⁽¹³⁾

FIGURA 5.

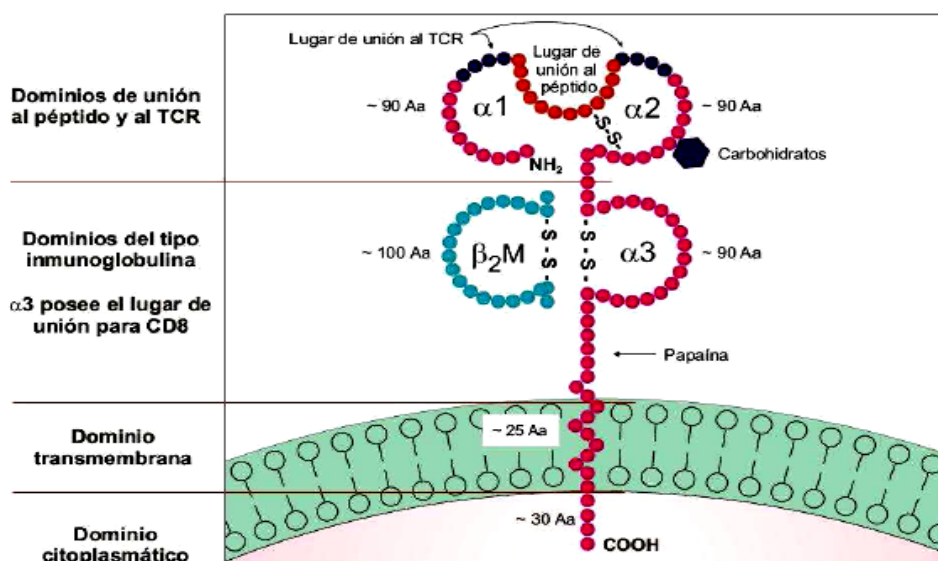
Características de la interacción entre el péptido y la molécula del MHC clase I.



Fuente: J. Peña. Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Córdoba. 2007. p.87

FIGURA 6.

Estructura de los Antígenos de Histocompatibilidad clase I, consta de una cadena de mayor tamaño (cadena pesada), que por un extremo se introduce a la membrana celular y posee tres dominios extracitoplasmáticos (1, 2 y 3).

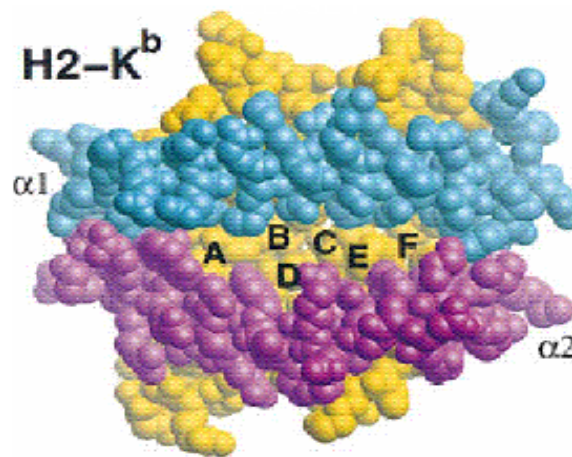


Fuente: S. Soto de Ferrini. CMH.2009.p. 4

La variabilidad que presentan las moléculas de clase I, se traduce en cambios topológicos en los sitios de unión a péptido. Las características químicas y la exclusiva configuración de la estructura de cada valva, explican cómo pueden unir gran variedad de péptidos. Se identificaron una serie de depresiones a lo largo de la valva, son los llamados "Peptide-binding Pockets" o bolsillos. Los péptidos unidos a la valva pueden acomodar una o más de sus cadenas laterales aminoacídicas en estos bolsillos. Se han identificado seis bolsillos denominados con letras, de la A a la F, localizados en las uniones de las láminas con las α -hélices (bolsillos B, C, D y E) o en los extremos de las dos α -hélices (bolsillos A y F), estos dos últimos contienen aminoácidos más conservados que los otros cuatro, de las 19 posiciones de alta variabilidad identificadas en las proteínas de clase I que interaccionan con el péptido del receptor de linfocitos T (TcR) y 17 están situadas en la valva.⁽¹³⁾

FIGURA 7.

Disposición de los bolsillos de la unión del péptido a la molecular HLA clase I.



Fuente: S. Estopiñán T. Complejo Mayor de Histocompatibilidad y desarrollo de vacunas. Colombia. 2007. p.67

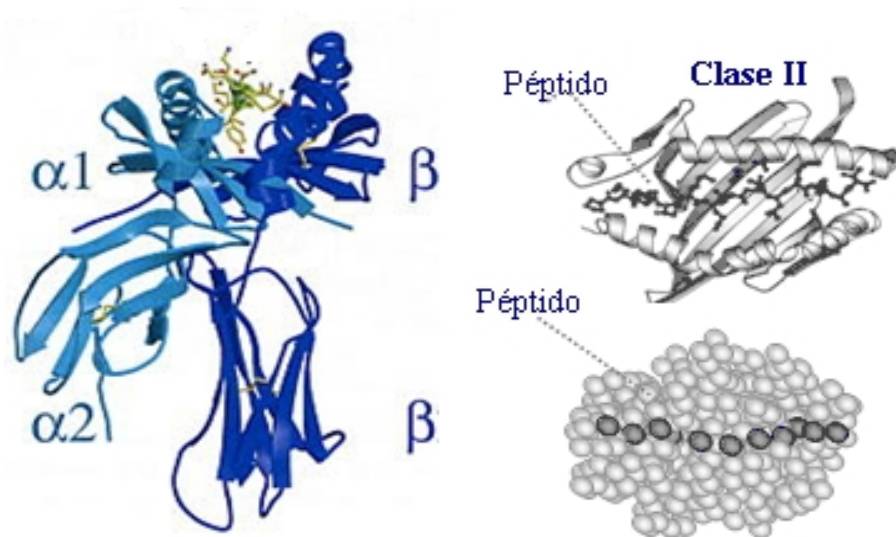
b) ESTRUCTURA PROTEICA DE LOS ANTÍGENOS HLA DE CLASE II.

Las moléculas de clase II (HLA-DP, -DQ y -DR), son heterodímeros transmembrana formados por dos cadenas, una cadena de 33-35 (Kd) y otra de 26-28 Kd asociadas, no covalentemente. Se orientan de tal manera que sus extremos amino-terminal aparecen fuera de la célula. Ambas cadenas presentan dos dominios extracelulares de 90 a 100 aa designados como 1, 2 y 1, 2. Los dominios 1 son todos polimórficos y en algún caso los 1 también (-DQ, -DP). Los dominios 2 y 2, son homólogos a las regiones constantes de las inmunoglobulinas. Un péptido conector hidrofóbico (10 a 12 aa), une los dominios extracelulares de ambas cadenas a las respectivas porciones transmembrana (20 a 25 aa), y a los segmentos citoplasmáticos (8 a 15 aa). Las cadenas poseen dos puntos de N-glicosilación, uno en cada dominio extracelular, un puente disulfuro intradominio en 2. A diferencia de ésta, la cadena posee un único sitio de N-glicosilación en 1 y dos puentes disulfuro intradominio, uno en 1 que genera un asa de 64 aa y otro en 2. Estas modificaciones post-traducción no influyen en el reconocimiento por aloantisueros de estas moléculas de clase II. Intracelularmente, las proteínas de clase II, se asocian con un tercer elemento proteico no polimórfico de 31 Kd, denominado Cadena Invariante (Ii) y codificado fuera del sistema HLA. El complejo Cadena Invariante-dímero / se forma durante la biosíntesis y transporte de las moléculas de clase II; sin embargo, se disocian antes de su expresión en la superficie celular. Se ha postulado que la Cadena Invariante podría jugar un papel importante en el transporte intracelular de las moléculas de clase II en la unión del péptido, usando técnicas de difracción de rayos X, se consiguieron determinar la estructura tridimensional de los antígenos de clase II, concretamente del HLA-DR1, descubrieron que ésta era muy similar a la de clase I, descrita unos años antes y eran casi superponibles. Los dominios 1 y 2 de los HLA-DR1, se asemejaban al dominio 1 y 2-m de las moléculas de clase I.

Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del HLA-DR1 eran superponibles respectivamente a los dominios $\beta 2$ y $\beta 3$. Los cristales obtenidos de la molécula HLA-DR1, también evidenciaron la tendencia que presentan a formar dímeros ($\alpha\beta$)₂, lo que parece tener importancia en la cascada fisiológica de transducción de señales al interior de la célula. El punto de interacción con CD4, se ubica en el dominio $\alpha 2$ de la molécula de clase II.⁽¹⁴⁾

FIGURA 8.

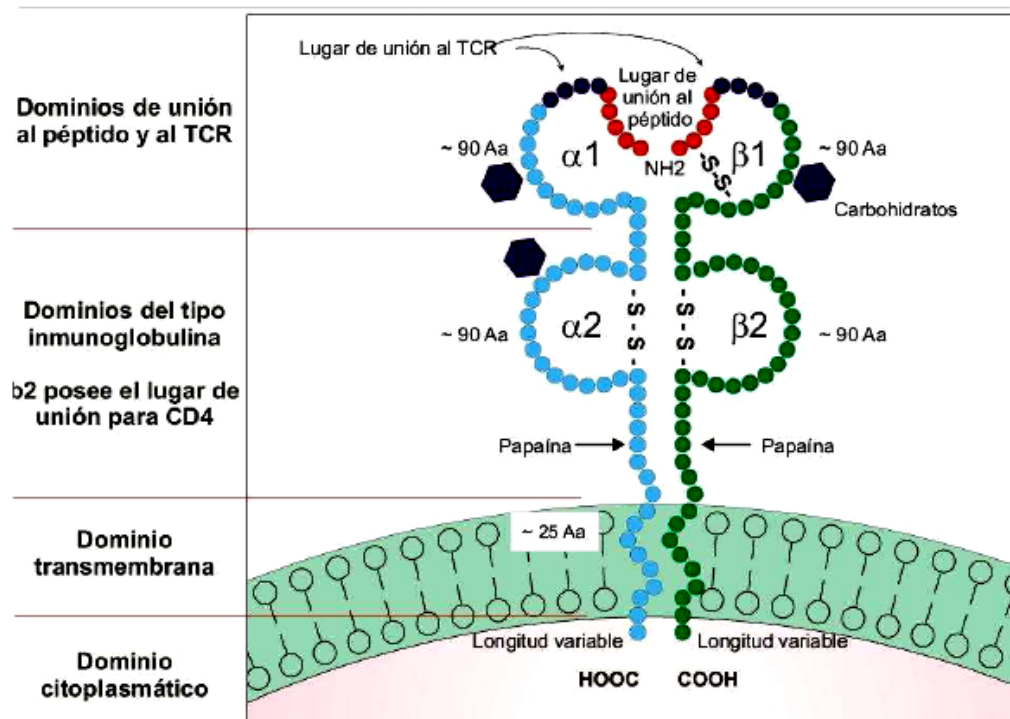
Estructura proteica y características de la molécula HLA de Clase II.



Fuente: J. Peña. Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Córdoba. 2007. p.90

FIGURA 9.

Estructura de los Antígenos de Histocompatibilidad clase II, consta de una cadena de mayor tamaño (cadena pesada), que por un extremo se introduce a la membrana celular y posee cuatro dominios extracitoplasmáticos ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\alpha 2$ y $\beta 2$).



Fuente: S. Soto de Ferrini. CMH.2009.p.5.

Los dominios distales de la proteína $\alpha 1/\beta 1$, forman la valva de unión del péptido que consiste en una lámina β , formada por ocho hebras antiparalelas y flanqueadas por dos regiones en hélice, la región helicoidal del dominio $\alpha 1$ presenta un extremo amino-terminal en cadena extendida y su extremo carboxiterminal, se pliega hacia la base de la valva. Esta peculiaridad hace que la zona de unión a péptido muestre los extremos abiertos, en esta valva abierta por los extremos se puede acomodar un péptido grande entre 12 y 24 aminoácidos. Este péptido, puede permanecer en la valva en conformación extendida, sus extremos amino y carboxi-terminales sobresalen fuera de la molécula. ⁽¹⁶⁾

(1) REGIÓN DE GENES HLA DE CLASE II.

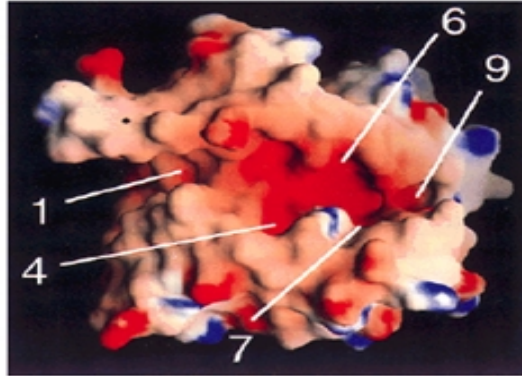
Los genes de clase II, se localizan en la región más centromérica del Sistema HLA denominada región D, como se a comentado, se divide a su vez en tres subregiones, de centrómero a telómero: -DP, -DQ y -DR. Los genes de clase II, se definen con la letra D, seguida de la inicial de la subregión (P, Q o R) y de la letra A para los genes que codifican cadenas α , o B para los genes que codifican cadenas β .

Las moléculas de clase II, están compuestas por dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente una cadena alfa (no polimórfica) y cadena beta (polimórfica). Los extremos α_1 y β_1 del extremo amino terminal de las moléculas de clase II interaccionan y forman la hendidura de unión al péptido, estructuralmente similar a la de clase I, en las moléculas de clase II, los extremos de la hendidura de unión al péptido están abiertos, de manera que pueden unirse péptidos de 10 a 20 residuos (10).

Los estudios cristalográficos de varias moléculas clase I y II, revelan que la asociación péptido-MHC se presenta por la interacción débil entre las cadenas laterales de los péptidos y una región de las moléculas formada por las cadenas alfa y beta del heterodímero la cual se denomina valva. Esa región es polimórfica y presenta unos sitios "bolsillos" en los cuales encajan perfectamente las cadenas laterales del péptido unido. Ese polimorfismo es el causante de que un mismo péptido se una con diferente afinidad a las diferentes clases de moléculas MHC. Los bolsillos se ubican en regiones bien definidas de la hendidura y se han identificado para las moléculas de clase II con números como P1, P4, P6 y P9, mientras que estos son denominados con letras para las moléculas de clase I. Así mismo, los residuos de anclaje (aminoácidos dentro del péptido que son esenciales para el acoplamiento del péptido a las moléculas de MHC) son variables para cada molécula; estos residuos de anclaje determinan si la unión a las moléculas del MHC es o no favorable para que el complejo antígeno - MHC sea reconocido por el sistema inmune y genere una respuesta inmune efectiva. (14)

Figura 10.

Sitios de unión de las moléculas clase II del MHC donde los aminoácidos con interacción no covalente están numerados.



Fuente: S. Estopiñán. CMH y desarrollo de vacunas. Colombia. 2007. p.70

4. POLIMORFISMO

Las moléculas clase I y clase II, presentan un alto polimorfismo con varios cientos de variantes alélicas de algunos de los genes en la población. El polimorfismo es encontrado predominantemente en los dominios 1, 2 y 3, de las moléculas de clase I y de clase II (Figura 11). Estos dominios proteicos forman el sitio de unión a péptido en cada caso, permitiendo a estas moléculas acoplar diversos péptidos.

Una de las características más sobresalientes de las moléculas de clase II, es su amplio polimorfismo; con relación al HLA-DRB, la gran variabilidad entre alelos y la mayor diversidad en los loci que codifican para las cadenas beta o pesadas en comparación a los que codifican las cadenas alfa o livianas. Dicho polimorfismo es inusual, ya que se ha mantenido por una selección balanceada y no por una selección neutra, la cual es mucho más común en otras familias multigénicas dentro de poblaciones naturales. Mediante esta selección balanceada se explica la frecuencia intermedia de una gran cantidad de alelos, favorecida entre otras razones, por una selección sobredominante, en la cual la tasa de sustituciones no sinónimas (con reemplazo de aminoácidos), sobrepasa la de sinónimas (sin reemplazo de

aminoácidos). Múltiples evidencias apoyan la hipótesis según la cual la principal fuerza seleccionante en el MHC y que permite su diversidad alélica, es la ventaja conferida a las moléculas del complejo para unir una gran variedad de péptidos, su presentación restringida y específica al sistema inmunológico, y la probable resistencia a múltiples patógenos. ⁽¹¹⁾

FIGURA 11.

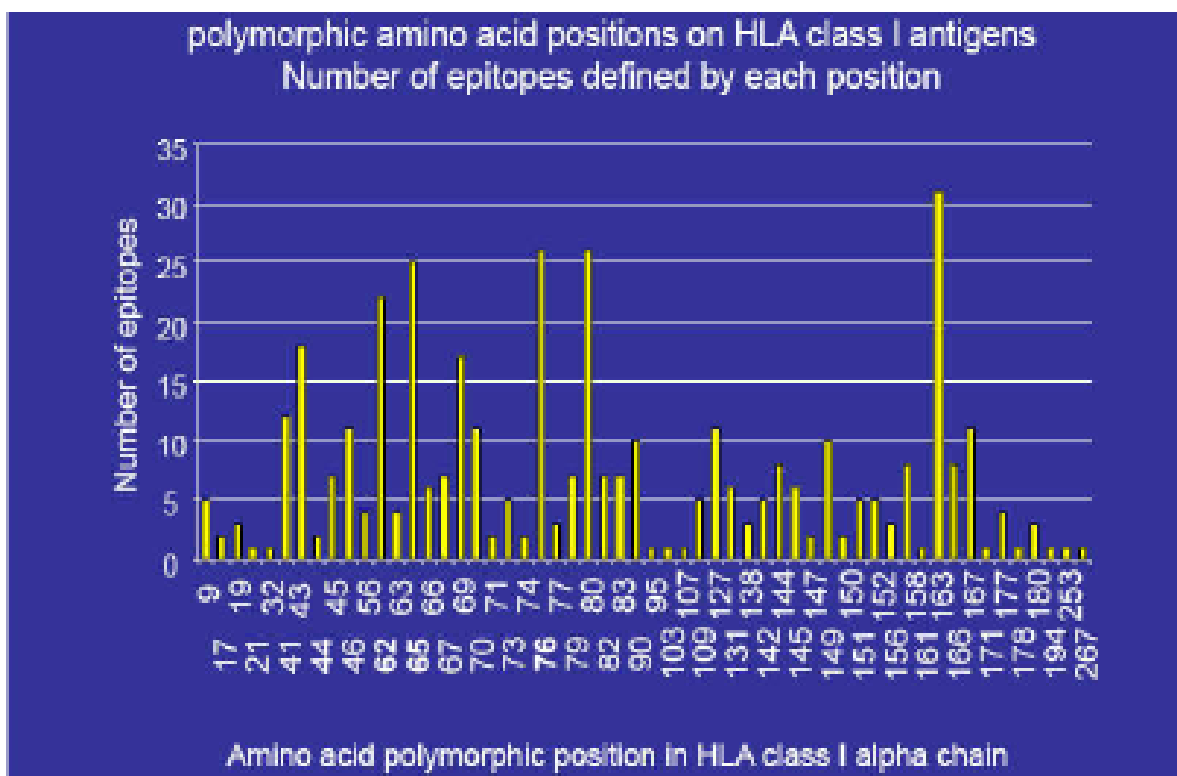
Polimorfismo de los genes HLA clase I y HLA clase II.

Polimorfismo HLA (Marzo 1998)	
HLA-A: 82	HLA – DRB1: 178
HLA-B: 197	HLA – DQB1: 30
HLA-C: 44	HLA – DPB1: 77
Polimorfismo HLA (Septiembre 1999)	
HLA-A: 144	HLA – DRB1: 204
HLA-B: 286	HLA – DQB1: 42
HLA-C: 80	HLA – DPB1: 86
Polimorfismo HLA (Marzo 2000)	
HLA-A: 170	HLA – DRB1: 235
HLA-B: 320	HLA – DQB1: 52
HLA-C: 97	HLA – DPB1: 102
Polimorfismo HLA (Octubre 2003)	
HLA-A: 291	HLA – DRB1: 356
HLA-B: 555	HLA – DQB1: 56
HLA-C: 140	HLA – DPB1: 106
Polimorfismo HLA (Enero 2009)	
HLA-A: 733	HLA – DRB1: 608
HLA-B: 1115	HLA – DQB1: 95
HLA-C: 392	HLA – DPB1: 132

Fuente: F. Sosa. SELADIS. 2009

FIGURA 12.

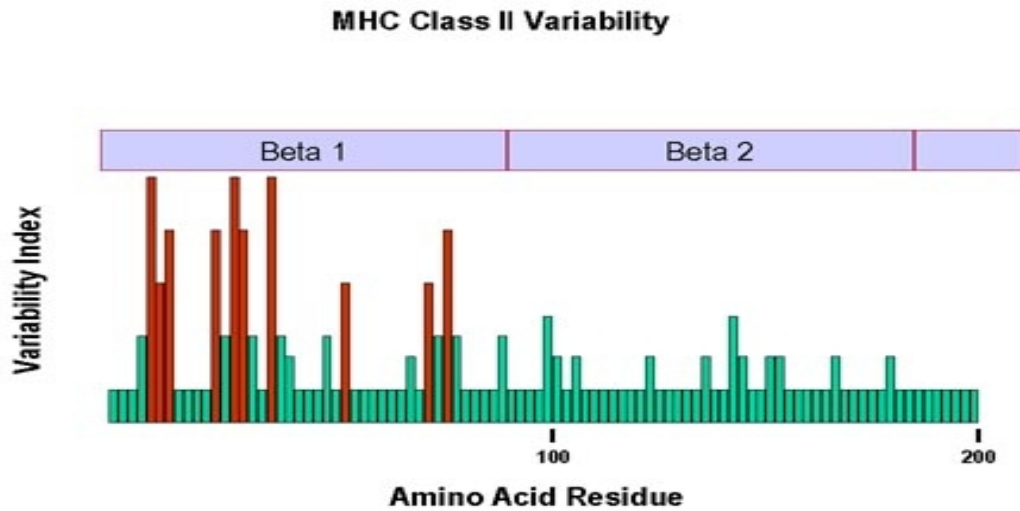
Polimorfismo del MHC: Polimorfismo MHC clase I. La mayor variabilidad en aminoácidos en las diferentes posiciones a lo largo de la cadena alfa de las moléculas del MHC clase I, ocurre en las regiones alfa 1 y alfa 2. El mayor polimorfismo se encuentra en los aminoácidos que forman la pared y el piso del sitio de unión a péptido.



Fuente: El Awar, Terasaki , et al. Clinical. Transplants. 2007, p.182.

FIGURA 13.

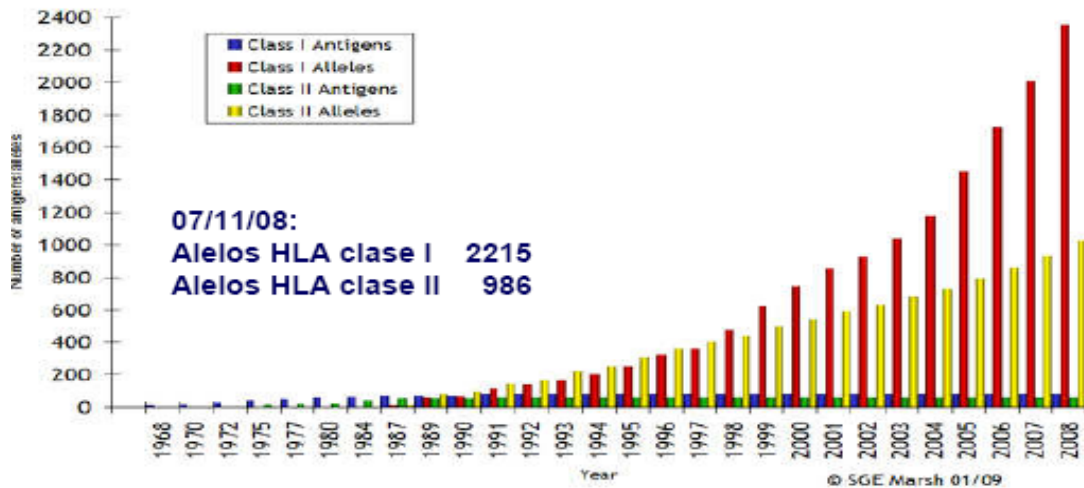
Polimorfismo MHC clase II. El mayor polimorfismo para la cadena beta de las moléculas clase II se encuentra en los aminoácidos de la región beta 1, que forma la pared y el piso del sitio de unión al antígeno.



Fuente: J. Peña. Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Córdoba. 2009. p.190

FIGURA 14.

La diversidad de las moléculas MHC que pueden ser definidas por anticuerpos (serología), es considerablemente menor que por secuenciación.



Fuente: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI). 2009

5. EL SISTEMA DEL ANTIGENO LEUCOCITARIO HUMANO (HLA)

Es un grupo de antígenos regidos por una región cromosómica que lleva varios loci genéticos, cada uno con múltiples alelos, que tienen relevancia en las reacciones de rechazo del trasplante y que marcan la prevalencia de varias enfermedades. Los antígenos leucocitarios humanos (HLA) se encuentran en diferentes concentraciones en casi todas las células nucleadas. La respuesta inmunitaria a estos antígenos es la principal causa de la mayor parte de los episodios de rechazo del injerto.

Tabla 2.

Localización del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en el organismo.

Tejido	HLA- Clase I	HLA-Clase II
Tejidos Linfoides		
Células T y NK	+++	+*
Células B	+++	++
Monocito-Macrófagos	+++	++
Células dendríticas	+++	+++
Células Epiteliales tímicas	+	++/+++
Otras Células nucleadas		
Neutrófilos	+++	-
Hepatocitos	+	-
Riñón	+	-
Cerebro	+/-	-**
Trofoblasto veloso	-	-
Células no nucleadas		
Glóbulos rojos	-	-

* Sólo las células T activadas

** Las células de la microglia son HLA clase II

Fuente: J. Peña. Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Córdoba. 2009. p.210.

Los antígenos HLA se dividen en dos clases de acuerdo a su estructura y función. La cadena pesada de los antígenos de la clase I la codifican los genes de los loci HLA-A, B o C. Las moléculas de la clase I son polipéptidos heterodiméricos que constan de la cadena pesada unida a una molécula de β_2 -microglobulina. Estos antígenos se encuentran en la mayoría de las células nucleadas del cuerpo, así como en las plaquetas, y son homólogas a los antígenos de trasplante serológicos detectados en otras especies.

TABLA 3.

Nomenclatura de los alelos del sistema Antígeno Leucocitario Humano (HLA)

Nomenclatura de alelos HLA	
Nomenclatura	Indica
HLA	Región
HLA-DRB1	Locus
HLA-DRB1*13	Alelos
HLA-DRB1*1301	Un alelo específico

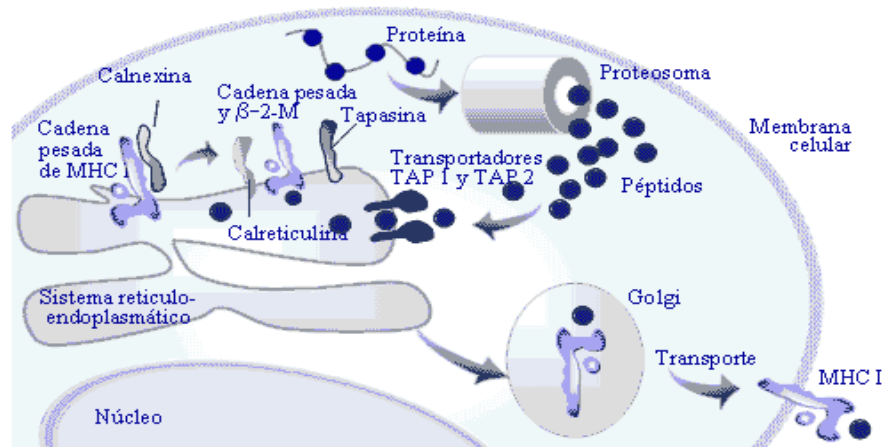
Fuente : C.F. Suarez et al. Tissue Antigens. 2003. p. 61

6. PRESENTACION Y PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS ASOCIADOS A LAS MOLECULAS MHC CLASE I Y CLASE II

Los linfocitos reactivos frente a la clase I expresan antígenos CD8 a menudo asociados con un efecto citotóxico y una función celular supresora. La función cooperadora celular suele venir dada por las células T que expresan el antígeno CD4 que caracteriza a los linfocitos reactivos frente a la clase II. De este modo, aunque la mayor parte de la destrucción inmunitaria de la reacción de rechazo puede estar

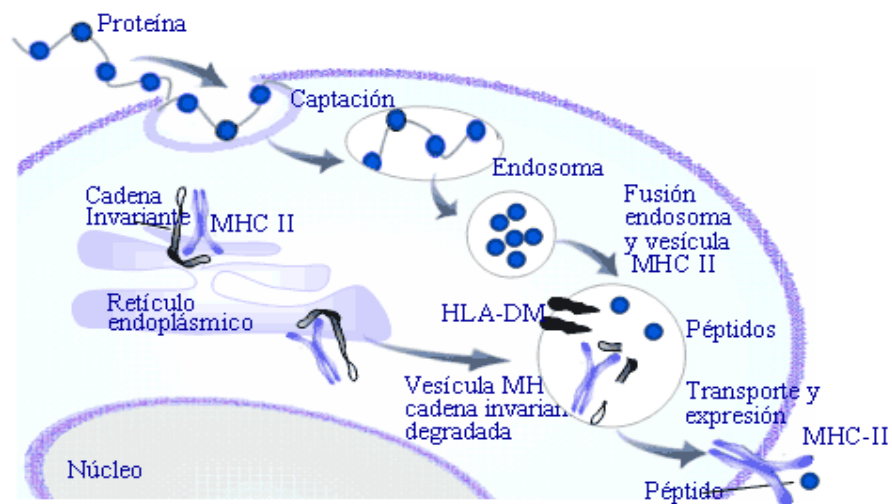
dirigida a los antígenos de la clase I a través de anticuerpos anti-HLA y linfocitos efectores citotóxicos, parece que son necesarios linfocitos que responden a los antígenos de clase II para facilitar una reacción de rechazo máxima.

FIGURA 15. Procesamiento de las proteínas para ser presentadas por las células presentadoras antígenos (APC), a través de la molécula HLA clase I.



Fuente: J. Peña y A. Cabello. CMH. Córdoba. 2007. p.157

FIGURA 16. Procesamiento y presentación de antígenos asociado a la molécula MHC Clase II



Fuente: J. Peña y A. Cabello. CMH. Córdoba. 2007. p.160

Dado que las moléculas del HLA son muy polimórficas, las moléculas de HLA alogénicas de las células de un órgano trasplantado son reconocidas por el receptor de las células T como un HLA extraño, pero de la misma forma que un HLA propio más un péptido extraño. La mera unión del receptor al HLA del injerto no inicia la respuesta frente al aloinjerto. ⁽¹²⁾

III. FACTORES PREDISPONENTES DE LA FORMACION DE ANTICUERPOS

A. INMUNIZACIÓN

Las vacunas son herramientas fundamentales para la preservación y erradicación de las enfermedades infecciosas. Los pacientes con enfermedades renales crónicas a menudo se encuentran inmunosuprimidos por su enfermedad de base o por los tratamientos inmunosupresores a los que son sometidos representados un grupo muy sensible a sufrir graves complicaciones infecciosas. Por tanto las inmunizaciones proporcionan un grado eficiente de resistencia activa y específica frente a algunas infecciones bacterianas o virales sin consecuencias adversas para el individuo. Los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC), pueden recibir todas las vacunas que requieran, a no ser que se encuentren bajo tratamientos inmunosupresores o corticoidales en dosis elevadas. Los pacientes con IRC tienen mayor riesgo de desarrollar infecciones por hepatitis B. ⁽¹³⁾

La vacuna para la varicela debe administrarse previo al trasplante renal en caso de no haber tenido la enfermedad natural, ya que puede presentar un cuadro grave en el paciente inmunosuprimido, y su vacunación postrasplante está contraindicada por tener microorganismos vivos. Al igual que BCG y de esta forma evitar la diseminación sistémica en el paciente inmunosuprimido. ⁽¹⁴⁾

1. PACIENTES EN DIALISIS

La capacidad de formación de anticuerpos en los pacientes en diálisis presenta una respuesta inmunogénica menor, debido a una seroconversión disminuida. La

vacunación antihepatitis B en los pacientes en diálisis presenta una formación insuficiente de anticuerpos, los que disminuyen rápidamente. La respuesta obtenida es mejor cuando se vacuna con el doble de la dosis recomendada, o cuando se realiza una revacunación. Se recomienda la medición de los niveles de anticuerpos anualmente, y si esta bajo 10Mmi/ml se debe colocar una dosis de esfuerzo. ⁽¹⁵⁾

2. PACIENTES CON TRASPLANTE RENAL:

Debido al uso de drogas inmunosupresoras para evitar el rechazo al trasplante , estos presentan una pobre inmunogenicidad y un riesgo mayor de presentar infecciones graves especialmente por virus varicela y polio , además de posible diseminación sistémica con el uso de vacunas preparadas con microorganismos vivos lo que contraindica su uso. ⁽¹⁶⁾

Es por estos motivos que se debe procurar la administración completa del calendario de vacunaciones antes de realizar el trasplante renal y para verificar la respuesta se debe medir el isotipo IgG para sarampión, ubéola, parotiditis y varicela. Las vacunas con microorganismos muertos o inactivados no representan riesgo al ser usadas en el paciente trasplantado. ⁽¹⁷⁾

TABLA 4

Inmunizaciones recomendadas para pacientes con patología renal crónica

Inmunizaciones	Insuficiencia renal crónica Tratamiento			Síndrome nefrotico	Comentarios
	Médico	Diálisis	Trasplante		
Esquema básico	X	X	X ^{a,b}	X ^c	
Varicela	X	X	X ^b	X	En > 1 año que no hayan hecho la enfermedad
Herpes simple	X	X	X		Afección por lesiones en superficies mucosas y/o vísceras.
Citomegalovirus (CMV)	X	X	X	X	Se encuentra orina, secreciones nasales, encías, expectoración, etc.

Epstein -Barr (EBV)	X	X	X		Se presenta en paciente inmunosuprimidos y es transmitido por vía orofaríngea hasta enfermedad linfoproliferativa.
<i>S. pneumoniae</i>	X	X	X	X	Repetir c/3-5 años en <10 años y c/6 años en >10 años
Influenza	X	X	X	X	Repetir anualmente
Hepatitis B	X	X ^d	X ^d		

^a Contraindicadas vacunas con microorganismos vivos .

^b Considerar revacunación previo estudio de respuesta inmune.

^c Contraindicadas por ser vacunas con microorganismos vivos durante recaídas o tratamiento inmunosupresor.

^d Doble dosis

Fuente. Diaz P, Lagomarsino F., 2008: 6

Se recomienda el uso de la vacuna antihepatitis A en el paciente trasplantado con una revacunación intensiva de 2 dosis previo a un contacto inminente. ⁽¹⁸⁾

3. PACIENTES CON SÍNDROME NEFRÓTICO: (SN)

Los pacientes con síndrome nefrótico (SN) en recaída están en riesgo de presentar infecciones bacterianas severas debido a una disminución de la inmunidad humoral por pérdida urinarias de inmunoglobulinas y de elementos de la vía alternativa del complemento. Existen también alteraciones de la función leucocitaria. La inmunosupresión puede estar condicionada también por los tratamientos esteroidales e inmunosupresores. El riesgo de infecciones virales (especialmente por varicela) no está aumentado por el SN, en sí, sino por los tratamientos corticoidales o inmunosupresores. ⁽¹⁹⁾

B. INMUNOLÓGIA DE LA REPRODUCCIÓN:

El feto es analogado como un trasplante semi-alógeno, al poseer tanto antígenos paternos como maternos, cumpliendo con las reglas de aceptación o rechazo del mismo. ⁽¹⁹⁾

El 85% de todos los embarazos llegan a término y muchas parejas experimentan una o dos pérdidas y otras que no alcanzan a concebir por diferentes razones: infecciones, anatomía fetal anormal, anatomía uterina anormal, niveles bajos de progesterona, aberraciones cromosómicas y mecanismos inmunológicos.

De hecho existen mecanismos protectores que evitan que se produzca daño y que permiten la sobrevivencia y esto está localizado en un sitio “privilegiado” que evita que el feto sea rechazado. ⁽²⁰⁾

Los anticuerpos antifosfolípidos y los anticuerpos antinucleares son un grupo heterogéneo de anticuerpos que están asociados con mecanismos fisiológicos de la placenta y la patología asociada a los diferentes anticuerpos ocasiona patología a nivel de la placenta y con una nueva concepción durante la evolución del embarazo y el posparto inmediato.

1. PLACENTA:

La placenta provee un microambiente inmunológico único, donde existe un estado de tolerancia mutua entre dos tejidos antigénicamente diferentes. ⁽²¹⁻²²⁾

Existen varios tipos de células trofoblásticas en la placenta que inician la patología con la madre, el sincitio trofoblasto es una membrana expuesta directamente a la sangre materna, envolviendo al feto y a todas las células efectoras inmunes, funciona como diálisis biológica, donde se realiza el intercambio de moléculas que entran o salen de la circulación fetal y posee un estado de privilegio inmunológico para “camuflar” y cubrir al feto de los mecanismos inmunes citotóxicos maternos. ⁽²³⁻²⁴⁾

Para mantener la tolerancia al feto, el trofoblasto expresa HLA-I no clásicas que le permite a la placenta ser un órgano inmunoprivilegiado ya que la hace resistente a la lisis de los linfocitos citotóxicos ⁽²⁵⁾

El trofoblasto modula la función inmune materna a través de la secreción de “factores inmunomoduladores”, estos factores aumentan la proporción de anticuerpos asimétricos (glicosilados en solo una de las regiones Fab actuando como anticuerpos bloqueadores). ⁽²⁰⁾

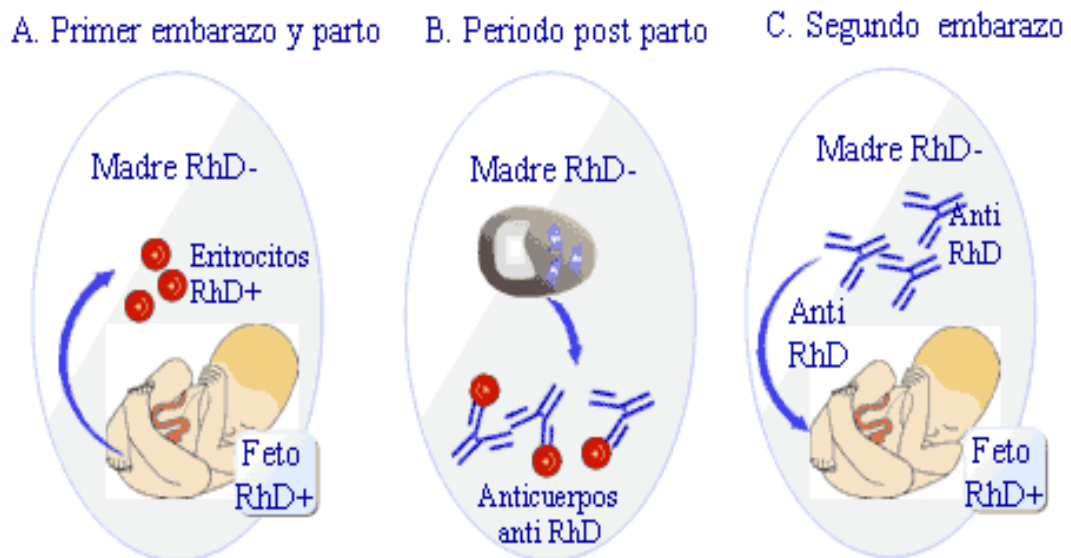
La principal población de linfocitos encontrados en la decidua humana en el embarazo temprano son las células NK y alcanzan hasta un 70% de los linfocitos deciduales. Pero estas desaparecen a las 20 semanas de gestación y están ausentes en el embarazo a término. Este proceso puede dar una explicación a los abortos recurrentes. ⁽²⁶⁾

2. TOLERANCIA MATERNOFETAL

Una de las características del Sistema Inmunitario (SI) es el reconocimiento de lo propio y de lo no propio. La tolerancia inmunológica es la no respuesta inmunológica frente a los antígenos propios y la autotolerancia es la eliminación de linfocitos que expresan receptores específicos para autoantígenos. ⁽²⁷⁾

FIGURA 17.

Reacción materno fetal en relación al grupo sanguíneo



Fuente: J. Peña y A. Cabello. Fertilidad. Córdoba. 2007. p.207

3. EXPRESION DE MOLECULAS HLA NO CLASICAS

HLA-G, HLA-C y HLA-E son expresadas por citotrofobasto, como un sistema de tolerancia materno fetal. ⁽²⁵⁾

a) HLA-G

El HLA-G tiene un polimorfismo limitado a diferencia de las moléculas HLA Clase I clásicas y esto es lo que permite la tolerancia del aloinjerto fetal. Estas moléculas también se expresan en menor cantidad en células monocitos de sangre periférica

El HLA-G se coexpresa con el HLA-C y el HLA-E ya que estos se unen con los receptores de los NK. La baja expresión de HLA-G en las células trofoblasticas se ha asociado con los abortos recurrentes. ⁽²⁹⁻³⁰⁾

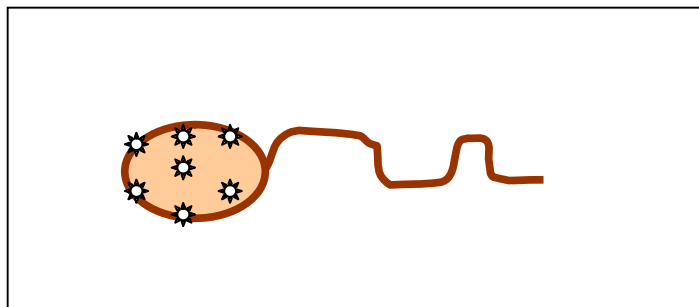
4. EXPRESION DE ANTIGENOS PATERNOS Y PRODUCCION DE ALOANTICUERPOS

Los anticuerpos maternos antiantigenos HLA paternos se encuentran en un 20% en circulación en mujeres primigravidas y en un 40% en multigravidas. Presumiblemente la sensibilización es llevada a cabo por células nucleadas fetales que entran a la circulación materna durante el embarazo en el momento del parto.

Se debe tomar en cuenta que en el proceso de fecundación los espermatozoides expresan HLA Clase I que también se debe considerar como uno de los procesos de sensibilización. ⁽³⁰⁾

FIGURA 15

Expresión de moléculas HLA Clase I a nivel de los espermatozoides.



Fuente: O. Thellin, B. Coumans, W. Zorzi, et al. Tolerance to the Foeto-Placental "Graft":2006. p.351

a) RESPUESTA ALOINMUNE

Detección de anticuerpos:

- Cuantificación IgG anti linfocitos paternos
- 20% Anticuerpos antifosfolipidos
- Anticuerpos anti DNA y antihistonas
- Anticuerpos Antinucleares (moteado en bajos títulos)
- Antígenos Nucleares Extraíbles (medir cada 2 semanas en el primer trimestre)
- Anticuerpos anti antígenos endometriales (causa endometriosis).

5. MECANISMO DE TOLERANCIA MATERNO FETAL.

Como es conocido la mitad del genoma fetal es de la madre y la otra mitad del padre, por este motivo el feto sintetiza antígenos considerados extraños para la madre. Además, las células fetales y las moléculas fetales potencialmente antigénicas son liberadas a la circulación materna durante la fase proliferativa del trofoblasto como resultado de la ruptura de tejidos, en este momento se pone en contacto el sistema inmune materno con antígenos fetales, y a pesar de estos mecanismos, el feto es tolerado y el embarazo llega a término sin problemas inmunológicos ni para la madre ni para el feto. ⁽³¹⁾

C. TRANSFUSIONES SANGUINEAS

1. ANTÍGENOS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS:

Los antígenos de los grupos eritrocitarios ABO son también unos potentes antígenos de trasplante. Su importancia estriba en su ubicación en los endotelios vasculares y los diversos órganos. Si se trasplanta un órgano a un individuo ABO incompatible, los anticuerpos naturales (Isoaglutininas anti A y/o anti B) del receptor producen una lesión en el endotelio del órgano trasplantado, que conduce al rechazo. ⁽³²⁾

Las incompatibilidades sanguíneas se producen debido a que los glóbulos rojos llevan en su superficie determinados antígenos, particulares de cada grupo sanguíneo. Los mas conocidos son los grupos A, B, AB, y O. Además, de los grupos de antígenos mayores existen, en forma independiente, el sistema Rh o D. Se dice

convencionalmente que una sangre es Rh negativa cuando esta presente el antígeno D y negativa cuando no lo está.

IV. FORMACION DE ANTICUERPOS

A. ANTICUERPOS ANTI-HLA DONANTE ESPECÍFICO

Hoy en día múltiples técnicas estudian la presencia de anticuerpos en el receptor frente a los antígenos HLA del donante. Se distinguen técnicas directas e indirectas

1. TÉCNICAS DIRECTAS.

Detectan anticuerpos capaces de fijar complemento y son variaciones de la técnica básica de Linfocitotoxicidad (CDC o citotoxicidad dependiente de complemento. Se basa en la capacidad del suero del receptor de lisar las células T y/o B del donante con ayuda del complemento exógeno (de conejo), el uso de ditiotreitól distingue si la lisis se debe a anticuerpos de tipo IgG o IgM.

2. TÉCNICAS INDIRECTAS.

Como la linfocitotoxicidad aumentada con antiglobulina aumentada (CDC-AHG), y la citometria de flujo permiten detectar anticuerpos no fijadores de complemento, niveles bajos de anticuerpos anti-HLA, o anticuerpos CDC negativos-absorción positivos (Fenómeno CYNAP). La técnica clásica de CDC se desencadena por la activación del C1q, paso inicial de la vía clásica del complemento, que necesita la unión de una IgM o dos IgG. La técnica AHG utiliza la adición al suero humano de un anticuerpo anti-cadena ligera humana *k*, para amplificar la reacción de citotoxicidad.

(33)

3. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DONANTE ESPECÍFICO PRE-TRASPLANTE:

La presencia de anticuerpos frente a los antígenos HLA de clase I del donante en el suero del receptor, contraindica la realización del trasplante renal. Los anticuerpos

de baja afinidad solo con células B, son autoanticuerpos y no suponen un obstáculo para el alotrasplante.

4. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DONANTE ESPECÍFICO POST-TRASPLANTE:

La determinación del PRA, por Citotoxicidad, citometria de flujo, ELISA, y LUMINEX es útil para identificar pacientes con riesgo de presentar rechazo mediado por anticuerpos debido a la inmunoreactividad frente al injerto.

La respuesta humoral ocurre en pacientes hipersensibilizados (PRA>50-75%)

- a) Falsos Positivos: por administración de de terapia antilinfocitaria.
- b) Falsos Negativos: por administración de esquemas inmunosupresión inmunitaria. ⁽³⁴⁾

V. TECNICAS

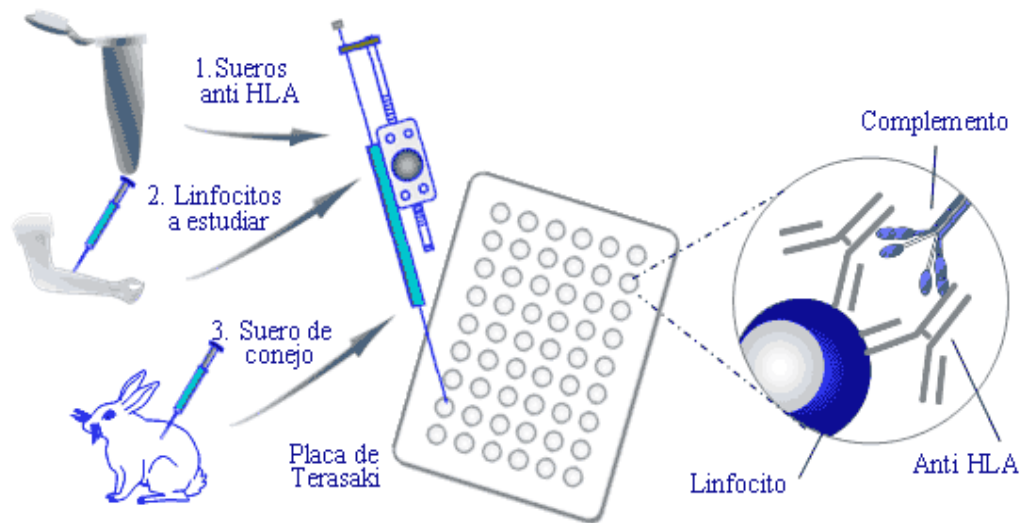
A. ANTICUERPOS REACTIVOS A PANEL (PRA%) POR ENSAYO DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DE COMPLEMENTO (CDC)

El CDC, emplea un panel de linfocitos viables (alrededor de 60) con fenotipo HLA conocido representativo de la población general, que se añaden en cada uno de los pocillos de una placa de Terasaki. ⁽³⁵⁾

Esta prueba no solo determina la especificidad de los anticuerpos sino el frado de reacción lo que se conoce como %PRA (Porcentaje de anticuerpos reactivos contra el panel). ⁽³⁶⁾

FIGURA 19.

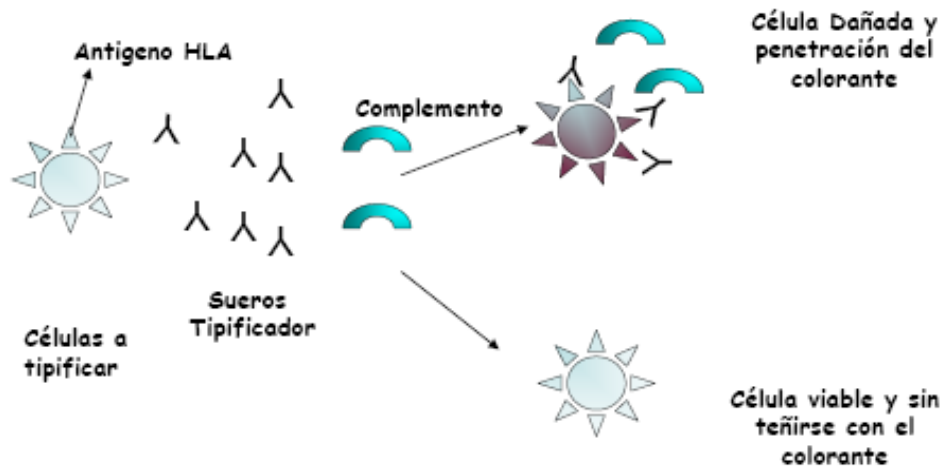
Pasos del Test de microlinfocitotoxicidad utilizado para el tipaje de moléculas HLA.



Fuente: J. Peña y A. Cabello. Técnicas Serológicas y Moleculares. Córdoba. 2007. p.320

FIGURA 20.

Fundamento de la técnica de Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC)



Fuente: S. Soto de Ferrini. CMH.2009.p. 39

B. ANALISIS DE ANTICUERPOS HLA EN PACIENTES

El análisis de los anticuerpos de los sueros de los pacientes, demanda una absoluta determinación específica. Porque la búsqueda podría reflejar resultados no específicos obtenidos por la prueba cruzada (Cross-Match), la prueba que sirve para identificar todos los posibles donantes específicos que podrían ser perjudiciales para la sobrevivencia del aloinjerto. En la detección de los anticuerpos antiHLA, las mejores técnicas son las que tiene 100% Sensibilidad así como 100% de especificidad, pero esto es difícil de realizar en la práctica diaria. Ya que esto es dependiente de la técnica usada y de la manera como se realizó la estandarización por cada laboratorio, en cuanto a los test usados se clasifica la sensibilidad y especificidad como sigue: ⁽⁵⁵⁾

Sensibilidad:

CDC < ELISA ó = < AHG-CDC < Citometria de flujo < LUMINEX

Especificidad:

ELISA < Citometria de flujo < LUMINEX < CDC = AHG-CDC

C. LA DINAMICA DE LA PRODUCCION DE ALOANTICUERPOS HLA

La aloinmunización humoral, también ocurre por la introducción de algún tejido alogénico en el receptor, semejante a lo que ocurre en el embarazo, en el trasplante de órganos o tejidos, y en productos de transfusiones sanguíneas. De vez en cuando la producción de anticuerpos HLA es transitoria, es decir la IgM, desapareciendo después de 1 a 4 meses. Esto comúnmente ocurre después de transfusiones sanguíneas limitadas previamente en un individuo no inmunizado. En otras circunstancias, especialmente después del embarazo o previos trasplantes, los anticuerpos del isotipo IgG HLA pueden persistir por años en el aparentemente en ausencia de nuevos eventos inmunizantes, incluso hasta más de 10 años.

El desarrollo de los aloanticuerpos HLA tiene una impredecible persistencia con respecto a la aloinmunización. La duración de los anticuerpos HLA en algunos

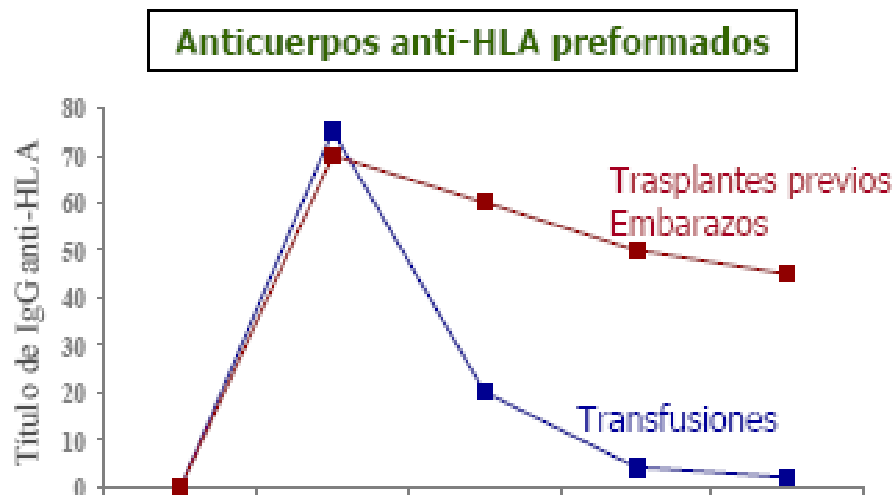
pacientes podría ser muy larga. Lo que impediría que el paciente se pueda trasplantar.

D. POSIBLES CAUSAS DE LA PERSISTENCIA DE ANTICUERPOS HLA

Existe una persistencia a largo plazo (años) de anticuerpos contra antígenos solubles, semejante a la toxina de tétanos, aunque esto requiere intermitentes re-exposiciones al antígeno del tétanos u otros signos. Sin embargo, las posibles causas o persistencia de anticuerpos HLA podría deberse a algunos mecanismos que podrían ser considerados: Transfusiones, embarazos, abortos, vacunas y previos trasplantes.

FIGURA 25.

Cinética de producción de anticuerpos anti-HLA según la fuente de sensibilización producida.



Fuente: M. Muro et. al. Histocompatibilidad en trasplante. Granada.2009.p.77

1. OTRAS FUENTES POTENCIALES DE ANTÍGENOS

Otras dos fuentes potenciales de antígenos encubiertos podrían ser mencionados. La inducción de anticuerpos linfocitotoxicos asociadas con infecciones recurrentes y con enfermedades autoinmunitarias que han sido

reportadas, pero estos factores nunca han sido demostradas. Posiblemente ocurra una reacción cruzada hipótesis que no debe ser excluida. La existencia de un idiotipo retransmiso de células T y B, primera propuesta de Niels Jerne postula que todos los receptores de las células T y B y el sistema inmune contiene información de imágenes externas de todos los antígenos exógenos que podrían encontrarse con el sistema inmune, puede desencadenar un desequilibrio e inducir la producción de un efecto inmune, producto semejante a un anticuerpo.

La población de anticuerpos que es producida en respuesta a los antígenos exógenos lleva un único epitope, que son formados por el resultado de la conformación de un aminoácido en los sitios de combinación de los anticuerpos. Los idiotopos, en las vueltas induce a un segundo anticuerpo, este proceso podría continuar por varios ciclos hasta encontrar un nuevo equilibrio.

E. CONCEPTOS GENERALES

Individuos inmunizados potencialmente pueden hacer un anticuerpo hacia algunos epitopes HLA que no están presente en su propio fenotipo. Por tanto, es importante entender la distribución de epitopes HLA públicos contra los productos génicos HLA. Sin embargo algunos epitopes públicos son ajenos a la mayoría de las moléculas HLA. El hecho de estar presente estos epitopes en los pacientes propio de las moléculas HLA, el número total de anticuerpos producido por la aloinmunización es restrictivo.

La presencia de varios epitopes públicos en un grupo de reacción cruzada de las moléculas de HLA y el efecto de filtrado de los pacientes propio fenotipificación de carácter público, explicando que ha sido llamado "eventos inmunizantes intra-GREC". Esto ocurre cuando 2 individuos poseen comúnmente algún fenotipo GREC, pero no algunos perfiles de epitopes públicos dentro de los GREC. Por este hecho la comparación de los grupos GREC entre 2 individuos es de gran importancia para la sobrevivencia del aloinjerto y de esta forma impedir que el receptor produzca anticuerpos anti epitopes públicos.

El 90% de pacientes aloinmunizados producen anticuerpos anti HLA contra epítopes públicos de las moléculas HLA clase I. Sólo existe un 10% de anticuerpos contra especificidades privadas, donde el 90% fueron directamente contra especificidades publicas.

En el 1 GREC, existen una relación recíproca entre A1, 3, 9, 30,31 y el grupo de alelos A10, 28, 32 y 33, una mala relación entre estos dos GREC puede resultar en la producción de anticuerpos. Cuando los pacientes desarrollan anticuerpos contra una molécula HLA, ellos generalmente producen anticuerpos contra todos epítopes de compatibilización que esta contenida sobre cada molécula. Los pacientes inmunizados por una sola molécula HLA usualmente desarrollaran anticuerpos contra todos los epítopes mal entrecruzados este evento es una explicación para ver el incremento en el porcentaje de PRA y la aparente fuerza e reactividad de los anticuerpos. Un individuo inmunizado por células que expresa HLA-A2 primeramente desarrollan un poco de reactividad anti A2, contra el epítope A2. Un segundo evento inmunizante con células A2 desarrolla anticuerpos anti-9p y posiblemente anti 17p. El % de par se incrementara tal vez un 28% mas que 65, por que los genes HLA producidos son ahora detectados como (A2, 23, 24, 68, 69, B57, 58). Sin embargo algunos inmunógenos son responsables de ciertos cambios, el número detectado de productos génicos a incrementado en número de 1 a 7, y el número de cuerpo producidos solo sea incrementado de 1 a 4 (anti A2 -> anti A2, 9p, 17p), también los anticuerpos reactivos son fuertes porque ahora hay dos o tres anticuerpos reactivos contra epítopes fuertes contra la molécula HLA-A2, incrementado la eficiencia de de la activación del complemento.

La conversión de los grupos privados dentro de otros GREC o fenotipos HLA públicos ayudaran a predecir el grupo potencial GREC o anticuerpos públicos que desarrollan la mayoría de los pacientes, virtualmente todos los locus HLA-A y B podrían ser asignados por 1 ó 9 grupos GREC, por consiguiente. El nivel HLA podría ser transformado dentro de otros GREC o fenotipos públicos.

Generalmente los genotipos GREC tendrán un mínimo de 3 y un máximo de 6 de los 9 GREC.

Una elevada sensibilización cuyo PRA mayor 80 ó 90% podría deberse a GREC (epítopes públicos), que proporcionan una importante adición de anticuerpos específicos. Cuando los PRA de los pacientes se incrementan excesivamente en poco tiempo el cambio es debido al fuerte incremento de numerosa reactividad contra algunos grupos GREC, las fluctuaciones de los valores de PRA están entre un 5 a 10% y no es usual en los sueros de los pacientes, estas fluctuaciones podría deberse a transfusiones sanguíneas.

Otros factores que influyen en los valores del % PRA, son usualmente debido a los cambios de algunos grupos GREC en ausencia de nuevos eventos inmunizantes, el valor del PRA también puede verse afectada por la adición de factores. Estos factores incluyen cambios en la composición antigénica HLA, de acuerdo al uso de un panel, los cambios debido a los nuevos lotes de reactivos, variación de la técnica, particularmente entre individuos diferentes y el grado inmunológico del paciente. La inflamación aguda es una respuesta causada por agentes infecciosos, por ejemplo la mayor producción de anticuerpos son mono específicos.

1. PATRÓN GENERAL DE LA TÉCNICA

a) SELECCIÓN DE LA TECNICA:

El análisis de antisueros altamente reactivos podría ser analizado por técnicas que son sensibles y que tienen poca influencia del fenómeno CYNAP.

El uso de paneles de células limitados para GREC, podría deberse porque contienen un solo grupo GREC.

b) REACCIONES NEGATIVAS

Cuando el %PRA esta en el rango de 80 a 90% esto es usualmente la primera búsqueda de reacciones negativas. Cuando el %PRA alcanza niveles de 85-95%.las células negativas se identificaran a los fenotipos GREC en el donante. Cuando el panel presenta % PRA del 100 se observa un panel de células muertas.

c) TITULACION DEL SUERO:

Un suero puede contener múltiples anticuerpos contra 2 ó más GREC, ya que el anticuerpo individual tiene a menudo diferentes títulos podría ocasionar pocos anticuerpos contra un determinado GREC y no se podría determinar las otras especificidades.

d) COMPARACION DE LA REACTIVIDAD DEL CDC Y AHG-CDC

Se ha aplicado simultáneamente ambas pruebas pero en ambas se debe tomar en cuenta el fenómeno de CYNAP.

e) ESTABILIDAD DEL PRA:

En ausencia de eventos aloimmunizantes adicionales, la reactividad y especificidad de los anticuerpos es equitativamente estable y no cambia en semanas, y usualmente, meses. Cuando se realiza búsquedas mensuales, para la búsqueda dinámica de anticuerpos específicos. En pacientes quienes han desarrollado nuevos anticuerpos la búsqueda podría ser primeramente, incompleto por las especificidades publicas (CYNAP) esta podría ser por las diferentes técnicas.

f) NORMAS DE LAS TECNICAS ESPECÍFICAS:

Cuando la posible secuencia de aminoácidos sugiere el sitio físico de los epitopes de las moléculas HLA.

g) INTERPRETACION:

El modelo de reacción de los GREC podrían ser complejos donde se destacará el 1 GREC. Sin olvidar que se puede encontrar en mas de un grupo GREC.

Las líneas horizontales representan productos específicos del gen HLA. La primera columna rectangular (izquierda) se observa grupos específicos o epitopes privados presumiblemente se encuentra sobre cada producto génico. Los rectángulos subsecuentes muestran la distribución específica acerca de los epitopes públicos.

Para descripción, la asignación I esta dada por un número y una letra para la especificidad de los epitopes públicos. Cada epitope ha sido designado con un número que refleja una dominación no superpuesta, seguido por una pequeña p (publico).

Finalmente el mapa de epitopes es subjetivo a cambios. El 2C, 7C, 12C, 4C, y 6C son más fáciles por sus previos estudios al respecto de sus epitopes públicos. En cambio, los epitopes públicos del 1C, 5C y 8C son más dificultosos de describir, pero aun se sigue realizando estudios de evaluación de la relación de anticuerpos con los GREC.

VI. CARACTERISTICAS DE LOS GRUPOS DE REACCION CRUZADA (GREC´s):

A. GREC´S DE LAS MOLÉCULAS HLA CLASE I

1. INMUNOSEROLOGIA

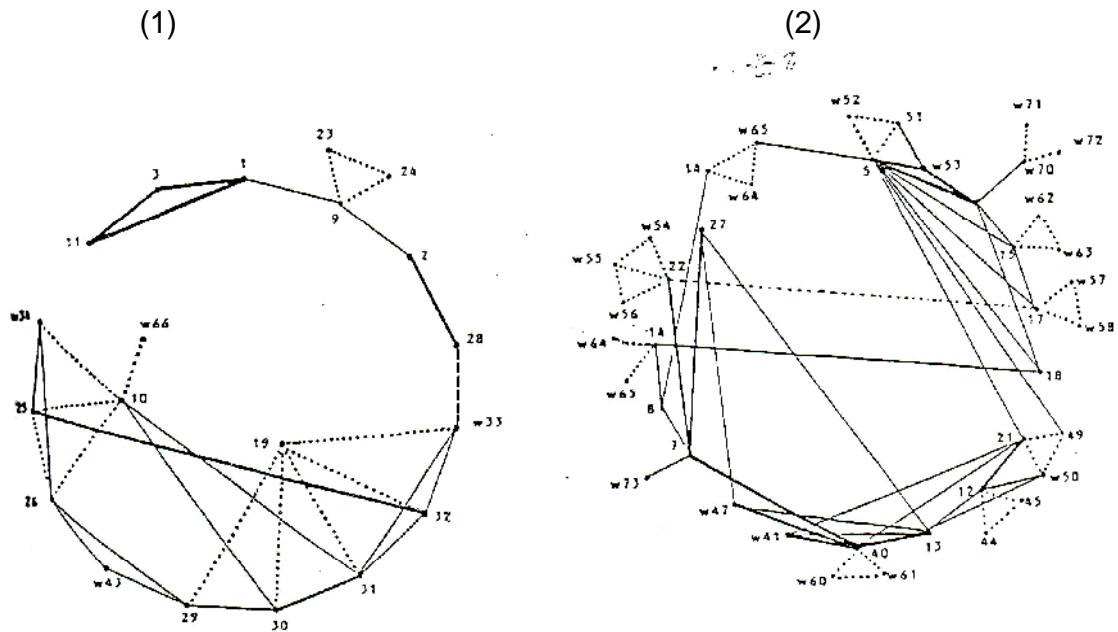
Según estudios serológicos acerca de las reacciones cruzadas se ha identificado estructuras o analogías de estructuras de determinantes de las permanentes reacciones:

- Grupos de especificidades de « familias »
-

- Subdivisiones o "Splits" de otras especificidades que incluyen todas las especificidades largo o extenso explicación para la posible existencia de un determinante común responsables de las reacciones cruzadas.
- La determinación de "supertipicos" responsables de las inclusiones por ejemplo Bw4 y Bw6.

FIGURA 26.

Reacciones Cruzadas de HLA-A (1) y HLA-B (2)



(1): Grupos de Reacciones Cruzadas: HLA-A

(2): Grupos de Reacciones Cruzadas: HLA-B

La intensidad de la fuerza de reacción:

[**—**]: Reacción cruzada fuerte

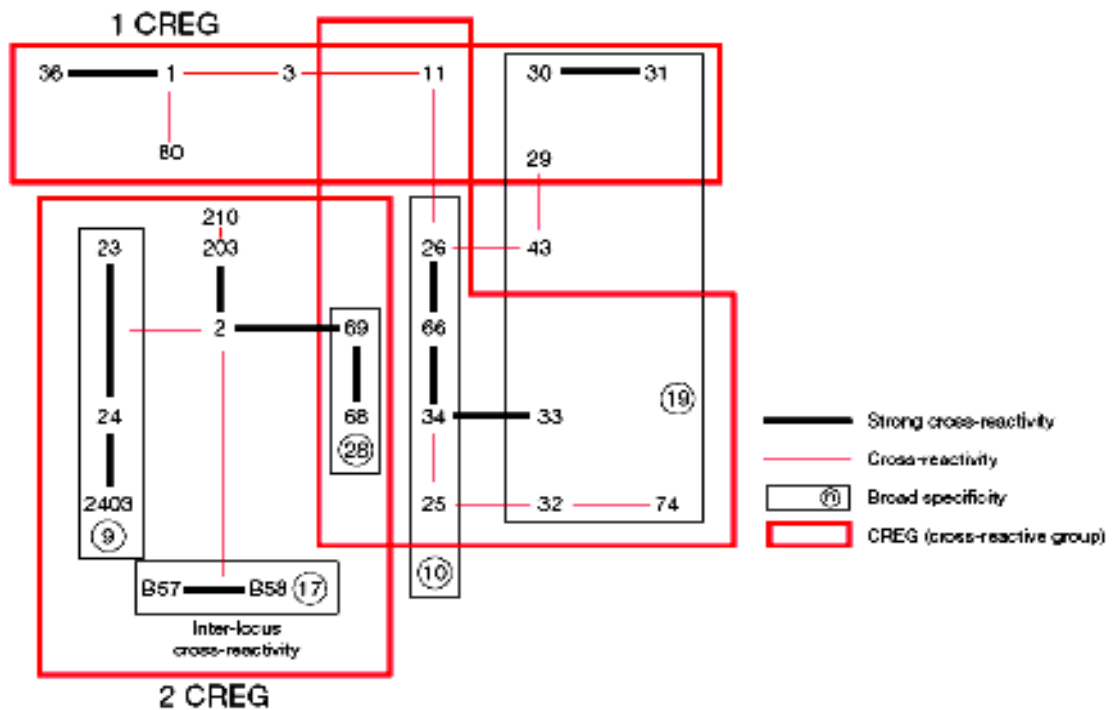
[**- - -**]: Reacción cruzada intermedia

[**· · · · ·**]: Reacción cruzada leve

Fuente: S. Dahan. Marqueurs du complexe Majeur D'Histocompatibilite: Systeme HLA A propos d'une étude sur un échantillon de population bolivienne. 1987. p. 32

FIGURA 27.

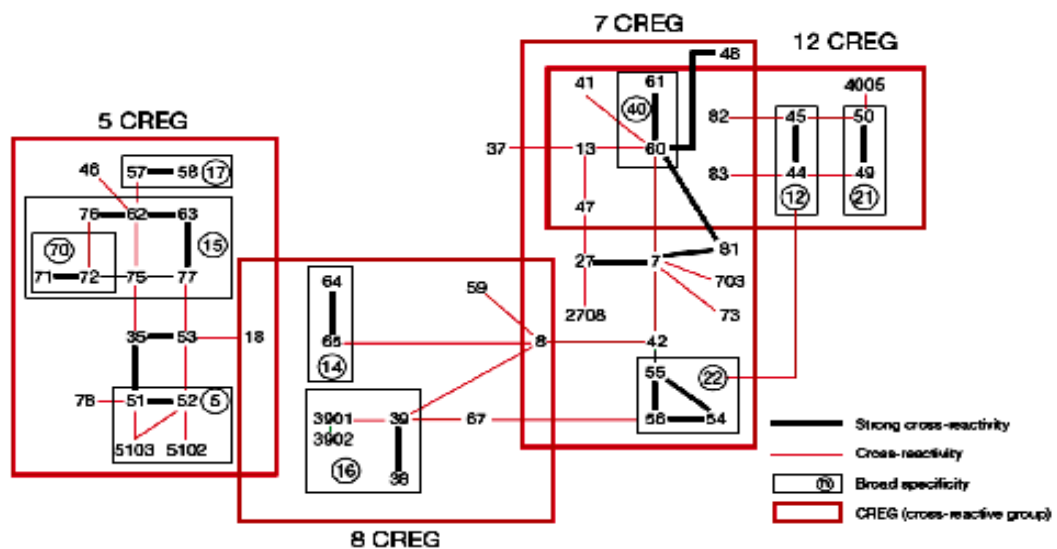
Reacción cruzada determinada por serología para el Locus HLA-A



Fuente: Invitrogen. Cross Reactive Group. 2009.

FIGURA 28.

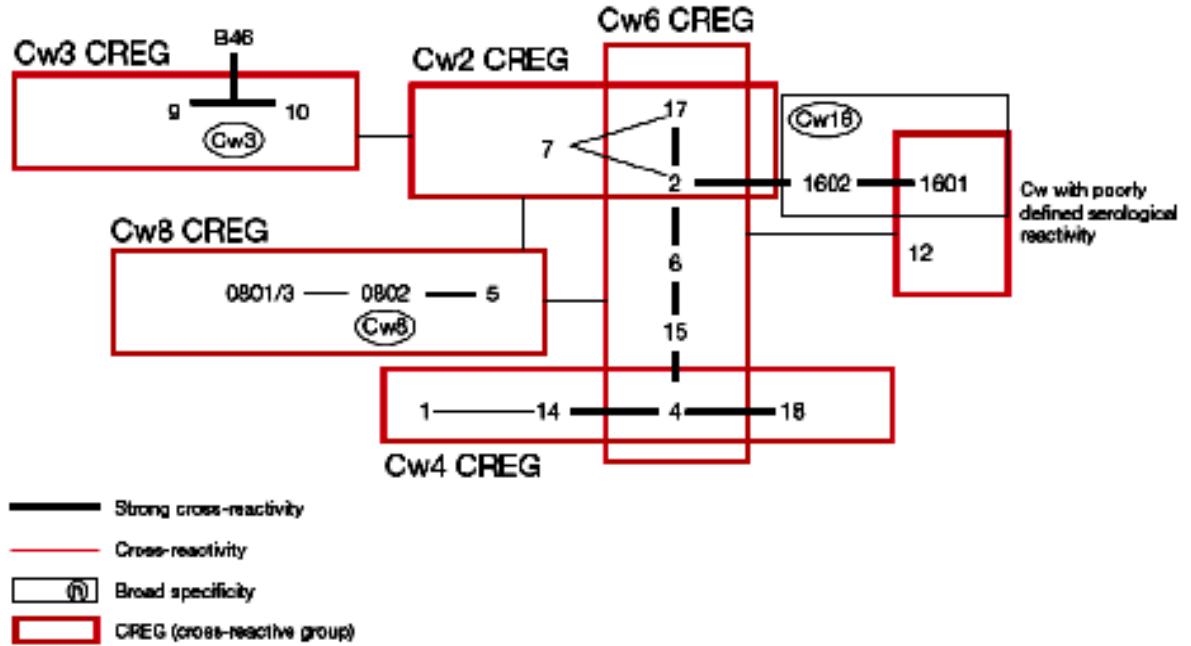
Reacción cruzada determinada por serología para el Locus HLA-B



Fuente: Invitrogen. Cross Reactive Group. 2009.

FIGURA 29.

Reacción cruzada determinada por serología para el Locus HLA-Cw



Fuente: Invitrogen. Cross Reactive Group. 2009.

TABLA 6.

Lista de las reacciones serológicas que se incluye dentro de los antígenos de Clase I

Esquema original de las especificidades	Subdivisiones (Splits)
A9	A23,A24
A10	A25,A26,Aw34, Aw66
Aw19	A29,A30A31,A32,Aw33
A28	Aw68,Aw69
B5	B51,Bw52
B12	B44,B45
B14	Bw64,Bw65
B15	Bw62,Bw63
B16	B38,B39
B17	Bw57,Bw58
B31	B49,Bw50
Bw22	Bw54,Bw55,Bw56
B40	Bw60,Bw61
Bw70	Bw71,Bw72

DR5 DRw6	DRw11,DRw12 DRw13,DRw14
Dw6 Dw7	Dw18,Dw19 Dw11,Dw17
Lo siguiente incluye especificidades HLA-B dentro Bw4 y Bw6	
Bw4:	B5,B13,B17,B27,B37,B38(16),B44(12), BW47,B49(21),B51(5),Bw52(5),Bw53, Bw57 (17), Bw58 (17), Bw59, Bw63 (15).
Bw6:	B7,B8,B14,B18,Bw22,B35,B39(16) B40,Bw41,Bw42,B45(12),Bw46,Bw48, Bw50(21),Bw54(w22),Bw55(w22), Bw56(w22),Bw60(40),Bw61(40) Bw62(15),Bw64(14),Bw65(14),Bw67 Bw70,Bw71(w70),Bw72(w70),Bw73.

Fuente: S. Dahan. Marqueurs du complexe Majeur D'Histocompatibilite: Systeme HLA A propos d'une étude sur un échantillon de population bolivienne. 1987. p. 31

B. CLASIFICACION DE LOS GREC's:

TABLA 7.

1. A1 GREC (1C)

	Epítotope de grupo	Epítotope públicos			
A1	1	1p			
A36	1	1p			
A3	3	1p			
A11	11	1p	10p		
A23	9	1p		9p	4C
A24	9	1p		9p	4C
A29	29	1p			
A30	19	1p			

A31	19	1p				
A80	80	1p				

Fuente: E. Glenn.⁽³⁹⁾ Epítopes del 1C.2000

TABLA 8.

2. A10 GREC (10C):

	Epítope de grupo	Epítopes públicos				
A11	11	10p	1p			
A25	10	10p			4C	
A26	10	10p				
A34	10	10p				
A66	10	10p				
A68	28	10p	28p	9p		
A69	28	10p	28p	9p		
A32	19	10p			4C	
A33	19	10p				
A74	19	10p				
A43	19	10p				

Fuente: E. Glenn.⁽³⁹⁾ Epítopes del 10C.(2000).

TABLA 9

3. A2 GREC (2C):

	Epítope de grupo	Epítopes públicos				
A2	2	9p	28p	17p		
A23	9	9p			4C	

A24	9	9p		4C	
A68	28	9p	28p		
A69	28	9p	28p		
B57	17		17p	4C	21p
B58	17		17p	4C	21p

Fuente: E. Glenn E, (2000) Epítopes del 2 GREC.

TABLA 10

4. B5 GREC (5C):

	Epítope de grupo	Epítopes públicos			
B51	5	21P	5P	4C	
B52	5	21P	5P	4C	
B53	53	21P	5P	4C	
B35	35	21P	5P	6C	
B18	18	21P	5P	6C	8P
B78	78	21P	5P	6C	
B62	15	21P		6C	
B63	15	21P		4C	
B75	15	21P		6C	
B76	15	21P		6C	
B77	15	21P		4C	
B57	17	21P		4C	

B58	17	21P	4C	
B70	70	21P	6C	
B46	46	21P	6C	12P
B49	21	21P	4C	12P
B50	21	21P	6C	12P

Fuente: E. Glenn. (2000) Epítopes del 5 GREC.

TABLA 11.

5. B7 GREC 7C

	Epítope de grupo	Epítopes públicos			
B7	7	22p	27p	7p	6C 40p
B27	27	22p			4C
B42	42	22p		7p	6C
B46	46	22p			6C 5p
B54	22	22p			6C
B55	22	22p			6C
B56	22	22p			6C
B13	13		27p		4C 12p
B60	40		27p		6C 40p 12p
B61	40		27p		6C 12p
B47	47		27p		4C 12p
B8	8			7p	6C 8p

B59	8	7p	6C	8p
B41	41	7p	6C	12p
B48	48	7p	6C	40p
B81	7	7p	6C	

Fuente: E. Glenn. (2000) Epítopes del 7 GREC.

TABLA 12.

6. B8 GREC (8C)

	Epítope de grupo	Epítopes públicos			
B8	8	8p	7p	6C	
B59	8	8p		4C	
B38	16	8p		4C	
B39	16	8p		6C	
B18	18	8p	5p	6C	
B67	67	8p		6C	
B64	14	8p		6C	
B65	14	8p		6C	

Fuente: E. Glenn. (2000) Epítopes del 8 GREC.

TABLA 13.

7. B12 GREC (12C)

	Epítope de grupo	Epítopes públicos			
B13	13	12p		4C	27p
B37	37	12p	5p	4C	
B41	41	12p	7p	6C	

B44	12	12p	4C	
B45	12	12p	6C	
B47	47	12p	4C	27p
B49	21	12p	4C	21p
B50	21	12p	6C	21p
B60	40	12p	7p	6C 27p 40p
B61	40	12p	6C	27p

Fuente: E. Glenn. (2000) Epítopes del 12 GREC.

TABLA 14.

8. 4C GREC (BW4) Y 6C GREC (BW6)

Epítopes Bw4	Epítopes Bw6
A23,A24,A25,A32	
B51,B52,B53,B57 B58,B63,B77	B18,B35,B62,B71 B72,B75,B76,B78
B27,B47	B7,B42,B48,B54,B55 B56,B73,B81,B82
B38,B59	B8,B39,B64,B65,B67
B13,B37,B44,B49	B41,B45,B50,B60,B61

Fuente: E. Glenn. Distribución de los epítopes Bw4 y Bw6 definidos serológicamente en los productos génicos HLA clase I del locus A y locus B. 2000. p. 220

C. GENETICA DE POBLACIONES:

1. EL DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

El ligamiento tan estrecho de estos genes podría facilitar la perpetuación de combinaciones favorables de alelos. Por estudios de recombinación los sitios de mapeo del HLA-B 0.2 cM centromerico de HLA-C y HLA-A 0.8 cM telomerico de HLA-C, se encuentran en consenso razonable con el mapa físico. En otras regiones del MHC la concordancia entre la distancia física y la distancia de recombinación no es buena. Este hecho puede ser atribuido al desequilibrio de ligamiento, esto es, una asociación no por el azar, de alelos, en loci ligados. Un ejemplo en la población caucásica es el HLA-A1 y HLA-B8, que en frecuencias génicas individuales se presentan en un 27.5% y 15.7% respectivamente. La frecuencia esperada de que estos 2 alelos estén juntos sobre el mismo cromosoma es, aproximadamente del 4.3%, pero este haplotipo esta presente en un 9.8% del cromosoma 6 , indicando una baja frecuencia de recombinación entre HLA-A y HLA-B.

No se ha observado recombinaciones entre HLA-DQ y DR. Hay solo un débil desequilibrio de ligamiento entre DP y DQ, lo cual sugiere "hot spots" para la recombinación, por otro lado, se han mapeado muchos entrecruzamientos entre DP y DQ en el segundo intron del gen TAP. Un ejemplo de distorsión extrema entre el mapa físico y los datos de recombinación esta localizado en la región telomerica de clase I.

La explicación para estas fluctuaciones en el desequilibrio de ligamiento, esta en modelos de selección para combinaciones adecuadas de alelos, en loci ligados a poblaciones cerradas, que no tuvieron tiempo para convertirse en mezclas al azar y en la aparición de sitios de recombinación no producidas por azar.

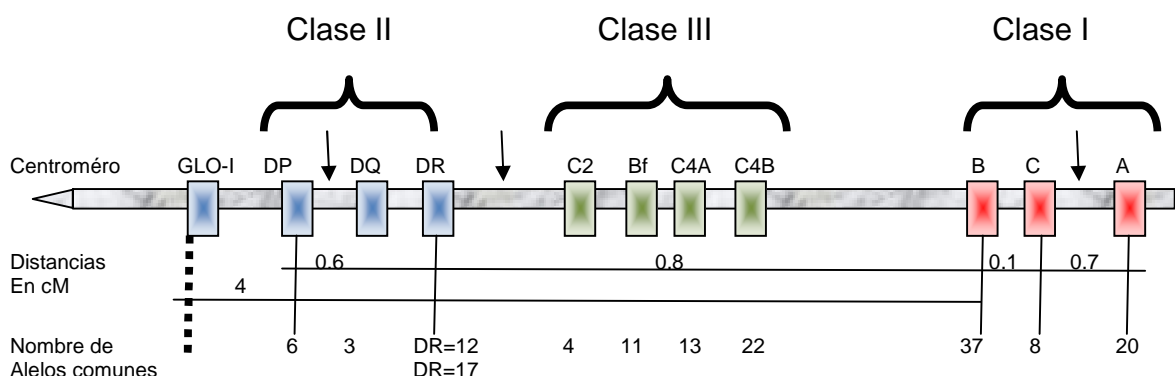
Las velocidades recientes de recombinación detectadas a través de sondas de micro satélites al interior de la región HLA clase II (DRB1-DPB1) mostró ser del 0.74%, mientras que en la región de clase III (HLA-B-DRB1) fue del 0.94%. Ambas de estas

velocidades están dentro del rango esperado, dando el standard del 1% de recombinación por Mbp de DNA por meiosis. Sin embargo, la velocidad de recombinación entre HLA-A y HLA-B se encontró que era del 0.31%, lo cual es menos de lo esperado para un segmento de DNA de 1.4 Mbp. ⁽³⁹⁾

Es de gran importancia por la variabilidad que proporciona al sistema HLA, sobretodo en la variabilidad de las diferentes etnias que esta relacionada con las migraciones poblacionales. ⁽⁴⁰⁾

FIGURA 30.

Organización general del Complejo Mayor de Histocompatibilidad



↓ = Indican las "hot spots" de las recombinaciones.

Fuente: S. Dahan. Marqueurs du complexe Majeur D'Histocompatibilite: Systeme HLA A propos d'une étude sur un échantillon de population bolivienne. 1987. p. 24

2. LAS FRECUENCIAS GÉNICAS

Los diferentes alelos se diferenciaron en 3 grandes etnias (caucasoide, mongoloide y negroide) determinado en el IX "workshop" de 1984 en la que existe gran variabilidad de acuerdo a lo siguiente. Actualmente se clasifica como frecuencias de las etnias (caucasoide, blanco, japonés chino e hispano). Para el cálculo de frecuencias alélicas ver Anexo 3.

TABLA 15

Comparación de frecuencias de los alelos de clase I, de acuerdo a los 3 diferentes grupos étnicos (Caucasoides, Mongoloides y Negroides)

<u>Frecuencia alélica del LOCUS A</u>		<u>Frecuencia alélica del LOCUS B</u>			<u>Frecuencia alélica del LOCUS C</u>		<u>Etnias</u>	
A1	0,1439	B7	0,1439	Bw52	0,0195	Cw1	0,0335	Caucasoide
	0,0102		0,0470		0,0732		0,1641	Mongoloide
	0,0769		0,1266		0,0060		0,0087	Negroide
A2	0,2855	B8	0,0971	Bw53	0,0052	Cw2	0,0416	Caucasoide
	0,2797		0,0020		0,0030		0,0103	Mongoloide
	0,1753		0,0534		0,0642		0,1211	Negroide
A3	0,1335	B13	0,0289	Bw54	0,0005	Cw3	0,1264	Caucasoide
	0,0153		0,0376		0,0678		0,2739	Mongoloide
	0,0736		0,0149		0,0000		0,0961	Negroide
A11	0,0631	B18	0,0532	Bw55	0,0160	Cw4	0,1169	Caucasoide
	0,1182		0,0031		0,0208		0,0528	Mongoloide
	0,0208		0,0413		0,0050		0,1394	Negroide
A23	0,0142	B27	0,0343	Bw56	0,0106	Cw5	0,0701	Caucasoide
	0,0010		0,0156		0,0144		0,0062	Mongoloide
	0,0769		0,0177		0,0030		0,0276	Negroide
A24	0,1028	B35	0,1052	Bw57	0,0290	Cw6	0,0849	Caucasoide
	0,3122		0,1021		0,0073		0,0378	Mongoloide
	0,0504		0,0798		0,0297		0,1327	Negroide
A25	0,0244	B37	0,0157	Bw58	0,0173	Cw7	0,2451	Caucasoide
	0,0000		0,0061		0,0250		0,1190	Mongoloide
	0,0000		0,0178		0,1036		0,2363	Negroide
A26	0,0330	B38	0,0242	Bw59	0,0000	Cw8	0,0366	Caucasoide
	0,0715		0,0072		0,0114		0,0030	Mongoloide
	0,0414		0,0148		0,0000		0,0377	Negroide
A28	0,0466	B39	0,0202	Bw60	0,0378	B1anc	0,2448	Caucasoide

	0,0206 0,0973		0,0407 0,0030		0,0668 0,0209	0,3327 0,2009	Mongoloide Negroide
A29	0,0294 0,0040 0,0482	Bw41	0,0091 0,0010 0,0178	Bw61	0,0205 0,1160 0,0107		Caucasoide Mongoloide Negroide
A30	0,0346 0,0237 0,1138	Bw42	0,0024 0,0032 0,0562	Bw62	0,0614 0,0945 0,0268		Caucasoide Mongoloide Negroide
A31	0,0294 0,0522 0,0178	B44	0,1242 0,0583 0,0712	Bw63	0,0066 0,0000 0,0178		Caucasoide Mongoloide Negroide
A32	0,0381 0,0041 0,0208	B45	0,0041 0,0010 0,0267	Bw64	0,0113 0,0000 0,0149		Caucasoide Mongoloide Negroide
Aw33	0,0149 0,0607 0,0446	Bw46	0,0005 0,0366 0,0000	Bw65	0,0262 0,0020 0,0178		Caucasoide Mongoloide Negroide
Aw34	0,0010 0,0030 0,0472	Bw47	0,0024 0,0043 0,0000	Bw67	0,0000 0,0010 0,0000		Caucasoide Mongoloide Negroide
Aw36	0,0005 0,0010 0,0296	Bw48	0,0000 0,0167 0,0030	Bw71	0,0005 0,0042 0,0075		Caucasoide Mongoloide Negroide
Aw43	0,0000 0,0000 0,0089	B49	0,0180 0,0032 0,0208	Bw72	0,0029 0,0051 0,0677		Caucasoide Mongoloide Negroide
Aw66	0,0014 0,0041 0,0030	Bw50	0,0113 0,0031 0,0059	Bw73	0,0014 0,0021 0,0000		Caucasoide Mongoloide Negroide
B1anc	0,0035 0,0162	B51	0,0622 0,0762	B1anc	0,0039 0,0161		Caucasoide Mongoloide

0,0473	0,0207	0,0147	Negroide
--------	--------	--------	----------

Fuente: S. Dahan. Marqueurs du complexe Majeur D'Histocompatibilite: Systeme HLA A propos d'une étude sur un échantillon de population bolivienne. 1987. p. 34

D. GREC'S DE LAS MOLECULAS HLA CLASE II

1. INMUNOSEROLOGIA

El descubrimiento de los antígenos DR en relación a las reacciones cruzadas con los mismos tipos de inclusiones serológicas para los antígenos de clase I: la subdivisión de antígenos y especificidades supertípicos.

TABLA 16

Reacción de las especificidades de clase II

Antígenos	Splits
DR5	DRw11,DRw12
DRw6	DRw13,DRw14
DRw52	DR3,DRw8,DRw11 (5) DRw12(5), DRw13 (w6) DRw14 (w6)
DRw53	DR4,DR7,DRw9
Dw6	Dw18,Dw19
Dw7	Dw11,Dw17

Fuente: S. Dahan. Marqueurs du complexe Majeur D'Histocompatibilite: Systeme HLA A propos d'une étude sur un échantillon de population bolivienne. 1987. p. 31

TABLA 17

Comparación de frecuencias de los alelos de clase II, de acuerdo a los 3 diferentes grupos étnicos (Caucasoides, Mongoloides y Negroides)

<u>Frecuencia alélica del</u> <u>LOCUS DR</u>				<u>Frecuencia alélica del</u> <u>LOCUS DQ</u>		<u>Frecuencia alelica</u> <u>del LOCUS DP</u>	
DR1	0,0957	DRw10	0,0082	DQw1	0,3228	DPw1	0,0427
	0,0499		0,0053		0,3037		-
	0,0529		0,0277		0,3980		-

DR2	0,1574 0,1530 0,1472	DRw11	0,1239 0,0396 0,1665	DQw2	0,1810 0,0500 0,2216	DPw2	0,1291 - -
DR3	0,1211 0,0191 0,1520	DRw12	0,0214 0,0706 0,0345	DQw3	0,2358 0,3277 0,2487	DP3	0,0442 - -
DR4	0,1277 0,2179 0,0795	DRw13	0,0544 0,0290 0,0451	Blanc	0,2611 0,3190 0,1311	DPw4	0,4068 - -
DR7	0,1197 0,0283 0,1198	DRw14	0,0575 0,0681 0,1010			DPw5	0,0438 - -
DRw8	0,0296 0,0708 0,0174	Blanc	0,0768 0,1312 0,0476			DPw6	0,0000 - -
DRw9	0,0077 0,1170 0,0174						

Fuente: S. Dahan. Marqueurs du complexe Majeur D'Histocompatibilite: Systeme HLA A propos d'une étude sur un échantillon de population bolivienne. 1987. p. 35

VII. RECHAZO

A. MANIFESTACIONES CLINICAS DEL RECHAZO RENAL

Existen criterios clínicos que permiten sospechar un rechazo agudo sobre todo a partir del quinto día de postoperatorio y en el transcurso de los primeros seis meses que es el periodo de mayor riesgo, los criterios histopatologicos continúan siendo el standard de oro para el diagnostico y la clasificación.

1. CRITERIOS CLÍNICOS

Se destaca la aparición súbita de oliguria, aumento de la temperatura en ausencia de infección, precedida de escalofríos, dolor y aumento de volumen del injerto,

acompañado de un gran compromiso general del paciente que hasta entonces evolucionaba favorablemente y se observa un aumento progresivo actualmente de la creatinina plasmática.

2. CRITERIOS ECOGRAFICOS Y DOPPLER

La ecografía del riñón trasplantado frente a una disfunción aguda del injerto renal es de gran utilidad para descartar otras causas, sobre todo las quirúrgicas, en los primeros días o semanas del post operatorio, tales como fistulas urinarias, hematomas, abscesos del lecho operatorio, urinomas o linfocelos. La ecografía doppler, por otra parte es de gran utilidad para valorar la permeabilidad de la arteria y la vena, al partir medir los flujos intravasculares y descartar la trombosis arterial o venosa. El doppler es también de gran utilidad para estudiar los flujos intra parenquimatosos y medir los índices de resistencia vascular en las arterias interlobares y arcuatas que deben ser menor a 0.70. Estos mismos hallazgos son el resultado de necrosis tubular aguda o nefrotoxicidad aguda a la ciclosporina y el diagnostico de rechazo solo podrá hacerse en base a los criterios histopatológicos.

3. DIAGNOSTICO DEL RECHAZO MEDIANTE BIOPSIA RENAL DEL INJERTO

(a) CRITERIOS HISTOPATOLÓGICOS

Se basa en los infiltrados linfocitarios tubulares, perivasculares e intersticiales muchas veces acompañados de polimorfonucleares o eosinofilos con distribución focal o difusa y asociados a grados variables de necrosis, edema intersticial, hemorragia intersticial o vasculitis.

(b) INDICACIONES DE LA BIOPSIA DEL INJERTO RENAL

Para detectar un rechazo agudo e iniciar el tratamiento en un riñón con disfunción del injerto desde el momento del implante, se requiere realizar biopsias programadas a intervalos regulares de tiempo mientras persista la oliguria, al menos una vez por semana. La biopsia también está indicada en caso de aumento persistente y progresivo de la creatinina sérica, pese a la reducción de dosis de ciclosporina y siempre que se descarte por ecografía y eco-doppler, tanto las complicaciones vasculares, como las urológicas y del lecho quirúrgico.

B. CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS PRECOCES

1. RECHAZO HIPERAGUDO O AGUDO ACELERADO

Ocurre de inmediato en las primeras 48 horas que siguen al trasplante. Se manifiesta por disminución de la diuresis acompañada de aumento en la creatinina plasmática a pesar de omitir o disminuir las dosis de ciclosporina. Puede evitarse trasplantado luego de un Cross-Match negativo entre linfocitos del donante y el suero (anticuerpos) del receptor. Histopatológicamente se caracteriza por la combinación de edema intersticial, hemorragia intersticial y arteritis severa (+++) y difusa; presente en todos los vasos sanguíneos. El edema intersticial, la hemorragia y la arteritis severa (+++), se acompañan de un infiltrado linfocitario perivascular leve (+) y de un infiltrado linfocitario intersticial leve (+), no se observan signos de fibrosis (-). Está mediado por la inmunidad celular y humoral. Se puede observar en el receptor de anticuerpos preformados contra determinados antígenos del HLA o del ABO. Se produce una tumefacción progresiva del órgano trasplantado con la imposibilidad total de la función contráctil.

(a) LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Se observa en la primera biopsia tomada a la primera semana, en riñones del donante que han estado mal perfundidos antes de la obtención de los órganos o

durante su retirada, transporte o implantación. Histopatológicamente se caracteriza por una destrucción de las células tubulares moderada (++), acompañada de un infiltrado perivascular dudoso (+/-), de un infiltrado intersticial dudoso (+/-), sin edema intersticial (-), hemorragia intersticial (-), arteritis (-), no hay signo de fibrosis (-).

2. RECHAZO AGUDO

(a) RECHAZO AGUDO CELULAR LEVE

Puede ocurrir en cualquier momento y puede ser detectado en cualquiera de las biopsias tomadas. Histopatológicamente se caracteriza por focos aislados de tubulitis (+), infiltrado perivascular linfocitario en general leve (+) , infiltrado intersticial también linfocitario y leve (+) , sin necrosis tubular (-) ni evidencia de destrucción celular (-) edema, hemorragia o arteritis (-)ni fibrosis (-).

(b) RECHAZO AGUDO VASCULAR LEVE

Puede ocurrir en cualquier momento y se lo detecta en cualquiera de las biopsias tomadas. Clínicamente es resistente a los esteroides. Histopatológicamente se caracteriza por focos aislados de tubulitis (+), infiltrado perivascular linfocitario leve (+), infiltrado intersticial también linfocitario leve (+) sin necrosis tubular (-) ni evidencia de destrucción celular (-), con edema intersticial (+), hemorragia intersticial (+), focos de arteritis (+) y ausencia de fibrosis (-).

(c) RECHAZO AGUDO CELULAR MODERADO

Puede presentarse en pacientes con rechazo agudo leve no tratado. Clínicamente responde a los esteroides en dosis elevadas. Histopatológicamente se caracterizan por infiltración linfocitaria tubular o tubulitis difusa (++), un infiltrado perivascular linfocitario moderado y difuso (++), un infiltrado intersticial también linfocitario moderado y difuso (++), sin necrosis tubular (-), dudosa destrucción celular (+/-) y sin edema intersticial (-), hemorragia (-), ni arteritis (-) y sin signos de fibrosis (-).

(d) RECHAZO AGUDO VASCULAR MODERADO

Ocurre en cualquier momento y se lo puede detectar en cualquiera de las biopsias. Clínicamente es resistente a los esteroides pero puede responder a la inmunoglobulina intravenosa. Histopatológicamente se caracteriza por focos aislados de tubulitis (+), infiltrado perivascular linfocitario leve (+), infiltrado intersticial también linfocitario leve (+), sin necrosis tubular (-) ni evidencia de destrucción celular (-), con edema intersticial (++) , hemorragia intersticial (++) , arteritis difusa (++) y ausencia de fibrosis (-).

(e) RECHAZO AGUDO CELULAR SEVERO

Puede también presentarse en pacientes con rechazo agudo leve o moderado no tratado o en cualquier momento Histopatológicamente se caracteriza por focos aislados de tubulitis (+), infiltrado perivascular linfocitario leve (+), infiltrado intersticial también linfocitario leve (+), sin necrosis tubular (-) ni evidencia de destrucción celular (-), con edema intersticial (++) , hemorragia intersticial (++) , arteritis difusa (++) y ausencia de fibrosis (-).

(f) RECHAZO AGUDO VASCULAR SEVERO

Puede ocurrir en cualquier momento y se lo puede detectar en cualquiera de las biopsias. Clínicamente es refractario al tratamiento con esteroides y puede no responder a la inmunoglobulina intravenosa. Histopatológicamente se caracteriza por focos aislados de tubulitis (+), infiltrado perivascular linfocitario leve (+), infiltrado intersticial también linfocitario (+++), hemorragia intersticial severa (+++), arteritis difusa (+++), trombosis (+++) necrosis fibrinoide de los vasos sanguíneos (+++) y ausencia de fibrosis (-).

(g) RECHAZO AGUDO EN RESOLUCIÓN

Se observa en pacientes con rechazo agudo leve, moderado o severo tratado y que ha respondido favorablemente al tratamiento. Histopatológicamente se caracteriza por un infiltrado perivascular linfocitario moderado (++), un infiltrado intersticial también linfocitario y dudoso (+/-), sin necrosis tubular (-), sin destrucción celular (-) ni edema intersticial (-), hemorragia intersticial (-) o arteritis (-) o ausencia de fibrosis (-). ⁽⁴¹⁾

(h) RECHAZO AGUDO HUMORAL:

Este tipo de rechazo se presenta con menor frecuencia, y suele aparecer en el postoperatorio inmediato. Es mediado por inmunoglobulinas o anticuerpos preformados frente al sistema HLA o ABO. Se caracteriza por edema celular o intersticial, infiltrado inflamatorio de predominio polimorfonuclear. Se trata de un rechazo mediado por anticuerpos, es una forma de rechazo grave y requiere tratamiento agresivo con plasmaferesis.

3. RECHAZO CRONICO

(a) RECHAZO CRONICO LEVE

Puede ocurrir en forma gradual en cualquier momento a partir del primer año del trasplante y puede ser detectado en cualquiera de las biopsias. Histopatológicamente se caracteriza por focos aislados de atrofia tubular (+), focos aislados de fibrosis intersticial leve (-) y mínimo engrosamiento de las paredes vasculares.

(b) RECHAZO CRONICO MODERADO

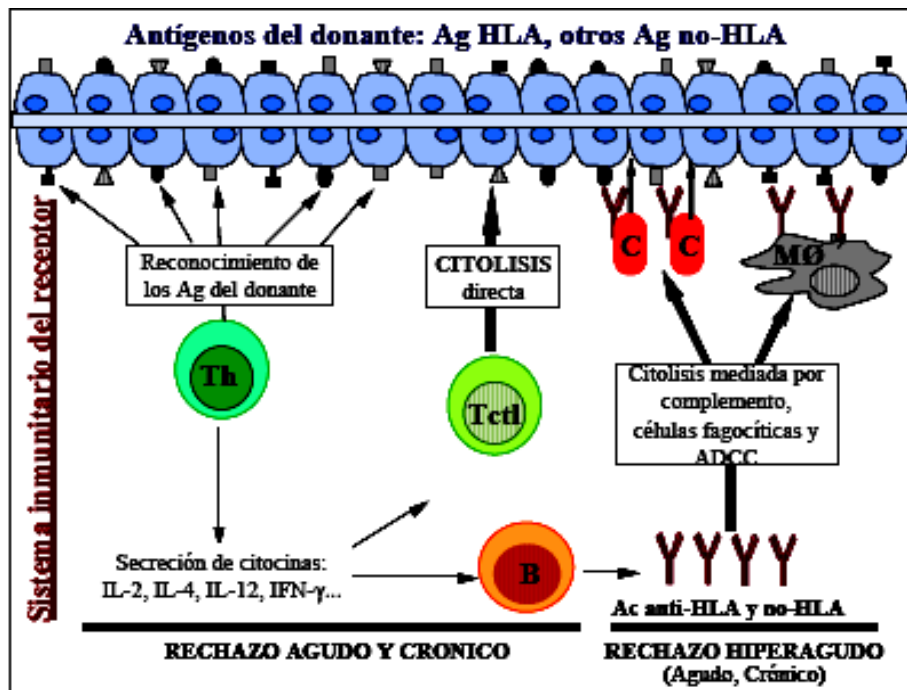
Puede ocurrir en forma gradual y en cualquier momento a partir de del primer año del trasplante se lo detecta en cualquiera de las biopsias tomadas. Histopatológicamente se lo caracteriza por focos aislados de atrofia tubular difusa (++), fibrosis intersticial difusa (++), y moderado engrosamiento de las paredes vasculares (++).

(c) RECHAZO CRONICO SEVERO

Puede ocurrir en forma gradual a lo largo de muchos años del trasplante. Histopatologicamente se caracteriza por atrofia tubular difusa y severa (+++), fibrosis intersticial difusa y severa (+++), y un gran engrosamiento de las paredes vasculares (+++) con reducción importante de la luz vascular, siendo el retrasplante el único tratamiento alternativo.

FIGURA 31.

Mecanismos celulares y humorales por lo cual el reconocimiento de antígenos de histocompatibilidad del donante por parte del sistema inmunitario del receptor puede desencadenar el rechazo hiperagudo, agudo y/o crónico del aloinjerto.



Fuente: M. Muro et. al. Histocompatibilidad del trasplante. Granada.2009.p.125

VIII. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

Una característica fundamental del *sistema inmune* es la de no reaccionar frente a los componentes propios del individuo, aún cuando posee la cualidad de responder

frente a cualquier antígeno extraño al mismo. Esta capacidad de reconocimiento y aceptación de los componentes propios del organismo se debe al fenómeno de *tolerancia inmunológica*. Gracias a este fenómeno, de entre los receptores específicos de antígeno producidos al azar, se produce una inactivación física o funcional de todos aquellos que reconozcan antígenos propios. Hoy se entiende por *tolerancia inmunológica* la ausencia específica de respuesta del sistema inmune frente a un antígeno, ya sea propio (*autoantígeno*) o extraño. ⁽⁴²⁾

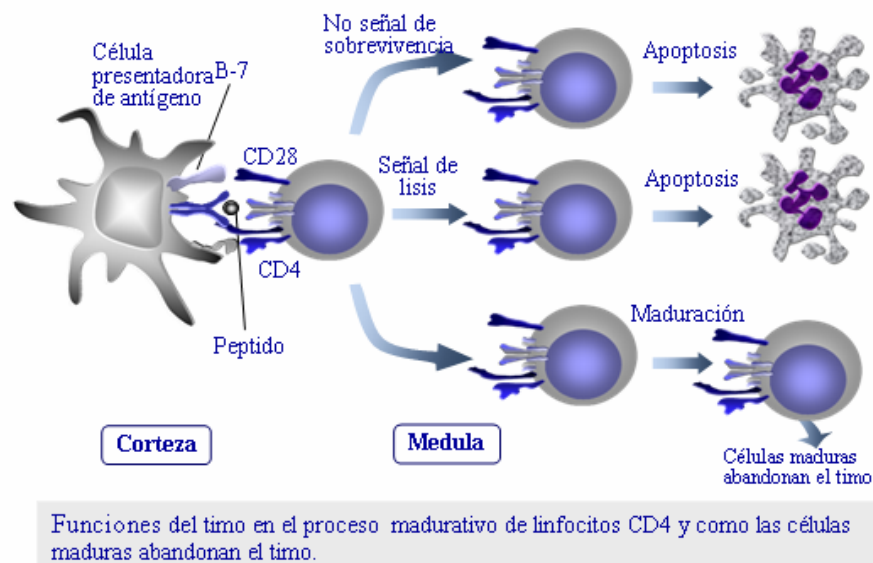
A. TOLERANCIA T

1. TOLERANCIA CENTRAL

En el timo tienen lugar dos procesos aparentemente contradictorios: la selección positiva de aquellos linfocitos cuyo receptor es capaz de reconocer las moléculas propias del MHC y la selección negativa que consiste en la eliminación de las células T autorreactivas.

FIGURA 32.

La muerte de los timocitos en todas estas circunstancias se consigue por apoptosis.



Fuente: J. Peña y A. Cabello. Tolerancia inmunológica. 2003. P. 175

2. TOLERANCIA PERIFÉRICA

En el timo el proceso de delección de clones autorreactivos no puede ser exhaustivo so pena de reducir dramáticamente el repertorio de linfocitos T disponible para responder a los antígenos ajenos, por lo que se mantienen en circulación clones capaces de reconocer antígenos propios de los tejidos "periféricos". Se ha demostrado por ejemplo la existencia en animales normales de clones capaces de reconocer colágeno tipo II y proteína básica de la mielina, así como receptores de acetilcolina y antígenos de los islotes de Langerhans. Normalmente estos clones autorreactivos no responden a los antígenos periféricos. Los mecanismos que subyacen a esta "no respuesta específica" son muy variados y entre ellos se incluyen ignorancia clonal, anergia, delección, inhibición y supresión.

B. TOLERANCIA B

Tal como se ha demostrado repetidamente en estudios del repertorio B, entre los linfocitos B circulantes son muy numerosas las células capaces de reconocer autoantígenos. Afortunadamente estos linfocitos B autorreactivos no se activan por si solos ya que para la mayor parte de las respuestas, los linfocitos B requieren señales (citocinas y contacto directo) de las células T cooperadoras (lo que denominamos "ayuda T") cuyo repertorio es mucho menos autorreactivo y está mucho mas regulado. Esta limitación no es absoluta y de hecho falla cuando el sistema se enfrenta a un autoantígeno que contiene (en la misma molécula o en moléculas físicamente asociadas) determinantes antigénicos B asociados a determinantes T no propios (el caso de un fármaco unido a una proteína propia); la célula B autorreactiva puede entonces recibir ayuda para producir autoanticuerpos de una célula T que reconoce un epítipo ajeno.

La alta frecuencia de linfocitos B autorreactivos se explica porque éstos no sufren un proceso de selección negativa tan riguroso como el de los linfocitos T en el timo y de hecho se ha postulado que la autorreactividad B -de baja afinidad- es normal. Además la generación de diversidad de los receptores (Ig) de los linfocitos B incluye

un mecanismo, la hipermutación somática, que actúa en el curso de la respuesta inmune y que expandiendo de nuevo el repertorio puede generar autoanticuerpos de alta afinidad. Probablemente es por esta tendencia de las células B a la autorreactividad, por lo que son necesarios mecanismos de *delección clonal* y de *anergia clonal* de células B para asegurar un grado de tolerancia B. Al igual que en el caso de las células T, la delección clonal parece ser el principal mecanismo de la tolerancia central (es decir en la médula ósea) y la anergia el de tolerancia periférica.

C. LINFOCITOS:

Hay tres poblaciones principales de linfocitos T maduros: citotóxicos (Tc), colaboradores (Th, de *helper*) y reguladores o supresores (LTs, Treg). Todos expresan el marcador CD3. Los citotóxicos expresan además CD8, los colaboradores CD4. Existen varias clases de Th (por ej., Th1, Th2 y Th17). Los Treg pueden ser positivos para CD4 ó CD8 y deben caracterizarse con marcadores adicionales. Los linfocitos T no reconocen los antígenos en su estado nativo (intacto) sino epitopos procesados y presentados por células en moléculas del MHC. El receptor de los linfocitos T (TCR) reconoce estos complejos. El TCR es un heterodímero con cadenas α ó β (superfamilia de las inmunoglobulinas) unido no covalentemente a cinco subunidades de CD3 llamadas ζ , η , ϵ y δ . Las cadenas α y β se unen al antígeno. El CD3 permite la inserción del TCR en la membrana e interviene en los efectos intracelulares de la ocupación del receptor. El TCR de los Tc se asocia con CD8 (cadenas α) y reconoce antígenos presentados por MHC de clase I. El TCR del LTh reconoce antígenos acoplados a MHC de clase II.

(a) MADURACIÓN DE LOS LINFOCITOS T EN EL TIMO

Los progenitores de linfocitos T llegan al timo, donde sufren procesos de migración, proliferación, diferenciación y selección antes de retornar a la sangre como células T maduras. Los corpúsculos de Hassal forman un subcompartimiento en la médula del timo, donde las células epiteliales y dendríticas promueven el desarrollo de Treg.

Estas contribuyen a mantener la tolerancia hacia lo propio por la supresión activa de la respuesta inmune.

La salida de los linfocitos T maduros desde el timo hacia la sangre también es un proceso regulado por un gradiente del receptor tipo esfingosina-1-fosfato (S1P1), la subregulación de un receptor tipo lectina llamado CD69 y la expresión de la integrina $\alpha 5 \beta 1$, entre otras señales. Los linfocitos egresados del timo son vírgenes o ingenuos (*native*) hasta encontrar antígenos en la periferia. Los linfocitos T maduros son 75 % de los linfocitos de la sangre periférica, 90 % están en la linfa, y 30 % se encuentran en el bazo y los ganglios.

(b) ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN DE LOS LINFOCITOS T POR LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Para activarse, los linfocitos T vírgenes requieren instrucciones específicas proporcionadas principalmente por las Células dendríticas, lo que hace de éstas un eslabón clave entre la inmunidad innata y adquirida. Cuando las Células dendríticas entran en contacto con un patógeno, procesan sus antígenos y viajan por los vasos linfáticos hacia un ganglio, en donde puede encontrar un linfocito T que reconozca el epitopo presentado en la hendidura del MHC, de clase I para linfocitos CD8 o de clase II para linfocitos CD4.

Las células dendríticas se localizan en la piel, las mucosas y los órganos linfoides secundarios. Son cruciales para iniciar respuestas específicas a patógenos o células anormales (acción inmunogénica), y también para prevenir la reacción contra lo propio y contra antígenos exógenos inofensivos (acción tolerogénica). La maduración de las Células dendríticas puede ser inducida por productos de microorganismos, por linfocitos y neutrófilos, diversas citokinas, ligandos endógenos por ej., HSP70 (proteína de golpe de calor 70) y por complejos inmunes antígeno-anticuerpo.

La vía final común de la maduración involucra al NF- κ B y lleva a la secreción de citocinas, que atraen fagocitos y linfocitos, y la expresión de moléculas de membranas co-estimuladoras, necesarias para actuar sobre los linfocitos.

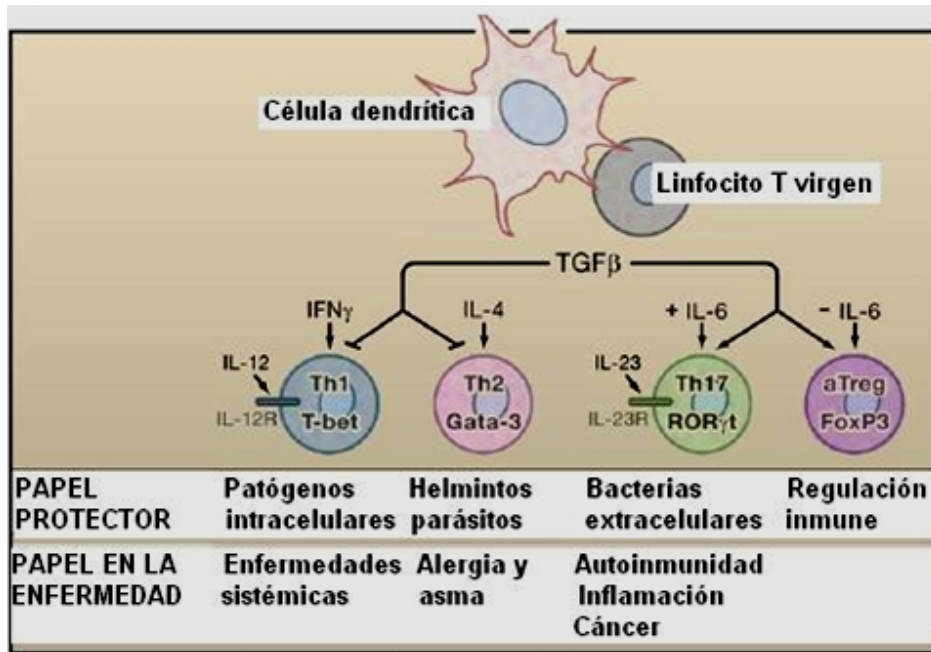
Las células dendríticas envían a los linfocitos T varias señales en forma secuencial. La primera señal es la presentación de moléculas de MHC con epitopos antigénicos, cuya interacción con los TCR inicia la formación de un contacto duradero (horas) y especializado entre la célula dendrítica y el linfocito T, llamado sinapsis inmunológica. La segunda señal corresponde a moléculas de señalamiento que pueden ser co-estimulantes o co-inhibitorias, según estimulen al linfocito a activarse o impidan su activación frente al antígeno presentado. La tercera señal establece, para los linfocitos T CD4, si el linfocito se diferenciará como Th1, Th2, Th17 o Treg (polarización funcional). La cuarta señal estimula a los linfocitos a expresar receptores de localización (*homing receptors*) que les permiten dirigirse a los tejidos donde se halló el antígeno y a tejidos similares.

Las células dendríticas es una población heterogénea. Se clasifican en mieloides, linfoides y plasmacitoides, que pueden distinguirse por marcadores de membrana. Las células dendríticas mieloides tienden a localizarse en la zona marginal de la pulpa blanca del bazo. Estimulan linfocitos T CD8 (citotóxicos) y en condiciones inflamatorias favorecen la diferenciación de linfocitos T CD4 en LTh2, activando factores de transcripción característicos como STAT-6, GATA-3 y c-maf. Las células dendríticas linfoides activan a los linfocitos T CD8, pero promueven la diferenciación de los CD4 en LTh1 por activación de los factores STAT-4 y T-bet. Finalmente, las células dendríticas plasmacitoides participan en el mantenimiento de tolerancia periférica induciendo Treg, aunque en ciertas condiciones favorecen la diferenciación de Th17 por activación del factor de transcripción ROR γ t. Las células dendríticas plasmacitoides se caracterizan por responder especialmente a ácidos nucleicos microbianos y producir gran cantidad de IFN tipo I (como IFN α y β), además de IL-6 y TNF. Las citocinas predominantes producidas por las células dendríticas guían la diferenciación de los linfocitos T: IL-12 para Th1, IL-4 para Th2, y TGF- β para Th17 y

Treg. En presencia de TGF- β , la diferenciación hacia Th17 es favorecida por la IL-6, mientras que su ausencia lleva a Treg.

FIGURA 33.

Destino de los linfocitos Th según las citocinas que actúan.



Fuente: SL. Reiner. Cell. 2007. p 129

VI. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

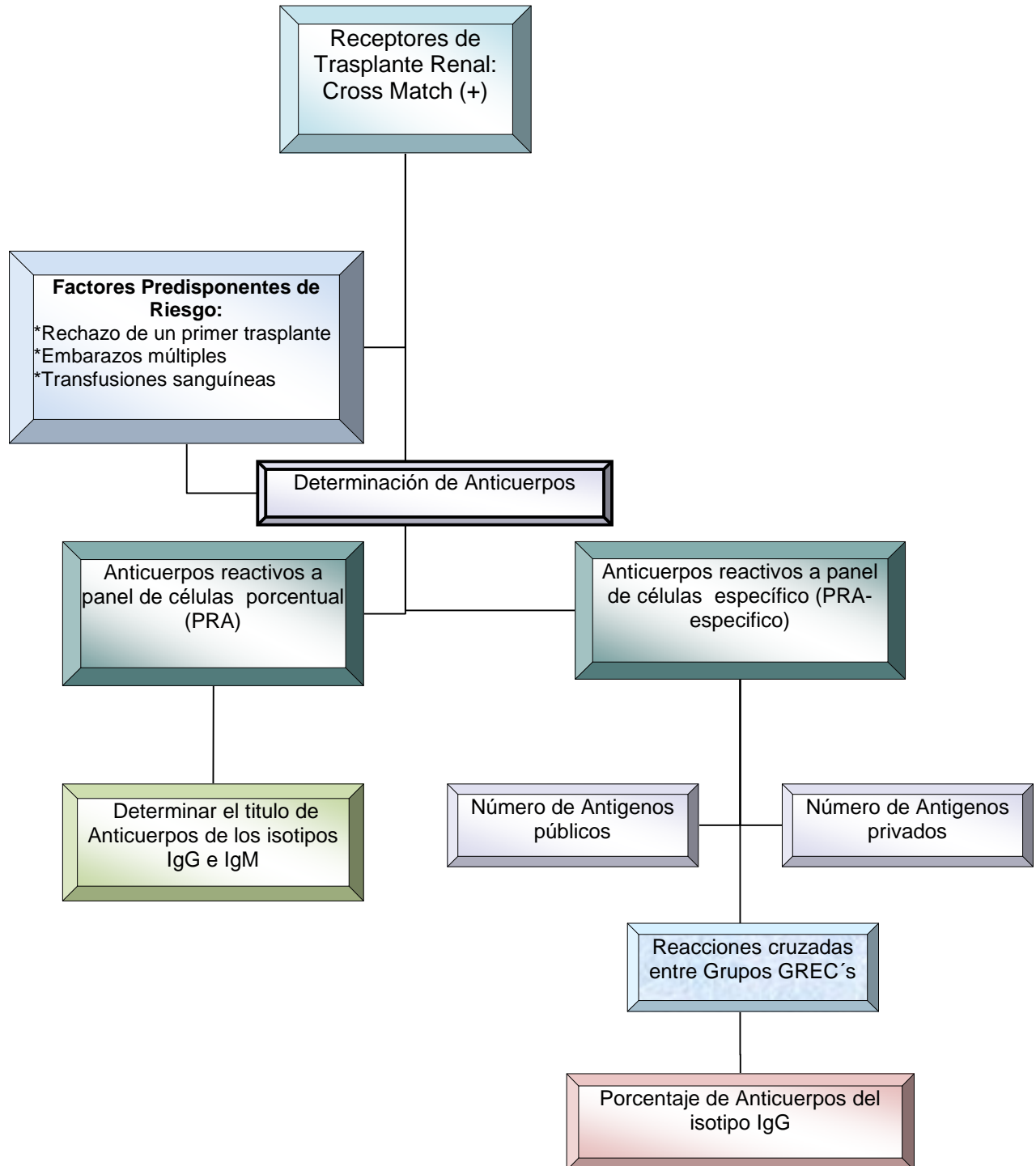
- Determinar el valor diagnóstico de la prueba de Anticuerpos Reactivos a Panel (PRA), en pacientes con antecedentes de transfusiones, embarazos, y trasplantes previos, atendidos en el Instituto SELADIS del 2005 al 2007

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a la población de estudio de acuerdo a su edad, género y etiología de la IRC, en el proceso de sensibilización.
 - Caracterizar a la población de pacientes de trasplante renal de acuerdo al PRA porcentual
 - Caracterizar a la población de pacientes de trasplante renal de acuerdo al PRA específico.
 - Relacionar el PRA porcentual y el PRA específico
 - Evaluar el comportamiento de los anticuerpos en pacientes Hipersensibilizados.
-

VI. DISEÑO METODOLOGICO

A. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:



B. OBJETIVOS, ACCIONES Y DISEÑO DE LA INVESTIGACION:

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	ACCIONES	INSTRUMENTO
Caracterización de la población	Revisar las estadísticas del laboratorio de aquellos pacientes que dieron Cross Match Positivo (+).	<ul style="list-style-type: none"> - Historias Clínicas - Investigación documental
	Organizar la información según los factores desencadenantes.	<ul style="list-style-type: none"> - Prueba de Cross-Match - transfusiones - Embarazos múltiples - Transplante previos
Características de la sensibilización	Delimitar por edad la población sensibilizada.	- Historia Clínica
	Determinar la población tomando en cuenta la recurrencia de enfermedades genéticas	- Historia Clínica
Antigenos Generados	Cuantificación de Anticuerpos en la población de estudio mediante la prueba del PRA porcentual por la técnica del CDC	<ul style="list-style-type: none"> -Reactivos de aislamiento linfocitario. -Técnica de Citotoxicidad Dependiente de Complemento -Planillas de codificación.

	Cuantificación de Anticuerpos en la población en estudio mediante la prueba del PRA específico por la técnica de ELISA	-Kit de ELISA específico -Planillas de codificación de Antígenos.
Determinar la probabilidad de contar con donantes adecuados	Determinar los Antígenos presentes en el receptor	-Prueba del PRA específico
	Establecer el tipo de Antígeno (público y/o privado)	- Planillas del Kit de antígenos - Planillas de GREC's
	Determinar el tipo de Antígeno público al cual se ha sensibilizado el receptor	-Planillas del Kit de antígenos

C. POBLACIÓN:

1. Criterios de inclusión:

La población en estudio estaba conformada por todos los receptores de trasplante que dieron resultados de la prueba de Cross Match positivos o dudosos en múltiples determinaciones, los cuales solicitaron la prueba de Anticuerpos Reactivos a Panel (PRA), siendo los antecedentes sensibilizantes, trasplantes previos, transfusiones y embarazos múltiples, en los cuales se cuantificó la cantidad de anticuerpos anti-HLA mediante la prueba del PRA.

2. Criterios de exclusión:

-Se excluyeron del estudio a aquellas personas que presentaron enfermedades autoinmunes como ser el LES, vasculitis y artritis reumatoidea.

-También se excluyeron a las personas que presentan enfermedades infectocontagiosas como ser tuberculosis y chagas, que pueden presentar falsos positivos por la estimulación inmunológica

-La personas con edad mayor a los 65 años, por la presencia de cáncer o presencia de infecciones debido a la declinación del sistema inmunológico.

D. MUESTRA:

1. CRITERIOS DE SELECCIÓN.

En este estudio se determinó la población por conveniencia, en virtud a que no existe una cantidad de casos que permitan desarrollar un muestreo probabilístico.

E. HERRAMIENTAS:

Se diseñó una hoja de recolección de datos que consta de: datos de identificación, antecedentes patológicos familiares, antecedentes familiares (lugar de nacimiento de la familia), antecedentes personales no patológicos, antecedentes patológicos, pruebas solicitadas.

F. TIPO DE ESTUDIO:

Se trata de un tipo de estudio longitudinal.

G. LUGAR DE ESTUDIO:

1. DESCRIPCION DEL AMBIENTE.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Servicios de Laboratorio en Diagnóstico e Investigación en Salud "SELADIS", que es parte de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés, ubicado en la zona de Miraflores N°2224. Esta Infraestructura esta conformada por 7 pisos, área de recepción de solicitud de pruebas, trabajo social, caja, seguridad a cargo de un guardia en planta baja. En el primer piso esta ubicado la biblioteca de la facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, en el segundo piso se encuentra el área administrativa que cuenta con las siguientes oficinas: secretaria, documentación y manejo de la red del sistema, la administración, y dirección. En el tercer piso esta conformado por tres laboratorios Bioquímica Clínica, Hematología e Inmunología. En el cuarto piso esta conformado por los laboratorios de endocrinología, microbiología clínica y microbiología de alimentos. En el quinto piso los laboratorios de Toxicología y Bromatología. En el sexto los laboratorios de Biología Molecular e Histocompatibilidad e Inmunogenetica. Por ultimo el séptimo piso los laboratorios de Virología y Parasitología.

2. DESCRIPCION DEL AMBITO.

La parte experimental de este trabajo, se realizó en el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenetica que esta compuesta por una oficina donde se ubica un equipo de computación con conexión a Internet. El ambiente de procesamiento de las muestras esta dividida en dos, el área de serología para diagnóstico de enfermedades autoinmunes y la segunda que es para el procesamiento para pruebas de tipificación la cual esta conformada por 4 ambientes para las pruebas de Biología Molecular (cuarto blanco, cuarto azul, cuarto gris y el cuarto negro), donde se va a desarrollar las diferentes etapas de procesamiento de las muestras respectivas, también consta de un ambiente de cultivo celular.

H. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

1. MATERIALES:

Tubos colectores al vacío sin anticoagulante
Tubos colectores al vacío con anticoagulante Heparina
Tubos falcón de 15 ml.
Tubos falcón de 50 ml.
Tubos Eppendorf
Placas Terasaki de 72 pozos
Cámara húmeda
Cronómetro
Micropipetas de 10 ul.
Jeringas Terasaki simples de 80 ul
Jeringas Terasaki múltiples de 80 y 400 ul
Cámara de Neubauer

2. EQUIPOS:

Microscopio óptico "Olympus BH-2"
Microscopio de contraste de fases invertido "Olympus CK2"
Macrocentrifuga "Hetich Universal 32"
Microcentrifuga "Micro 32"
Campana de flujo Laminar "Gelaire Flow Laboratories BSB4A"
Estufa CO₂ "Tuttnauer Knott"

3. REACTIVOS:

Buffer PBS 1.5 M (pH 7.5)
RPMI 1640 pH 7.2
Complemento de conejo
Ditiotreitól (DTT) "Dil. 1:9"
Inmunoglobulina IgG anti-Kappa "27,08 mg/ml" (pH 7,71). Dil 5ul/495 ul RPMI.
Ficoll – Hypaque (densidad 1.077)

Eosina Y "5g/100ml" (pH 7.2-7.4)

Formaldehído tamponado (pH 7.4)

Aceite mineral pesado

Azul tripan 0.2%

Anti D

I. MÉTODOS.

1. AISLAMIENTO DE CELULAS MONONUCLEARES A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA:

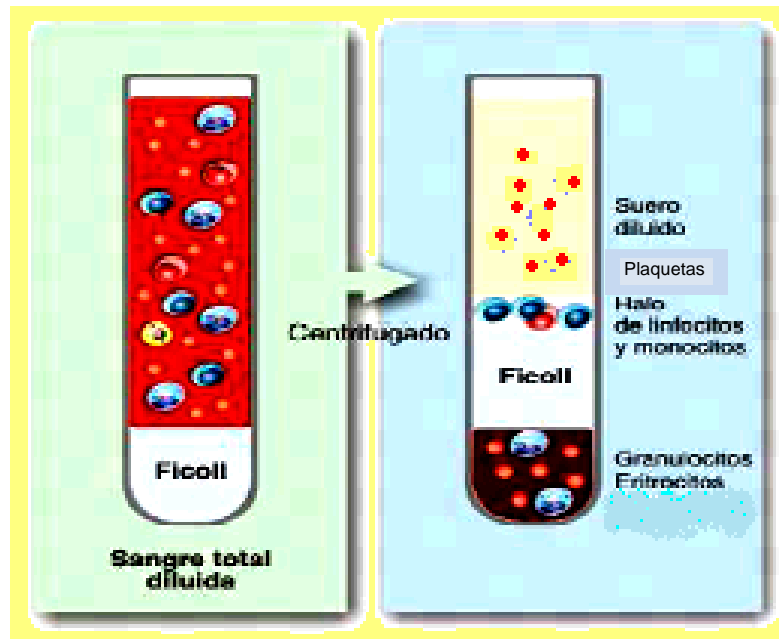
El aislamiento de células mononucleares, es la etapa más importante debido a que las pruebas que se realizan en el laboratorio de histocompatibilidad requieren de un tipo particular de células de la sangre periférica. Este aislamiento y purificación se basa en propiedades intrínsecas y extrínsecas, respecto a cada componente. Entre las propiedades intrínsecas se encuentra el tamaño, la densidad, viscosidad, adhesividad y granularidad. Entre las extrínsecas están la expresión de marcadores de la superficie celular de receptores y capacidad fagocítica.

Una de las técnicas más usadas actualmente en el laboratorio es la separación de células mononucleares de acuerdo a la densidad dada, usando ficoll-hypaque que tiene una densidad de 1.077 g/ml. idéntica a los linfocitos y monocitos. Este reactivo es una combinación de un polímero de sacarosa de alto peso molecular (Ficoll) y un compuesto orgánico iodinado (diatrizoato de sodio; 3-5 bis acetilamino-2, 4, 6 ácido triyodobenzoico).

Los granulocitos y eritrocitos que tienen una mayor densidad, cuando se centrifuga la sangre en el gradiente de ficoll-hypaque, pasan a través de este formando un paquete en el fondo del tubo. Las plaquetas que tienen una densidad menor permanecen en la fracción plasmática y los mononucleares se localizan en la interfase. Cuando se quedan en la interfase algunas plaquetas se pueden eliminar posteriormente centrifugando a una baja velocidad.

FIGURA 35.

Separación de células mononucleares:



Fuente: Soto Susana de Ferrini. CMH.2009.p. 34

a. PROTOCOLO

Se tomaron 10 ml de sangre en un tubo colector que contenía como anticoagulante heparina sódica y se centrifugó a 1.100 r.p.m. por 10 minutos, luego se trasvasó aproximadamente 2 ml de la interfase plasma paquete globular a otro tubo e inmediatamente se agregó 3 volúmenes de Buffer PBS celular y se mezcló bien. En casos de que los pacientes tengan una anemia muy pronunciada. Luego se agregó la interfase diluida a un tubo falcón de plástico de 15 ml que contenía previamente 3 ml de Ficoll – Hypaque (densidad 1.077), de forma muy cuidadosa evitándose que se mezcle y a continuación se procedió a centrifugar a 1.550 r.p.m. por 20 minutos y terminada la centrifugación se tomó con una pipeta Pasteur, la interfase en la que se encuentran los leucocitos mononucleares y transfirió a otro tubo falcón de plástico de 15 ml., donde se agregó 5 volúmenes de PBS celular y se centrifugó las células obtenidas a 1.100 r.p.m. por 10 minutos, luego se volvió a resuspender el pellet de

células que contenía a los linfocitos en 10 ml de PBS celular, se repitió el lavado dos veces mas en las mismas condiciones que se describió anteriormente. Finalmente las células obtenidas se resuspendieron en aproximadamente 500 ul del medio de cultivo RPMI 1.640 y se trasvasó a un tubo eppendorf de 1,5 ml, para que se realice la etapa del ajuste celular.

2. AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR.

Se resuspendieron suavemente las células con ayuda de una pipeta Pasteur. Mientras tanto en una placa de vidrio se realizó la dilución volumen/volumen aproximadamente 20 ul, de las células diluidas con RPMI y el colorante vital azul tripán y se procedió a cargar en la cámara de Neubauer donde se realizó el recuento en los 2 retículos empleados para glóbulos rojos y cada retículo presenta 25 divisiones, de los cuales solo se toma en cuenta 5 divisiones al azar, este recuento se lleva a cabo con ayuda de un contador de células y a partir de una concentración inicial de células se realizó el ajuste celular ideal a $2,5 \times 10^6$ cel/ml, utilizando la siguiente formula:

$$V_f \times C_f = V_i \times C_i$$
$$V_f = \frac{(V_i \times C_i)}{C_f}$$

Cf = concentración final deseada Ci = concentración inicial

Vf = volumen final Vi = volumen inicial

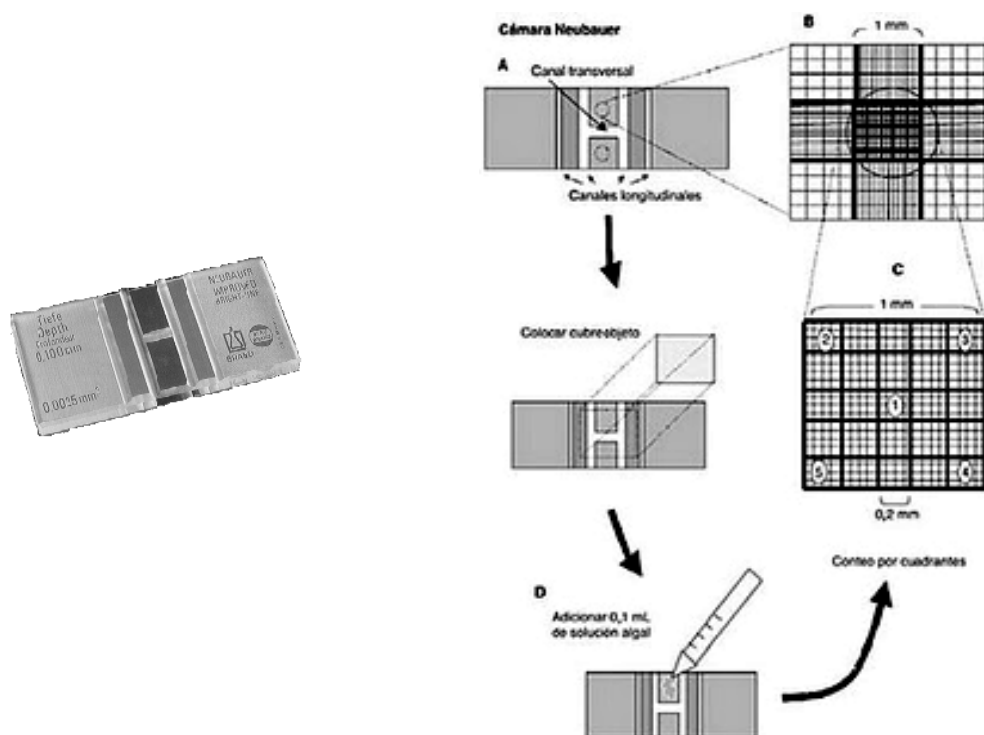
Una vez que se realizó los cálculos y de acuerdo a la concentración celular, se procedió de 2 maneras, si en el recuento se observo elevada concentración celular, se procedió a aumentar medio RPMI, en caso contrario si en el recuento se observó una concentración baja, se procedería a disminuir el medio RPMI para que de esta forma se obtuviera una correcta concentración determinada por la ASHI (The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics).⁽⁶⁵⁾

(a) VIABILIDAD CELULAR

Para determinar la viabilidad celular se emplea la tinción con azul tripán al 2%. El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan rupturas en la membrana. Así pues las células que aparecen en la imagen, claramente de color azul, son consideradas no viables o muertas. Su uso en la prueba de Cross-match es para identificar la viabilidad celular de los linfocitos totales aislados con ficoll-hipaque y el reactivo de trabajo debe diluirse en las siguientes proporciones: 10 μ l de las células ajustadas al 2.5×10^6 cel/ ml con 10 μ l de azul tripán en una relación vol/vol. Se debe realizar la cuantificación en el cuadrante de los glóbulos rojos de la cámara de new-bauer de reticulo brillante, la misma esta subdividida en 25 cuadrillos de los cuales se elige al azar 5 y se cuantifica las células, se admite un 95% de viabilidad mayor a este valor puede ocasionar falsos positivos.

FIGURA 36.

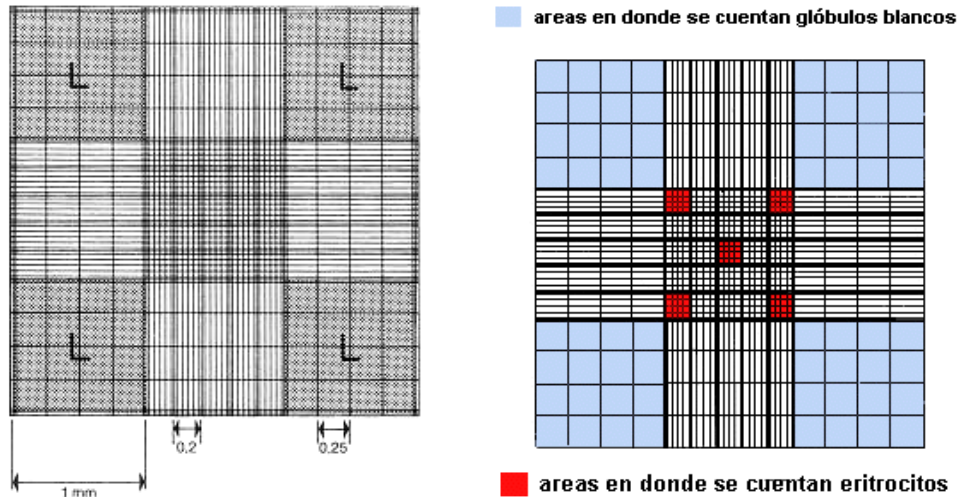
Material y pasos que se deben tomar en cuenta para determinar la viabilidad celular.



Fuente: www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm.2008.

FIGURA 37.

Cuadrantes de glóbulos rojos donde se realiza el recuento celular y viabilidad para la prueba de PRA porcentual.



Fuente: www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm.2008.

3. PRUEBA CRUZADA CON AMPLIFICADOR (CROSS MATCH) POR EL METODO DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DEL COMPLEMENTO (CDC- AHG).

Para esta prueba se procedió a trabajar con las células aisladas y en las que se realizó el ajuste celular a una concentración entre un intervalo de 2.0×10^6 a 2.5×10^6 células/ml.

En una gradilla, se preparó 6 tubos de hemolisis donde se realizó las correspondientes diluciones en tres tubos, se preparó según el siguiente orden muestra pura, segundo tubo dilución $\frac{1}{2}$ del suero con buffer PBS celular y en el tercer tubo se realiza una dilución $\frac{1}{4}$. En los tres tubos restantes, se procedió de la siguiente forma, en el primer tubo de hemolisis se realizó una dilución $\frac{1}{20}$ correspondiente al suero del receptor añadiendo a su vez ditiotreitól (DTT) cuya solución stock de 1:9 con RPMI, que es un agente reductor, se mezcló e incubó por 30 minutos a 37°C , para degradar los puentes de sulfuro de las IgM poliméricas fijadoras de complemento, para transformarlas en IgM monoméricas no fijadoras de

complemento. Después de transcurrido los 30 minutos, se hicieron diluciones $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ del suero tratado con DTT y como diluyente se hizo uso de PBS-celular. En esta técnica se uso placas de Terasaki de 72 pocillos nuevos sin ningún componente, distribuidos en seis columnas y doce filas, se colocó a cada pocillo 8 ul de aceite mineral pesado (para evitar la desecación de la reacción), luego con ayuda de una jeringa de Terasaki se añadió 1 ul del suero control negativo en la columna A, 1 ul del suero control positivo (suero de conejo antilinfocitario), en la columna F y 1 ul de las diluciones de suero del paciente con y sin DDT $\frac{1}{2}$ columna C, $\frac{1}{4}$ columna B, sueros sin diluir en la columna D y E (ver figura).

FIGURA 38.

Representación esquemática del sembrado de sueros del receptor en una placa de terasaki de 72 pocillos Cross Match, para linfocitos totales:

			A	B	C	D	E	F
			C(-)	1/4	1/2	S/DIL	S/DIL	C(+)
CON AMPLIFICADOR	SIN DTT	1						
		2						
		3						
	CON DTT	4						
		5						
		6						
SIN AMPLIFICADOR	SIN DTT	7						
		8						
		9						
	CON DTT	10						
		11						
		12						

Fuente: Representación Esquemática de la manera de sembrado del suero del receptor en una placa Terasaki de 72 pocillos.

Luego de añadir los sueros correspondientes de acuerdo al orden planteado en el esquema anterior se procedió a colocar con una jeringa de Terasaki, en cada pocillo 1 ul de las células del donante, ajustadas a 2×10^6 células/ml, y se verificó que todos los pocillos contengan la cantidad deseada de células, caso contrario se debe aumentar células al pozo respectivo. Luego se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la reacción antígeno anticuerpo. Después de la incubación, se centrifugó la placa a 1.000 r.p.m. por 5 minutos. A la parte de la placa que lleva el amplificador, se retiró con mucho cuidado el sobrenadante de cada micropozo, luego se agregó 2 ul del amplificador diluido en RPMI (inmunoglobulina IgG anti Kappa), y se realizó dos lavados con 2 ul de RPMI, a continuación se deshecho el sobrenadante y se colocó a toda la placa 5 ul de complemento de conejo (previamente descongelado en hielo), excepto en la fila E se incubó por una hora a temperatura ambiente. Finalmente se agregó a cada pozo 5 ul de “eosina Y” y luego 5 ul de formaldehído tamponado a pH 7.4, inmediatamente se colocó en cámara húmeda, se esperó por lo menos 1 hora, antes de leer los resultados.

La interpretación de los resultados se hizo con la plantilla de los antisueros, evaluando la cantidad de células muertas de acuerdo al puntaje (1, 2, 4 y 8), establecido por la ASHI (The American Society for Histocompatibility and Immunogenetics). La interpretación del porcentaje de mortalidad propuesto por el ASHI que se aplica a las pruebas serológicas basadas en la Microlinfocitotoxicidad Dependiente de Complemento, es el siguiente de acuerdo a una escala. (...33)

FIGURA 39.

Score de calificación para el porcentaje de células muertas

% células muertas	escala	Interpretación
0 - 10	1	Negativo
11- 20	2	Dudoso
21- 50	4	Débilmente positivo
51- 80	6	Positivo
81- 100	8	Fuertemente positivo
	0	No significativa

Fuente: ASHI procedure manual.⁽⁶⁶⁾ Interpretación del porcentaje de mortalidad propuesto por el ASHI que se aplica a las pruebas serológicas basadas en la microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento.

a) Control de calidad del Cross-match.

El control de calidad depende de la calidad de los controles internos que se elaboran y se titulan en forma adecuada para su utilización.

El control positivo de la prueba dependiente de complemento, se obtiene mediante la sensibilización a un conejo con linfocitos humanos de acuerdo a un protocolo de sensibilización, el cual nos proporcionara suero de conejo antilinfocitario, el mismo deberá dar un 100% de citotoxicidad, el cual se verifico hasta una dilución de 1:32 cuyo diluyente era el PBS celular y para su conservación debe realizarse una previa dilución 1:2 con glicerina p.a. Para evitar la inactivación y contaminación con bacterias y hongos se guarda a - 20°C.

El control negativo, se obtiene a partir de donantes varones con características aparentemente sanos, los mismos no deben pasar por efectos sensibilizantes y el suero debe verificarse previa utilización en una prueba cruzada conjuntamente con el anterior control negativo donde se debe observar a través del microscopio invertido un máximo de 10% de mortalidad celular para poder catalogarlo como un buen control y su conservación es de forma idéntica a la del control positivo.

El complemento de conejo, debe ser obtenido de uno que no pasó por efectos sensibilizantes para evitar que presente citotoxicidad previa utilización y comparación con uno anterior, solo debe descongelarse una vez para evitar falsos negativos por inactivación de componentes termolábiles. Debe evitarse que los otros reactivos a ser utilizados en la prueba, estén contaminados para que los datos a obtenerse sean confiables. Si es posible debe ser absorbido con células humanas para eliminar anticuerpos de reacción cruzada.

4. PRUEBA DE ANTICUERPOS REACTIVOS A PANEL DE CÉLULAS EN PORCENTAJE (PRA %).

Inicialmente se procedió a tomar muestras de sangre a los donantes voluntarios que presentaron ciertas características con relación al grupo sanguíneo y lugar de procedencia, a continuación se realizó el aislamiento y ajuste de concentración de los linfocitos totales de la forma antes mencionada. Por otra parte, se tomó muestra (suero), del receptor y se tomó una alícuota de esta para hacer el tratamiento con DTT para diferenciar los diferentes isotipos de anticuerpos presentes en la muestra del receptor.

Se utilizaron placas de Terasaki donde se colocó 8 ul aceite mineral pesado para evitar la desecación de la placa, posteriormente se procedió a añadir los sueros de los controles, la muestra en un volumen de 1 ul Control Negativo a la columna A, 1 ul del Control Positivo en la columna F, 1 ul de la muestra sin diluir a las columnas D y E, la dilución $\frac{1}{2}$ del suero a la columna C y la dilución $\frac{1}{4}$ a la columna B, en todos los pozos de acuerdo al esquema descrito. A continuación se coloca las células ajustadas de los donantes de acuerdo al esquema determinado previamente, esperamos unos 10 minutos, se observó mediante microscopio invertido la concentración de las células en cada pozo e incubamos por 30 minutos a temperatura ambiente, a continuación se colocó complemento de conejo previamente descongelado en hielo y depositamos a cada pozo 5 ul para posteriormente encubarlos por una hora a temperatura ambiente. Finalmente se procedió a parar la reacción con 5 ul de "eosina Y" e inmediatamente con 5 ul de formaldehído tamponado de pH 7.4 y se esperó un tiempo de por lo menos 2 horas antes de leer las placas.

Los resultados se plantearán de acuerdo a los reglamentos de ASHI en una escala determinada; De la misma forma se procedió con las placas con DTT-suero.

FIGURA 40.

Representación esquemática del sembrado de sueros del receptor en seis placas de Terasaki de 432 pocillos para la prueba del PRA porcentual:

*	A	B	C	D	E	F		A	B	C	D	E	F
1	(-)	(-)	(-)	1	1	1		(-)	(-)	(-)	1	1	1
2	2	2	2	3	3	3		2	2	2	3	3	3
3	4	4	4	5	5	5		4	4	4	5	5	5
4	6	6	6	7	7	7		6	6	6	7	7	7
5	8	8	8	9	9	9		8	8	8	9	9	9
6	10	10	10	11	11	11		10	10	10	11	11	11
7	12	12	12	13	13	13		12	12	12	13	13	13
8	14	14	14	15	15	15		14	14	14	15	15	15
9	16	16	16	17	17	17		16	16	16	17	17	17
10	18	18	18	19	19	19		18	18	18	19	19	19
11	20	20	20	21	21	21		20	20	20	21	21	21
12	22	22	22	(+)	(+)	(+)		22	22	22	(+)	(+)	(+)
SIN – DTT							CON – DTT						
A, B, C (1): Suero control negativo D, E, F (1): Suero del paciente A, B, C, D, E, F (2 al 11): Suero del paciente A, B, C (12): Suero del paciente D, E, F (12): Suero control positivo (-): Se colocan células al azar del panel de donantes. Pozos (1-22): Representan los lugares en los cuales se colocan las células del panel.							A, B, C (1): Suero control negativo D, E, F (1): Suero del paciente - DTT A, B, C, D, E, F (2 al 11): Suero del paciente- DTT A, B, C (12): Suero del paciente- DTT D, E, F (12): Suero control positivo (-): Se colocan células al azar del panel de donantes. Pozos (1-22): Representan los lugares en los cuales se colocan las células del panel.						

Fuente: Esquema elaborado en el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS – UMSA por el Dr. Fernando Sosa.

a) Control de calidad del PRA porcentual

El control de calidad utilizado para la prueba del PRA porcentual, es de las mismas características utilizadas en el Cross-match, tanto su obtención, titulación y conservación antes de ser usados previamente, pero se debe tomar en cuenta que cada placa tiene sus controles positivos y negativos correspondientes.

5. TECNICA DE ANTICUERPOS REACTIVOS A PANEL DE CELULAS ESPECIFICO Quik ID Class I (PRA ESPECÍFICO):

En esta técnica primero se atemperó los reactivos, a continuación se preparo 140 ml del buffer de lavado (14 ml del buffer concentrado + 126 ml de H₂O). Luego se procedió a diluir la muestra de suero del paciente de la siguiente manera: 550 ul del suero del paciente + 1650 ul del diluyente de muestra que esta listo para usar y los controles se diluyeron de la siguiente manera:

REACTIVO	PARA 1 MUESTRA	PARA 2 MUESTRAS
CONTROL NEGATIVO	75 ul	150 ul
Diluyente de muestra	<u>225 ul</u>	<u>450 ul</u>
	300 ul (total)	600 ul (total)
CONTROL POSITIVO	17,5 ul	35 ul
Diluyente de muestra	<u>52,5 ul</u>	<u>105 ul</u>
	70 ul (total)	140 ul (total)

Las placas de ELISA que vienen en el Kit, cada una es para dos pacientes por tanto se protegió las tiras que no se utilizaron en la placa, se coloco a los pocillos 250 ul de la solución de lavado y se incubó de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Luego del tiempo transcurrido se secaron los pocillos sobre un papel absorbente, a continuación se añadió 50 ul de la muestra, 50 ul de los controles previamente diluidos a cada pocillo y se incubó de 40 a 45 minutos en una estufa a 37°C, la

muestra también se incluye al pocillo NA. (Excepto al designado como blanco). De acuerdo con el siguiente esquema.

N = Control Negativo

P = Control Positivo

B = Blanco

NA = No Antigeno

Letras para los colores:

Y = Amarillo

G = Verde

B = Azul

P = Púrpura

R = Rojo

O = Anaranjado

	Y	G	B	P	R	O
A	1	9	17	25	33	N
B	2	10	18	26	34	N
C	3	11	19	27	35	N
D	4	12	20	28	36	N
E	5	13	21	29	37	P
F	6	14	22	30	38	NA
G	7	15	23	31	39	B
H	8	16	24	32	40	B
	1	2	3	4	5	6

Luego de la incubación se procedió con los lavados de 3 a 4 veces, con 250 ul del buffer de lavados, secándose en un papel absorbente e inmediatamente, se preparó el conjugado de la siguiente manera: Se tomo 25 ul del conjugado y se agrego 2.475 ul del diluyente de muestra (1/100); una vez preparado se añadió 50 ul del conjugado a cada pocillo (Excepto al designado como blanco), y se incubó de 40 a 45 minutos en una estufa a 37°C, luego se procedió a realizar un nuevo lavado de la misma forma que la anterior de 3 a 4 veces, con 250 ul del buffer de lavados, secándose con un papel absorbente. Previamente el substrato del conjugado se preparó de la siguiente manera: se disolvió el p-nitrofenil fosfato (PNPP), liofilizado en 500 ul de agua destilada desionizada; luego se tomo 50 ul del PNPP diluido y se le agrego 4950 ul del buffer del substrato (1/100), y se procedió a protegerlo de la luz. Una vez preparado se sembró 100 ul de la solución de p-nitrofenil fosfato (PNPP) diluida a todos los pocillos excepto al designado como blanco, se incubo en la obscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente una vez terminado el tiempo de incubación, se añadió 100 ul de la solución de parada a todos los pocillos incluyendo al pocillo blanco, finalmente se hizo la lectura a la absorbancia de 405 ó 410 nm, usando un

filtro de referencia de 490 nm, cuando no se realiza la lectura en el instante se mantiene la placa en la oscuridad no por más de 30 minutos.

a. CONTROL DE CALIDAD DEL PRA-ESPECIFICO HLA - CLASE I

El Kit tiene sus propios controles de calidad interno que presenten las siguientes características:

El control negativo debe dar una densidad óptica (D.O.) \leq a 0,225

El control positivo debe dar un densidad óptica (D.O.) \geq a 0,900

b. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

La obtención e interpretación de los resultados se realizó primeramente con el cálculo del valor de cut-off de la siguiente manera:

Promedio de los controles negativos Factor de ajuste
(A, B, C & D de la tiras naranjas x 2 x del background = Valor del cut-off por cada pozo

El factor de ajuste de Background, varia de acuerdo a la tipificación HLA clase I que se les realizó a los 40 donantes con características de inclusión definidas por el fabricante del producto, y que es característico de cada uno los cuales están distribuidos en cada pozo; es decir que los Antigenos específicos de cada donante están pegados en la base de los pocillos de la placa, cuyo detalle de la tipificación se encuentra en anexos, una vez realizado el cálculo para cada factor, se coloca en la tabla los valores de las lecturas en la columna de muestra, luego se procede a realizar el calculo de diferencia que es la muestra menos el cutt-off, estos resultados se colocan en la columna de diferencia que se encuentra a lado de la columna de la muestra, procedemos a realizar un análisis de cada uno, si el valor de diferencia es

mayor a la del cutt-off, se considera como una muestra positiva; es decir que ese paciente se encuentra sensibilizado contra esos antígenos específicos, el cual debemos a su vez analizar los grupos de reacción cruzada. Una vez analizado estos resultados realizamos también el cálculo del porcentaje del PRA, para anticuerpos del isotipo IgG, según la siguiente formula:

$$\% \text{ PRA} = \frac{\text{\# de resultados positivos}}{\text{\# de pozos que contienen Antígenos HLA clase I}} \times 100 \%$$

J. Análisis estadístico:

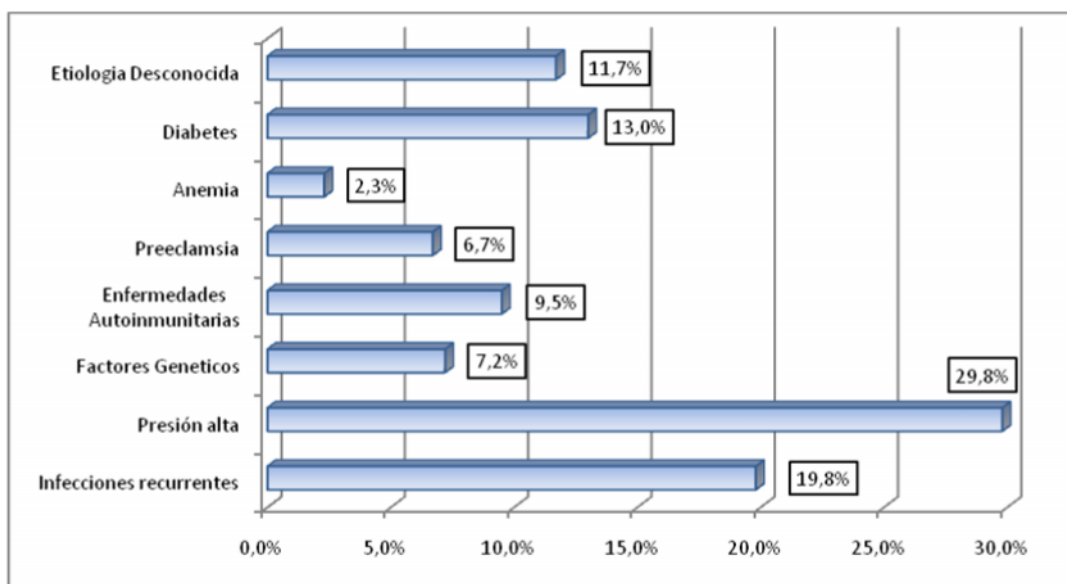
Para el análisis de procedimientos estadísticos, se utilizó la estadística descriptiva.

VIII. RESULTADOS.

La población que solicitó Prueba Cruzada (Cross Match) durante el periodo de tiempo del estudio fue de 222 pacientes, de los cuales 27 dieron resultados positivos, pero sólo incorporaron a este estudio todos los pacientes que asistieron al laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética solicitando la realización de la prueba PRA los cuales fueron un total de 12 pacientes con antecedentes de sensibilización.

GRAFICO 1.

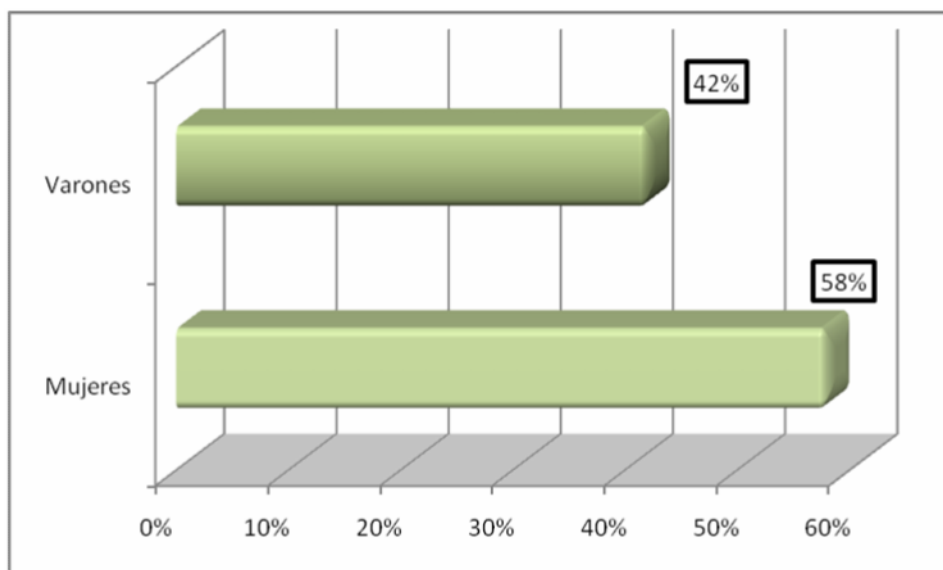
Etiología de la insuficiencia renal crónica en receptores de trasplante renal, que asistieron al instituto seladis, del 2005 al 2007.



La Insuficiencia Renal Crónica (IRC), es una enfermedad terminal que afecta a cualquier persona, la misma puede ser originada por muchos factores y de la población total que solicitaron la prueba cruzada se observó mayor frecuencia en los siguientes casos: presión alta con el 29.8%, las infecciones recurrentes con 19.8%, la diabetes con el 13.0% y muchas de las personas desconocen el origen de la patología que es equivalente al 11.7%.

GRAFICO 2.

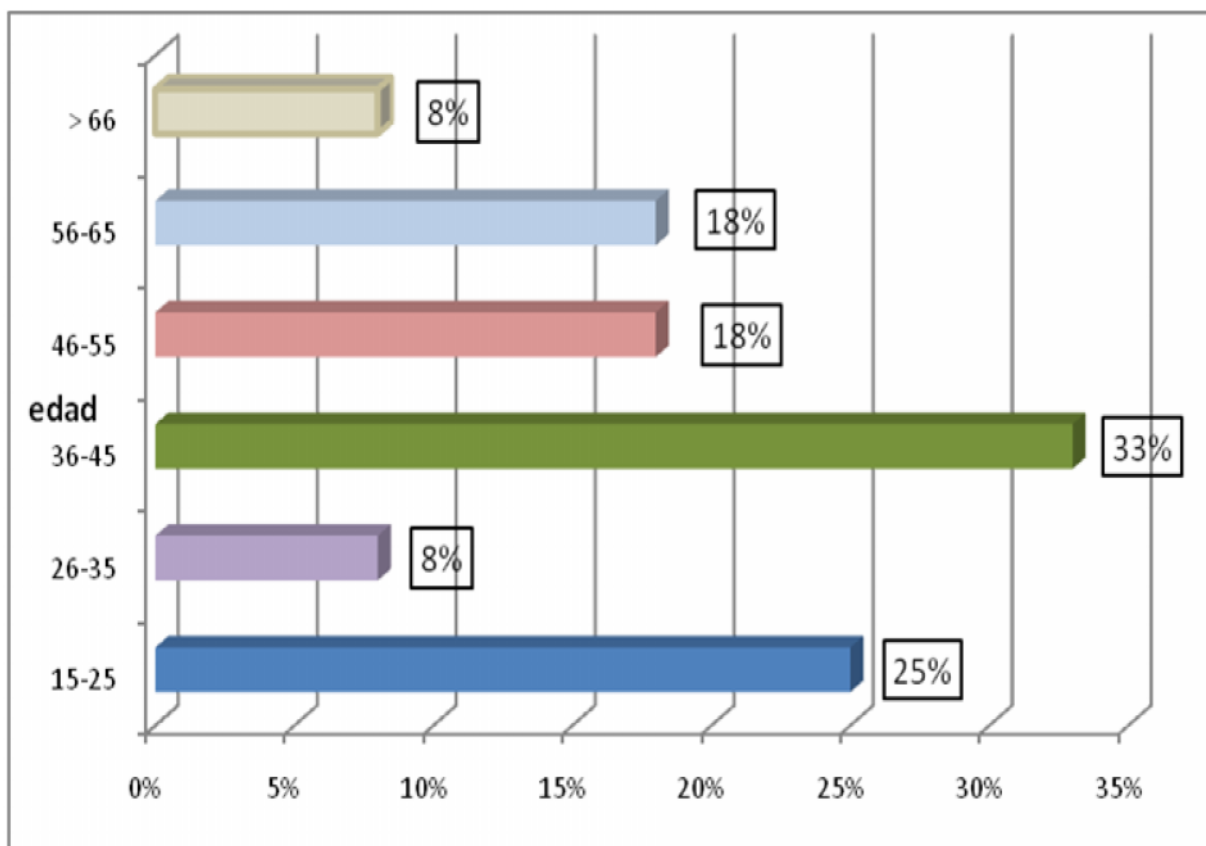
Distribución del género en pacientes que solicitaron la prueba de Reacción cruzada, en el Instituto SELADIS, del 2005 al 2010.



En el gráfico 2 se observó la diferencia en relación a la frecuencia con respecto al género donde la proporción es de 7:5 entre mujeres y hombres, población determinada del total de pacientes que solicitaron la prueba de reacción cruzada de un total de 222 receptores.

GRAFICO 3

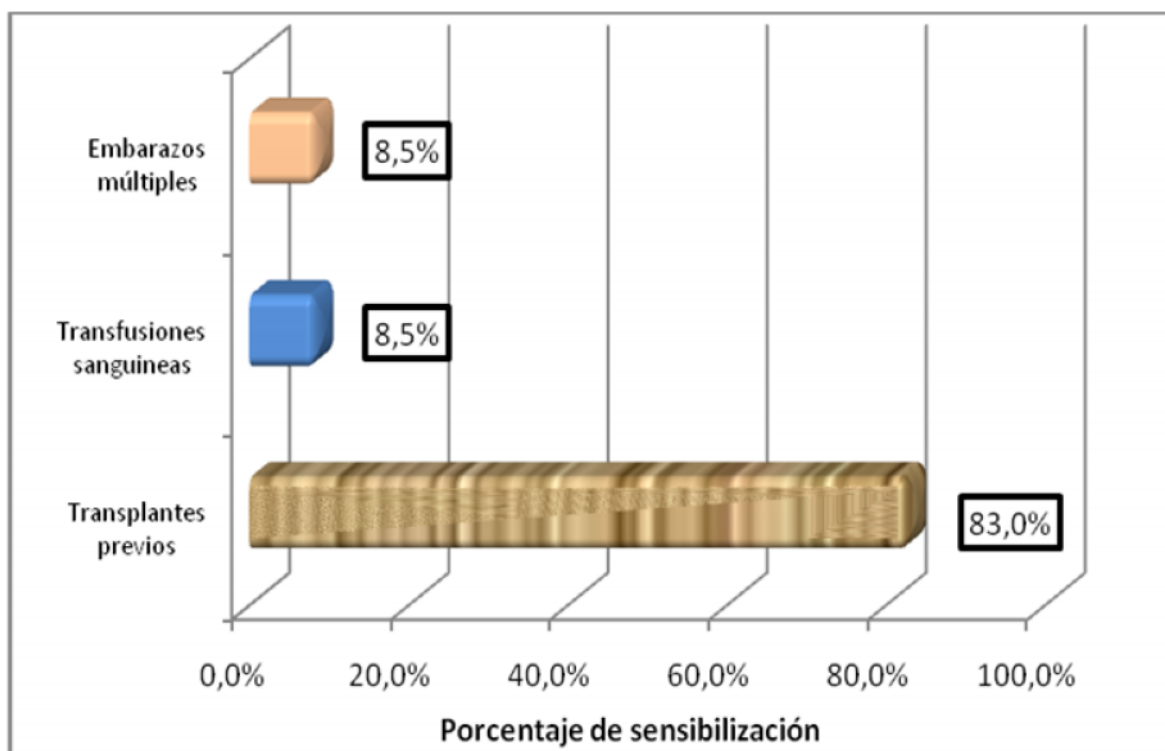
Distribución etérea de los pacientes sensibilizados que asistieron y solicitaron la prueba de Reacción Cruzada en el Instituto SELADIS, del 2005 al 2010.



En el gráfico 3 se muestra el intervalo de edad más frecuente de pacientes sensibilizados que se encuentra en el rango de 36 a 45 años.

GRAFICO 4.

Grado de sensibilización en pacientes con antecedentes de embarazos múltiples, transfusiones sanguíneas y trasplantes previos en pacientes que asistieron al instituto seladis, del 2005 al 2010



En el gráfico 4; se muestran los porcentajes de sensibilización que pueden presentar los pacientes sensibilizados ya sea por transfusiones, embarazos y trasplantes previos en la cual se destaca que los pacientes que han hecho rechazo al primer trasplante tienen un mayor grado de sensibilización. Los datos plasmados en el gráfico son de 27 pacientes que presentaban Cross- Match positivo.

En la tabla 1 y 2 se muestran de manera general el porcentaje de sensibilización obtenido por todos los pacientes involucrados en este estudio indistintamente de la causa de sensibilización en el cual se destacan 2 casos (Paciente 2 y Paciente 10) en los cuales se ha obtenido altos porcentajes de sensibilización, PRA% del 97% y 89% respectivamente.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para el porcentaje de sensibilización debido a la presencia de anticuerpos de tipo IgG. En el cual se han clasificado como fuertemente positivos “+++” para IgG (% de mortalidad mayor a 80%); positivos “++” (% de mortalidad de 60-80%); débilmente positivo “+” (% de mortalidad 40-60%) y dudoso “+/-” (% de mortalidad 20-40%).

En cuanto al análisis de los resultados fuertemente Positivos “+++” se obtuvo 3 casos en lo que había un porcentaje de positividad mayor a 8% de positividad con un promedio general para todos los pacientes de 2.9%.

En cuanto a los resultados positivos “++” de todos los pacientes participantes en el estudio, todos presentaban un promedio de 19% de positividad con valores extremos de 2% y 38%.

En cuanto a los resultados débilmente positivos “+” de todos los pacientes participantes en el estudio se obtuvo un promedio de positivos de 13% con valores extremos de 0% y 25%.

En cuanto a los resultados dudosos “+/-” de todos los pacientes participantes en el estudio se obtuvo un promedio de 12% entre los cuales se destaca el paciente 2 que presentaba un 60% de resultados dudosos para IgG.

TABLA 1

INMUNOGLOBULINA DE TIPO IgG										
Código	CAUSA DE SENSIBILIZACION	Nro (D)	Género	% DE SENSIBILIZACION TOTAL	% DE NEGATIVIDAD (-)	FUERTEMENTE POSITIVO (+++)	POSITIVO (++)	DEBILMENTE POSITIVO (+)	DUDOSO (+/-)	IgG TOTAL
1	Transfusiones	60	M	55%	45%	0%	17%	0%	0%	17%
2	Rechazo previo	35	F	97%	3%	0%	34%	0%	60%	94%
3	Rechazo previo	35	F	53%	47%	0%	24%	0%	11%	35%
4	Rechazo previo	30	M	73%	27%	0%	37%	22%	4%	63%
5	Rechazo previo	60	F	63%	37%	9%	15%	25%	8%	56%
6	Rechazo previo	60	M	59%	41%	0%	25%	13%	3%	41%
7	Rechazo previo	60	M	63%	37%	0%	19%	20%	8%	47%
8	Rechazo previo	60	F	37%	63%	0%	5%	8%	14%	27%
10	Rechazo previo	60	M	89%	8%	18%	38%	21%	6%	83%
11	Rechazo previo	60	F	37%	63%	0%	2%	10%	13%	25%
12	Rechazo previo	60	F	65%	45%	8%	12%	20%	5%	45%
9	Embarazos múltiples	60	F	43%	56%	0%	2%	15%	10%	27%
				61%	39%	3%	19%	13%	12%	

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para el porcentaje de sensibilización debido a la presencia de anticuerpos de tipo IgM, en el cual se han clasificado como fuertemente positivo para IgM (+++) {% de mortalidad mayor a 80%}; positivo (++){% mortalidad 60 a 80 %}; Débilmente positivo(+){% de mortalidad de 40 a 60%}; y Dudoso(+/-){% de mortalidad de 20 a 40 %}.

En cuanto a los resultados Fuertemente positivos (+++) de todos los pacientes participantes en el estudio, ninguno presentó positividad en este nivel.

En cuanto a los resultados positivos (++) de todos los pacientes participantes en el estudio, se obtuvo sólo en 4 en los que había un porcentaje mayor a 3% de positividad con un promedio de 2.2%.

En cuanto a los resultados débilmente positivos (+) de todos los pacientes participantes en el estudio se obtuvo sólo 6 en los que había un porcentaje mayor a 2% de positividad con un promedio de 2.0%.

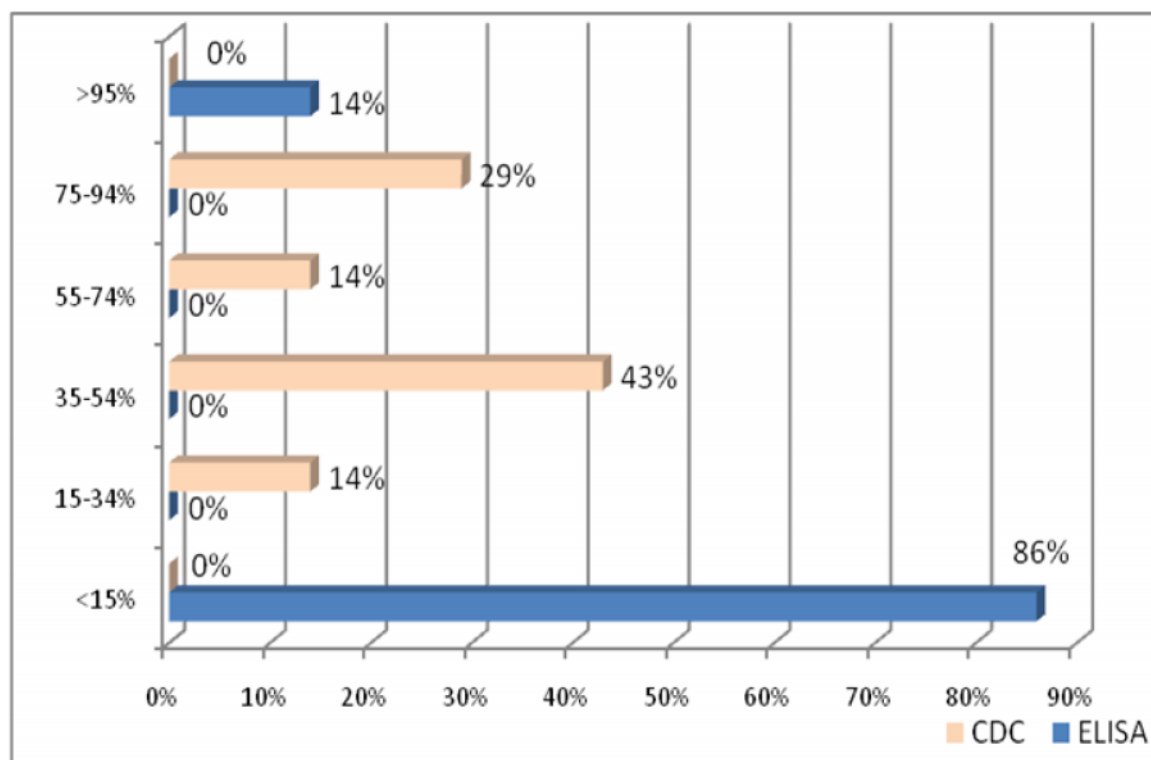
En cuanto a los resultados dudosos (+/-) de todos los pacientes participantes en el estudio se obtuvo sólo 10 en los que había un porcentaje mayor al 3 % con un promedio de 9.0%.

TABLA 2

Porcentaje de sensibilización con Anticuerpos IgM a través de la prueba de Anticuerpos Reactivos a Panel (PRA)										
Código	CAUSA DE SENSIBILIZACION	Nro de células en el panel (D)	Género	% DE SENSIBILIZACION TOTAL	% DE NEGATIVIDAD (-)	FUERTEMENTE POSITIVO (+++)	POSITIVO (++)	DEBILMENTE POSITIVO (+)	DUDOSO (+/-)	IgM TOTAL
1	Transfusiones	60	M	55%	45%	0%	10%	13%	15%	38%
2	Rechazo previo	35	F	97%	3%	0%	0%	0%	3%	3%
3	Rechazo previo	35	F	53%	47%	0%	3%	0%	15%	18%
4	Rechazo previo	30	M	73%	27%	0%	0%	0%	0%	10%
5	Rechazo previo	60	F	63%	37%	0%	5%	2%	0%	7%
6	Rechazo previo	60	M	59%	41%	0%	8%	2%	8%	18%
7	Rechazo previo	60	M	63%	37%	0%	0%	0%	16%	16%
8	Rechazo previo	60	F	37%	63%	0%	0%	3%	7%	10%
10	Rechazo previo	60	M	89%	8%	0%	0%	0%	6%	6%
11	Rechazo previo	60	F	37%	63%	0%	0%	2%	10%	12%
12	Rechazo previo	60	F	65%	45%	0%	0%	5%	15%	20%
9	Embarazos múltiples	60	F	43%	56%	0%	0%	0%	17%	17%
				61%	39%	0%	2%	2%	9%	

GRAFICO 5.

Intervalos de porcentaje de correlación entre ambas técnicas para la detección de anticuerpos del isotipo IgG en pacientes sensibilizados, que asistieron al Instituto SELADIS, 2005 al 2010

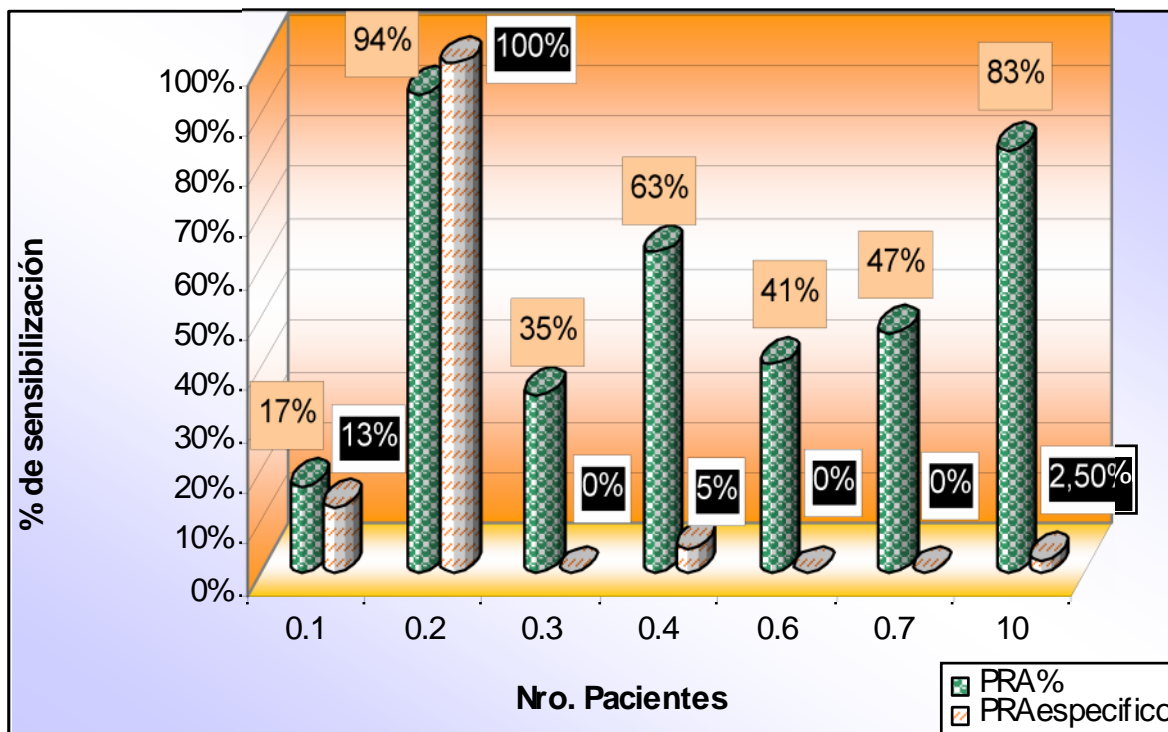


RANGO DE SENSIBILIZACION	ELISA (IgG)	CDC (IgG)
< 15%	86%	0%
15% - 34%	0%	14%
35% - 54%	0%	43%
55% - 74%	0%	14%
75% - 94%	0%	29%
> 95%	14%	0%
TOTAL	100%	100%

En el gráfico 5, se puede observar que no existe correlación de ambas técnicas del CDC y ELISA, por tanto no existe significancia estadística ($p > 0,05$), es decir que no se podría comparar ambas técnicas, al menos que se realice modificaciones en la técnica de CDC.

GRAFICO 6.

Porcentaje de sensibilización en los pacientes detectados por ambos métodos: El método del complemento (CDC) y el método del ensayo inmunoenzimático (ELISA), por cada paciente sensibilizado, durante el 2005 al 2010.



En el Grafico 6 se muestran los resultados obtenidos por ambos métodos (citotoxicidad dependiente de complemento y el método inmunoenzimático) en los cuales se observaron que de los 7 pacientes PRA% y PRA-especifico al mismo tiempo sólo en 2 casos ha existido correlación (Paciente 1 y Paciente 2) y en los otros 5 hubo una diferencia significativa entre los resultados obtenidos por ambos métodos.

TABLA 3

Epítopes involucrados en el proceso de sensibilización en el paciente 1 con características de múltiples transfusiones sanguíneas.

Epítopes del 7C	Epítopes del 8C	Epítopes del 12 C	Epítopes de grupo		
B13	13			27 p	
B60	40			27 p	
B61	40			27 p	
B47	47			27 p	
B8	8		7p		
B59	8		7p		
B41	41		7p		
B48	48		7p		
B81	7		7p		
	B8	8	7p	8p	
		B41	41	7p	12p
		B60	40	7p	12p

En la presente tabla se observa los epítopes a los cuales se ha sensibilizado el paciente 1, después de las múltiples transfusiones sanguíneas ya que los paquetes completos transfundidos presentan plaquetas que expresan Antígenos HLA clase I. Y se realizó el análisis para determinar hacia que Antígenos HLA estaban dirigidos los Anticuerpos involucrados en el proceso de sensibilización. Para el paciente 1 se determinó que los anticuerpos estaban dirigidos contra los Antígenos del grupo CREG 7C especialmente los determinantes antigénicos denominados 7p y 27p, los mismos son posiciones antigénicas del HLA que poseen estos determinantes. En este paciente el PRA porcentual fue de 17% y PRA específico de 13%.

TABLA 4.

Epítopes involucrados en el proceso de sensibilización en el paciente 2 con características de rechazo previo de transplante.

Epítopes Bw4	A23, A24,A25, A32 B13, B27, B37, B38, B44, B47, B49, B51, B52, B53, B57, B58, B59, B63, B77.
Epítopes Bw6	B7, B8, B18, B35, B39, B41, B42, B45, B46, B48, B50, B54, B55, B60, B61, B62, B64, B65, B67, B71, B72, B73, B75, B76, B78, B81, B82.

Se realizó el análisis para determinar hacia que Antígenos HLA estaban dirigidos los Anticuerpos involucrados en el proceso de sensibilización .Para el paciente 2 se determinó que los anticuerpos estaban dirigidos contra los Epítopes Bw4 y Bw6. En este paciente el PRA porcentual fue de 94% y PRA específico de 100%.

TABLA 5.

Epítopes involucrados en el proceso de sensibilización en el paciente 4 con características de rechazo previo de trasplante.

Epítopes del 7 CREG		Epítope de grupo		
B60	40	27p		
Epítopes del 12 CREG		Epítope de grupo		
B37	37	12p	5p	
B60	40	12p		7p

Se realizó el análisis para determinar hacia que Antígenos HLA estaban dirigidos los Anticuerpos involucrados en el proceso de sensibilización. Para el paciente 4 se determinó que los anticuerpos estaban dirigidos contra los Antígenos del grupo CREG 7C y 12 C especialmente los determinantes antigénicos denominados 7p, 12p y 27p y cuyos antígenos HLA que poseen estos determinantes son los observados en la tabla superior. En este paciente el PRA porcentual fue de 63% y PRA específico de 5%.

TABLA 6

Epítopes involucrados en el proceso de sensibilización en el paciente 10 con características de rechazo previo de trasplante.

Epítopes del 2 CREG		Epítope de grupo		
A2	2	9p	28p	
A24	9	9p		
Epítopes del 1 CREG		Epítope de grupo		
A24	9	9p	1p	
Epítopes del 7 CREG		Epítope de grupo		
B48	48			7p
Epítopes del 8 CREG		Epítope de grupo		
B65	14		8p	

Se hizo el análisis para determinar hacia que Antígenos HLA estaban dirigidos los Anticuerpos involucrados en el proceso de sensibilización. Para el paciente 10 y se determinó que los anticuerpos estaban dirigidos contra los Antígenos del grupo CREG 1C, 2C, 7C y 8C especialmente los determinantes antigénicos denominados 9p antígenos HLA que poseen determinantes descritos en la tabla superior. En este paciente el PRA porcentual fue de 83% y PRA específico de 2.5%.

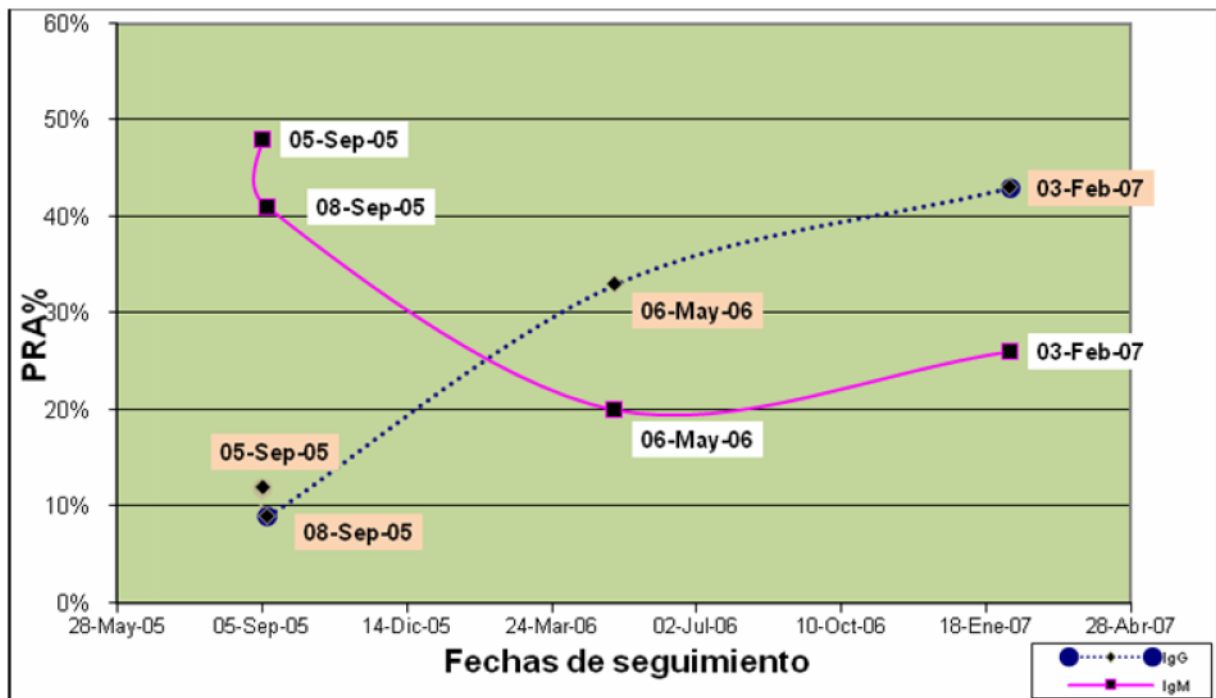
TABLA 7.

Seguimiento del comportamiento de los niveles de anticuerpos preformados en el proceso de sensibilización por transfusiones en el caso del paciente 1 por el PRA porcentual.

PACIENTE	FECHA	IgG	IgM	%Sensibilidad Total
1	05-sep-05	12%	48%	60%
1	08-sep-05	9%	41%	50%
1	06-may-06	33%	20%	53%
1	03-feb-07	43%	26%	68%

GRAFICA 7.

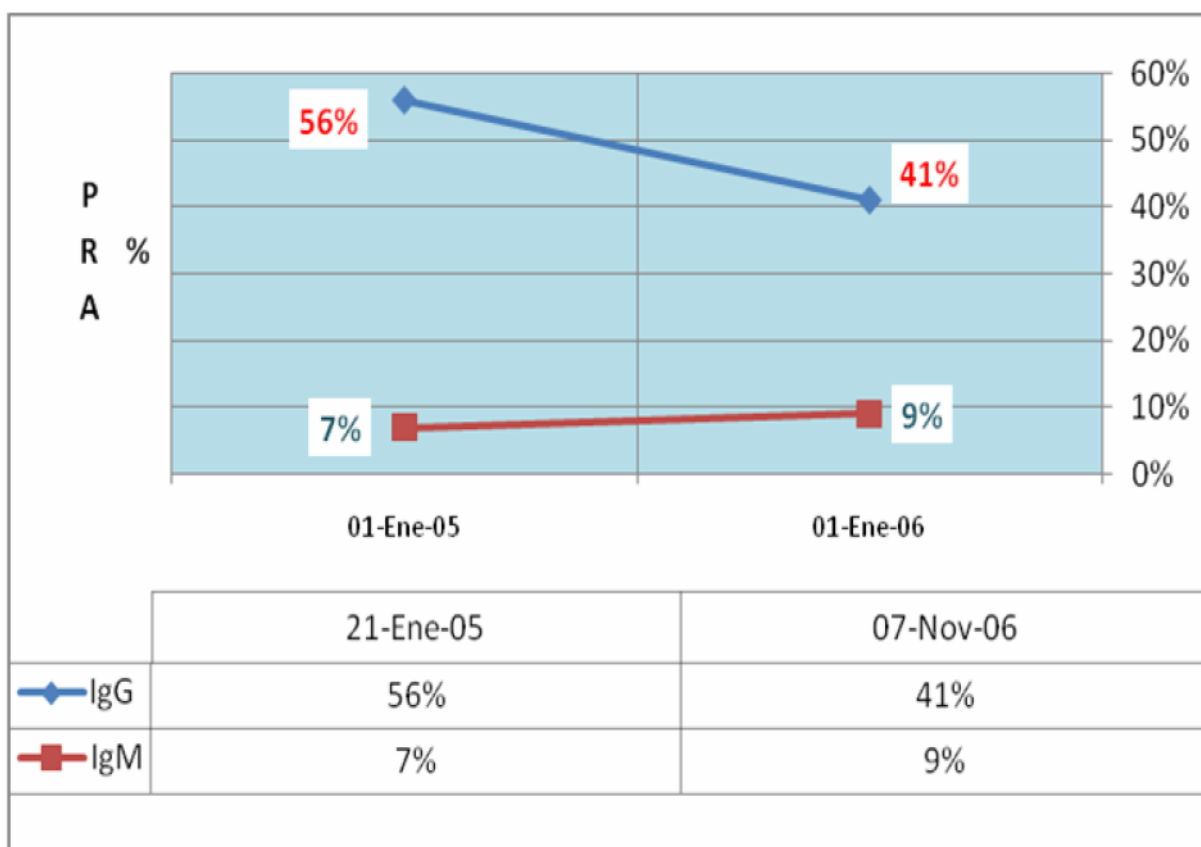
Control del porcentaje de anticuerpos preformados en el paciente 1 desde el 2005 al 2007



Se realizó un análisis del control del nivel de anticuerpos preformados de los isotipos IgG e IgM por la técnica del PRA%, en el proceso de sensibilización por transfusiones sanguíneas durante el seguimiento del paciente 1.

GRAFICO 8.

Seguimiento del comportamiento de los niveles de anticuerpos preformados en el proceso de sensibilización por rechazo previo de transplante en el caso del paciente 5 por el PRA porcentual.



Se realizó un análisis del control de nivel de anticuerpos preformados de los isotipos IgG e IgM por la técnica del PRA%, en el proceso de sensibilización por rechazo previo de transplante en el seguimiento del paciente 5

IX. DISCUSION

El trasplante renal mejora la calidad de vida de los receptores renales, ya que permite una recuperación del estado endocrino y función renal. En Europa se han reportado alrededor de 2000 receptores de trasplante renal con Anticuerpos Reactivos a Panel (PRA) mayor al 15% lo que impide que estos pacientes puedan acceder a un trasplante. ⁽⁴²⁾ De acuerdo a datos proporcionados por el Ministerio de Salud y Deportes, en Bolivia los valores de casos con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) se están incrementando debido a varios factores desencadenantes como ser la presión alta, infecciones recurrentes, diabetes, enfermedades autoinmunitarias, factores genéticos, pre-eclampsia, anemia y etiología desconocida.

El trasplante renal se hizo factible, aunque hubo trabajos experimentales previos, a partir de 1954, cuando se realizó el primer trasplante con éxito en Boston entre gemelos idénticos ^(43,44), y en procesos posteriores, con refinamientos de la técnica y la inmunosupresión se logró emplear donantes no necesariamente idénticos, así como la utilización de órganos de donante cadáver. Pero, debemos tomar en cuenta que los esquemas de inmunosupresión que se deben utilizar son de costo muy elevado no todos los pacientes tienen la posibilidad de acceder a los mismos. Por tanto, la mayoría de estos pacientes prefieren optar por seguir con sus hemodiálisis hasta que el porcentaje de anticuerpos disminuya en forma natural.

Hoy en día el 30% de los trasplantes se está realizando con donante vivo, debido principalmente por la escasez de órganos (riñones). Y se observó que menos del 25% de los posibles donantes cadavéricos pueden ser utilizados, debido a diferentes factores como ser socioeconómicos, culturales y religiosos, y a través de la comunicación verbal del Dr. Vaca Diez, Santa Cruz-Bolivia, se hace cada vez difícil encontrar donantes de órganos

Actualmente se esta motivando en algunos centros el empleo de donante vivo no emparentado analizando ampliamente el gabinete de pruebas clínicas y laboratoriales correspondientes para acortar el tiempo de espera delos receptores.

Por otro lado el seguimiento de acuerdo a lo establecido por el Ministerio de Salud y Deportes (MSD) sugiere que los donantes deben ser constantemente controlados a largo plazo debido a que estos donantes presentan hipertensión arterial ⁽⁴⁹⁾, los donantes hipertensos no deberían ser escogidos como donantes por que antes y después de la nefrectomía pueden sufrir alteraciones ⁽⁵⁰⁾, se debe tomar en cuenta muchos factores para elegir un donante adecuado. En nuestro medio aun se debe concientizar a las personas para ser donantes por tanto debe realizarse un arduo trabajo de Promoción y Prevención con respecto a la IRC.

Recientemente es una práctica habitual el trasplante renal para asignar los órganos a receptores sin tener en consideración el grado de compatibilidad HLA sólo con el cross-match.

La probabilidad al azar de aceptación de un injerto renal es extremadamente baja, debido al alto polimorfismo del sistema HLA. Por ello, el análisis de los resultados del trasplante renal en relación al grado de compatibilidad debe ser meticuloso obrando con destreza y conocimiento acerca del Sistema Antígeno leucocitario Humano sugiriendo actualizaciones constantes del personal para la interpretación de los resultados obtenidos.⁽⁵¹⁾

Entre las causas más poderosas y duraderas de sensibilización a los antígenos HLA están el embarazo y el hecho de que un injerto previo hubiese sido rechazado inmunológicamente en menos de un año. Las transfusiones son, en general, menos potentes en sentido del proceso de sensibilización, aunque estas fueron más numerosas antes del uso de la eritropoyetina, pero si se superponen a un embarazo anterior o a un temprano rechazo inmunológico del injerto, lo que puede potenciar enormemente el grado de sensibilización.⁽⁵³⁾

En 1989 en Canadá en el hospital central de cirugía, hubo una supervivencia del injerto menor a 45 días en la cual el antígeno incompatible fue duplicado junto con

un cross-match positivo y actual negativo fue para el receptor catastrófico debido a la presencia de autoanticuerpos clase II (HLA-DR) generados en el primer trasplante. Se debe realizar en todos los centros de tipificación un control de calidad interno y externo en relación a las técnicas aplicadas donde deberá ser una exigencia realizar el PRA-específico Clase I y II. ⁽⁵⁴⁾

En el presente estudio la causa más frecuente (29,8%) de Insuficiencia Renal Crónica Terminal (IRCT) para la solicitud del cross-match fue la presión alta. Entre las causas secundarias se pueden mencionar las infecciones recurrentes (19,8%), cuyas causas pudieron ser infecciones mal curadas como ocurre con las causadas con las faringitis y/o resfriados, además de infecciones constantes de tipo urinaria y/o genital, que se reactivan en forma constante. Seguida de las infecciones la Diabetes tipo II también genera IRTC en 13% según los datos otorgados por el Programa Nacional de Salud Renal del Ministerio de Salud y Deportes.

En nuestra población el 9,5% de las insuficiencias renales son causadas por enfermedades autoinmunitarias como es el caso del LES. El 7,2% son caracterizados por su etiología genética como en los quistes renales. El 6,7% se ha detectado en mujeres que han sufrido pre eclampsia (directamente relacionada con la presión alta) y otro factor en la anemia con el 2,3%. Sin embargo, se desconoce la causa de la IRTC en un 11,7%.

En cuanto a la frecuencia de IRTC en los dos géneros, se presenta una diferencia **estadísticamente significativa** en mayor incidencia en mujeres (58%), esta sensibilización indica que las mujeres son más predispuestas debido a diferentes factores como ser los múltiples embarazos (considerando al feto un injerto), la presencia de Antígenos HLA-Clase I en los espermatozoides, provocaría la producción de anticuerpos. Por otro lado se debe tomar en cuenta que las mujeres sufren cambios hormonales desde el momento en que se inicia su ciclo menstrual y en edad avanzada, la menopausia.

Respecto al género masculino el 40%, es un elevado porcentaje, de la misma manera podría deberse a infecciones mal curadas y/o constantes, prostatitis no identificada a tiempo que puede ocasionar daño a nivel renal hasta llegar a IRC.

En resumen, se debe tomar en cuenta que los trasplantes previos son mas sensibilizantes que las trasfusiones sanguíneas y embarazos múltiples, esto debido al rechazo cronico que podria lograrse al existir una compatibilidad de 50% a 75%, esto sugiere la existencia de Antígenos extraños en el nuevo órgano que ocasionarían la producción de Anticuerpos en forma tardía o aguda dependiendo de la expresión antigénica.

En cuanto a la edad de los pacientes que solicitaron la prueba cruzada se observó una mayor frecuencia de sensibilización en el intervalo de 36 a 45 años de edad, que representa una etapa activa y productiva de las personas.

En la tabla 1, se denota que principal causa de sensibilización en relación a la producción del isotipo IgG es el rechazo previo a anterior transplante, seguido de transfusiones y embarazos múltiples, todos estos casos presentan porcentajes de sensibilización mayores del 15% (el máximo limite establecido para optar un transplante según ASHI), observándose un rango de 37 a 97%, estos mismos resultados se obtuvieron en estudios previos con mayor tamaño poblacional (J.M.^a Hospital de Barcelona.2008). La alta sensibilización puede deberse a que el ensayo cross match esté captando anticuerpos anti-HLA y no HLA, lo que sobredimensionaría estos resultados, por otro lado, también la manutención de niveles séricos de anticuerpos de fase crónica por largos periodos (20 años). Estos altos valores de sensibilización darían lugar a sugerir la no intervención ya que provocaría un rechazo hiperagudo.

Los valores de sensibilización obtenidos por el método Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC) no pueden correlacionarse porque los donantes no son tipificados (selección al azar) y el método Ensayo Inmunoenzimatico (ELISA) no guarda las frecuencias génicas propias del acervo genético de nuestra población, por lo que no se tipifican todos los alelos circulantes.

Según la tabla 2, se denota un rango de 37 a 97% de sensibilización por IgM que son Anticuerpos de fase aguda y están presentes un lapso de tiempo de 1 a 3 meses generalmente son provocados por infecciones o inflamaciones, por tanto es

necesario esperar aproximadamente este lapso de tiempo para realizar la prueba CDC ya que puede existir una equivocada interpretación de los resultados presentados debido representaría un sesgo en condiciones agudas.

En el análisis realizado con el paciente 1 se detectó anticuerpos preformados contra el grupo 7C (GRECs 7C) cuyos epítopes son el 7p y 27p, que pueden provocar una reacción de rechazo y se debería proceder a realizarse el PRA específico para determinar hacia los antígenos HLA a los cuales el paciente se ha sensibilizado y definir un adecuado donante con el cual no exista rechazo por la presencia de anticuerpos.

El seguimiento de porcentaje de anticuerpos de los isotipos IgG e IgM tanto para el paciente 1 y 5, presentaron una disminución lenta en el transcurso de 2 a 3 años, sólo del 5%, esto podría explicarse debido a que ambos pacientes a estado con constantes transfusiones sanguíneas debido a la anemia que presentan y también al porcentaje de anticuerpos detectado por tanto se deberá proceder con fuerte esquema inmunosupresor para que estos pacientes puedan optar a una mejor calidad de vida con un trasplante. En el caso del paciente 1 se observó que el porcentaje de anticuerpos hay estado en disminución en el lapso de los 2 años pero en el tercer control del PRA se ha visto una elevada producción de anticuerpos esto podría deberse a que el paciente se ha expuesto nuevamente a transfusiones sanguíneas.

En el paciente 4 y 10 se determino que los grupos de reacción cruzada que provocan la reacción de rechazo agudo o crónico pertenecen al 7C,8C,12C,1C,y 2C cuyos epítopes son el 9p,7p,8p,28p,12p y 27 p. Por tanto se debe tomar en cuenta esto cuando se realice la elección del donante.

En el paciente 2, analizado en la tabla 7 se detectaron anticuerpos contra epítopes Bw4 y Bw6 y se caracterizan por la posición de los aminoácidos en su estructura y acompañan a los diferentes alelos HLA-B, por lo que representa una sensibilización alta y siendo el mas polimórfico, el hallazgo de un donante es mas difícil y con la complicación de aplicación de esquemas de inmunosupresión mas enérgicos

IX. CONCLUSION

El valor diagnóstico de la prueba Anticuerpos reactivos a Panel ha demostrado su importancia, debido a que es capaz de proporcionar datos numéricos porcentuales del nivel de sensibilización del receptor por los diferentes factores desencadenantes. Pudiendo ser un parámetro útil en la decisión de trasplante, tomado como antecedentes las transfusiones sanguíneas, los múltiples embarazos y los previos trasplantes.

La población con mayor frecuencia de insuficiencia renal está en el rango de 36 a 45 años, edad en que las personas tienen mayor actividad económica, social y familiar. El género más afectado es el de las mujeres con el 58% que en su mayoría se ha observado que son afectadas por la presión alta de acuerdo a los datos obtenidos en el Instituto SELADIS en base a sus historias clínicas.

La prueba de Anticuerpos Reactivos a Panel (PRA) se justifica después de realizada la prueba del cross-match previo resultado positivo por la presencia de anticuerpos preformados indicativo de sensibilización y mal pronóstico para ir a trasplante renal.

De acuerdo a lo observado, no hay correlación entre los dos métodos aplicados para ser utilizados en la prueba del PRA: CDC y ELISA. Por lo que se sugiere establecer paneles de antígenos HLA de la población local, para determinar el acervo genético de los alelos involucrados en la sensibilización.

De acuerdo al seguimiento realizado en pacientes sensibilizados se ha observado que el comportamiento de los anticuerpos sólo tuvo una disminución del 5% en periodos de tiempo de 6 meses a un año por tanto no es suficiente para que vayan a trasplante y mejorar su calidad de vida.

XI. SUGERENCIAS

En el proceso del desarrollo del presente trabajo se ha observado que es de gran importancia la realización de estudios, donde se realicen la tipificación de nuestro acervo poblacional para determinar las características de cada lugar, y de esta forma poder encontrar donantes adecuados para receptores que necesitan de los mismos.

A su vez se debe realizar paneles de antígenos para la correcta determinación de los grupos de reacción cruzada y la adecuada determinación de la sensibilización de los pacientes hacia los antígenos públicos o privados de la población.

Se debe crear propuestas para poder solventar estas pruebas y ser de esta forma mas accesibles a todos aquellos que lo necesitan

X. BIBLIOGRAFIA

1. L. Sánchez. Introducción a la Histocompatibilidad Humana. 2007. p. 134-140
 2. F. Sosa. Análisis de Frecuencias de los Grupos de Reacción Cruzada de los Loci HLA-A y HLA-B presentes en la población atendida en el instituto SELADIS.
 3. Furth S., Neu A., Sullivan K., Gensler G., FivushB., Immunization practices in children with renal disease. *Pediatr Nephrol.* 2007. 11:443.
 4. Russell S., Current status of vaccines and immunoglobulins
 5. FivushB., Neu A.,: Immunization guidelines for pediatric renal disease. *Seminars in Nephrology.*2008. 18: 256
 6. Stevens C., Alter H, Taylor P, . Hepatitis B vaccine in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 2004. 311:496-501.
 7. American Academy of Pediatrics , Committee on Infectious Disease: Poliomyelitis prevention: Recommendations for use of inactivated poliovirus vaccine and live oral poliovirus vaccine. *Pediatrics.* 2007. 99:300-5.
 8. Linnerman C., First R., Risk of pneumococcal infections in renal transplant patients. *JAMA.* 2009. 241: 2619-21.
 9. Stark K., Neuhaus R., Linning S., Immunogenicity and safety of hepatitis A vaccine in liver and renal transplant recipients. *J Infect Dis.* 2009. 14: 61-5.
-

10. Crark G., Barrat M. Steroid –responsive nephrotic syndrome. In : Barrat M., Avner E., pediatric Nephrology 4^o Ed. Editorial Lippincott Williams & Wilkins Pennsylvania U.S.A. 2009, 749.
 11. Beer A., Kwak J., Immunology of normal pregnancy. Immunology and Allergy Clinics of North America. 2008; 18:249-327.
 12. Billingham RE., Medawar PB., Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature. 2007, 172:603-605.
 13. Salafia C. The Normal Placenta. Immune Anatomy and Function. Immunology and Allergy Clinics of North America. 2008. 18: 271-291
 14. Ober C. HLA and Pregnancy . The Paradox of the Fetal Allograft. American Journal of Human Genetics .2008. 62:1-5.
 15. Billingham RE, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature. 2007; 172:603-606.
 16. Beer A., Kwak J., Immunology of normal pregnancy. Immunology and Allergy Clinics of North America. 2008. 18:249-255
 17. Pernoll M. Diagnostico y tratamiento gineco-obstetricos. 6^a edicion. Editorial el Manula Moderno , S.A. DE C.V.2007. Capitulo 8.
 18. King A., Hiby S., Gardner L., et al. Recognition of Trophoblast HLA Class I Molecules By Decidual NK Cell Receptors –A Review. Trophoblast Research 2007. 14:81-85.
-

19. King A., Burrows T., Verma S., et al. Human Uterine Lymphocytes. Human Reproduction. 2008. 4:480-485.
 20. Abbas A., Lichtman A., Pober J. Cellular and Molecular Immunology, 4th edition, chapter 10 W.B. Saunders Company. 2007.
 21. Thellin O., Coumans B., Zorzi W, et al. Tolerance to the Foeto-Placental "Graft": Ten Ways to Support a child for nine months .American Journal of Reproductive Immunology. 2007. 35:348-351.
 22. Rouas-Freiss n, Marchal –Bras Goncalves R., et al. Direct Evidence to Support the Role of HLA –G in Protecting the fetus from Maternal Uterine Natural Killer Cytolysis . Proceedings of Natural Academy of Science USA. 2007 .94:1152-1155.
 23. Seaman W., Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells. Arthritis and Rheumatism. 2007, 43:1204-1210
 24. www. Tecnociencia. Especial trasplantes. 2007: 1-5.
 25. Patel R, Terasaki PI, Significance of de positive crossmatch test in kidney transplantation. N Engl J Med 2008. 280: 735.
 26. Jeannet M, Pinn VW, Flax MH. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. N Engl J Med .2007. 282:111.
 27. S. Dahan. Marqueurs du Complexe Majeur D'Histocompatibilite: Systeme HLA et BF. A propos d' une étude sur un échantillon de population bolivienne. 2007. p. 125-130
-

28. Buzon E., Inmunosupresión. Hospital universitario de Barcelona. 2007. 5: 1-5
 29. Buzon E., Inmunosupresión. Hospital universitario de Barcelona. 2007. 5: 1-5
 30. http://es.wikipedia.org/wiki/Linfocito_T_regulador
 31. Sanfilippo F, Goeken N, Niblack G, et al. The effect of first cadaver renal transplant HLA-A,B match on sensitization and retransplant rates following graft failure. *Transplantation* 2007; 42: 240.
 32. Fuggle Susan V, Martin Susan. Toward performing transplantation in highly sensitized patients. *Transplantation* 2007; 78: 2.
 33. United Network of Organ Sharing: Web address: [http:// www.unos.org](http://www.unos.org). Accesada en 2007.
 34. Reporte 2007 de la USRDS Renal Data Systems.
 35. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 2007; 280: 735.
 36. Ting A, Morris PJ. Successful transplantation with positive T and B cell crossmatch. *Tissue Antigens* 2007; 21: 219.
 37. Chapman JR, Taylor CJ, Ting A, et al. Inmunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches. Relationship to renal transplant outcome. *Transplantation* 2007; 42: 608.
-

- 38.** Pei R, Wang G, Tarsitani C, et al. Simultaneous HLA class I and class II antibody screening with flow cytometry. *Hum Immunol* 2008; 59: 313.
 - 39.** Pei R, Lee JH, Shih NJ, et al. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leucocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 2007; 75: 43.
 - 40.** Worthington JE, Robson AJ, Sheldon S, et al. A comparison of enzyme-linked immunoabsorbent assays and flow cytometry techniques for the detection of HLA specific antibodies. *Hum Immunol* 2008; 62: 1178.
 - 41.** Montgomery RA, Hardy MA, Jordan SC, et al. Consensus opinion from the antibody working group on the diagnosis, reporting, and risk assessment for antibody-mediated rejection and desensitization protocols. *Transplantation* 2007; 78: 2.
 - 42.** Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2007; 345: 747-55.
 - 43.** Jordan SC, Tyan DB. Intravenous gamma globulin (IVIg) inhibits lymphocytotoxic antibody in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 803.
 - 44.** Yadin O, Sekiya N, Ettenger R. Intravenous immunoglobulin (IVIg) reduces antibody responses in highly sensitized dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2007; 3: 887.
 - 45.** Glotz D, Haymann JP, Niaudet P, et al. Successful kidney transplantation of immunized patients after desensitization with normal human polyclonal immunoglobulins. *Transplant Proc* 2007; 27: 1038-9.
-

46. Glotz D, Haymann JP, Sansonetti N, et al. Suppression of HLA-specific alloantibodies by high-dose intravenous immunoglobulins (IVIg): a potential tool for transplantation of immunized patients. *Transplantation* 2007; 56: 335-7.
 47. Furth S., Neu A., Sullivan K., Gensler G., FivushB., Immunization practices in children with renal disease. *Pediatr Nephrol.* 2007. 11:443.
 48. Russell S., Current status of vaccines and immunoglobulins for children with renal disease . *Pediat Nephrol* 2008; 8:7-10.
 49. Stevens C., Alter H, Taylor P, . Hepatitis B vaccine in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 2007. 311:496-501.
 50. FivushB., Neu A.,: Immunization guidelines for pediatric renal disease. *Seminars in Nephrology.*2008. 18: 256
 51. American Academy of Pediatrics , Committee on Infectious Disease: Poliomyelitis prevention: Recommendations for use of inactivated poliovirus vaccine and live oral poliovirus vaccine. *Pediatrics.* 2007. 99:300-5
 52. Linnerman C., First R., Risk of pneumococcal infections in renal transplant patients. *JAMA.* 2009. 241: 2619-21
 53. Stark K., Neuhaus R., Linning S., Immunogenicity and safety of hepatitis A vaccine in liver and renal transplant recipients. *J Infect Dis.* 2009. 14: 61-5
 54. Crark G., Barrat M. Steroid –responsive nephrotic syndrome. In : Barrat M., Avner E.,*pediatric Nephrology* 4^o Ed. Editorial Lippincott Williams & Wilkins Pennsylvania U.S.A. 2009, 749
-

55. Buzon E., Inmunosupresión. Hospital universitario de Barcelona. 2007. 5: 1-5
 56. Beer A., Kwak J., Immunology of normal pregnancy. Immunology and Allergy Clinics of North America. 2008 ; 18:249-327
 57. Billingham RE., Medawar PB., Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature. 2007, 172:603-605
 58. Salafia C. The Normal Placenta. Immune Anatomy and Function. Immunology and Allergy Clinics of North America. 2008. 18: 271-291
 59. Ober C. HLA and Pregnancy . The Paradox of the Fetal Allograft. American Journal of Human Genetics .2008. 62:1-5
 60. Billingham RE, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature. 2007; 172:603-606
 61. Beer A., Kwak J., Immunology of normal pregnancy. Immunology and Allergy Clinics of North America. 2008. 18:249-255
 62. Pernoll M. Diagnostico y tratamiento gineco-obstetricos. 6ª edicion. Editorial el Manula Moderno, S.A. DE C.V.2007. Capitulo 8.
 63. King A., Hiby S., Gardner L., et al. Recognition of Trophoblast HLA Class I Molecules By Decidual NK Cell Receptors –A Review. Trophoblast Research 2007. 14:81-85.
 64. King A., Burrows T., Verma S., et al. Human Uterine Lymphocytes. Human Reproduction. 2008. 4:480-485
-

- 65.** Abbas A., Lichtman A., Pober J. Cellular and Molecular Immunology, 4th edition, chapter 10 W.B. Saunders Company. 2008
 - 66.** Thellin O., Coumans B., Zorzi W, et al. Tolerance to the Foeto-Placental "Graft": Ten Ways to Support a child for nine months .American Journal of Reproductive Immunology.2007. 35:348-351
 - 67.** Rouas-Freiss n, Marchal –Bras Goncalves R., et al. Direct Evidence to Support the Role of HLA –G in Protecting the fetus from Maternal Uterine Natural Killer Cytolysis . Procedures of Natural Academy of Science USA .2007 .94:1152-1155
 - 68.** Seaman W., Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells. Arthritis and Rheumatism. 2008, 43:1204-1210
 - 69.** www. Tecnociencia. Especial trasplantes. 2008: 1-5
 - 70.** Patel R, Terasaki PI, Significance of de positive crossmatch test in kidney trasplantation. N Engl J Med 2007. 280: 735.
 - 71.** Jeannet M, Pinn VW, Flax MH. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. N Engl J Med .2007. 282:111
-