



00544 N-2
2Ej
Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

División de Estudios de Posgrado

**"ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA CRUZADA POR
CITOMETRIA DE FLUJO Y DETECCION DEL ESTADO
DE PRESENSIBILIZACION EN NEFROPATAS"**

TESIS

Para obtener el diploma de

ESPECIALIZACION EN BIOQUIMICA CLINICA

Presenta: QFB. JOSE LUIS BAÑUELOS FLORES

**TESIS CON
FALLA DE CRISTAL**

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Luis A. Terán Ortiz, tutor de ésta tesis, por la oportunidad de integrarme al Departamento de Inmunología del I.N.E.R. y a la M. en C. Diana Lezcano Meza por la ayuda proporcionada para este trabajo.

Agradezco también la fina atención de los miembros del jurado para la revisión y discusión de esta tesis:

Presidente:	Dr. Jesús Guzmán G.
Primer vocal:	Dr. Renato Berrón P.
Secretario:	Dr. Fernando García T.
Primer suplente:	Dr. Rubén Darío Martínez P.
Segundo suplente:	Dra. Amparo Faure F.

TABLA DE ABREVIATURAS

Ac.	- anticuerpo
CDC	- citotoxicidad dependiente de complemento
CF	- citometría de flujo
DS	- desviación estándar
FITC	- isotiocianato de fluoresceína
FL1	- fluorescencia 1
HBAGs	- antígeno de superficie del virus de la hepatitis B
H	- cadena pesada de las inmunoglobulinas
HIV	- virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	- antígenos leucocitarios humanos
IgA	- inmunoglobulina A
IgG	- inmunoglobulina G
IgM	- inmunoglobulina M
L	- cadena ligera de las inmunoglobulinas
PBS	- amortiguador salino de fosfatos
PCCDC	- prueba cruzada por citotoxicidad dependiente de complemento
PCCF	- prueba cruzada por citometría de flujo
SFT	- suero fetal de ternera
v/v	- volumen a volumen

T A B L A S

TABLA 1.- RELACION PESO-ESTATURA EN LOS PACIENTES DE ESTUDIO.

TABLA 2.- RELACION DE LOS PACIENTES (8) CON ENFERMEDAD AUTO-INMUNE

TABLA 3.- RELACION DE PACIENTES CON FACTOR REUMATOIDE (IgM anti-IgG).

F I G U R A S

FIGURA 1.- REPRODUCIBILIDAD DEL SUERO CONTROL NEGATIVO.

FIGURA 2.- PRUEBA CRUZADA POSITIVA.

FIGURA 3.- TITULACION DE LA GAMMAGLOBULINA ANTI-Igs.

FIGURA 4.- TITULACION DEL SUERO.

FIGURA 5.- ESPECIFICIDAD PARA ANTICUERPOS ANTI-HLA.

FIGURA 6.- SUEROS CON ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

FIGURA 7.- SUEROS CON FACTOR REUMATOIDE.

G R A F I C A S

GRAFICA 1.- FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS TRANSFUSIONES. CITOTOXICIDAD.

GRAFICA 2.- FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS TRANSFUSIONES. CITOFUOROMETRIA.

GRAFICA 3.- FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR EN RELACION AL NUMERO DE EMBARAZOS. CITOTOXICIDAD.

GRAFICA 4.- FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR EN RELACION AL NUMERO DE EMBARAZOS. CITOFUOROMETRIA.

GRAFICA 5.- FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS EMBARAZO Y NUMERO DE TRANSFUSIONES. CITOTOXICIDAD.

GRAFICA 6.- FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS EMBARAZO Y NUMERO DE TRANSFUSIONES. CITOFUOROMETRIA.

- GRAFICA 7.- EFECTO DE LAS TRANSFUSIONES EN HOMBRES Y MUJERES. CITOTOXICIDAD.
- GRAFICA 8.- EFECTO DE LAS TRANSFUSIONES EN HOMBRES Y MUJERES. CITOFUOROMETRIA.
- GRAFICA 9.- FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS EDAD Y NUMERO DE TRANSFUSIONES. CITOTOXICIDAD.
- GRAFICA 10.-FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS EDAD Y NUMERO DE TRANSFUSIONES. CITOFUOROMETRIA.
- GRAFICA 11.-FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS FUENTES SENSIBILIZANTES. CITOTOXICIDAD.
- GRAFICA 12.-FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS FUENTES SENSIBILIZANTES. CITOFUOROMETRIA.
- GRAFICA 13.-FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS FUENTES SENSIBILIZANTES (REGRESION LINEAL). CITOTOXICIDAD.
- GRAFICA 14.-FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS FUENTES SENSIBILIZANTES (REGRESION LINEAL). CITOFUOROMETRIA.
- GRAFICA 15.-FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR. COMPARACION DE METODOS.
- GRAFICA 16.-COMPARACION DE METODOS POR LA PRUEBA DE DOS MUESTRAS DE KOLMOGOROV-SMIRNOV.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
OBJETIVOS.....	6
MATERIAL Y METODOS.....	7
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	14
RESULTADOS.....	15
ANALISIS ESTADISTICO.....	18
DISCUSION.....	19
CONCLUSIONES.....	23
BIBLIOGRAFIA.....	25

RESUMEN

Se estandarizó la prueba cruzada pretrasplante renal por CITOMETRIA DE FLUJO. Se utilizaron células linfoides de sangre periférica de un sujeto aparentemente sano sin antecedentes de inmunizaciones recientes, un suero de grupo AB como control negativo, una mezcla de sueros conteniendo anticuerpos citotóxicos anti-HLA y gamma globulina total antihumana de cabra (IgA, IgG, IgM, H y L) conjugada con fluoresceína (KPL).

También se incluyeron en esta prueba, 8 sueros de pacientes con enfermedad autoinmune y 18 sueros con títulos de 1:8 hasta 1:1024 unidades de factor reumatoide.

La reproducibilidad de la prueba fue de 6.55 ± 1.4 canales de fluorescencia para la zona de negatividad, considerando una línea de corte para positividad de la prueba a partir de 11 canales. Con respecto a la especificidad de la prueba se encuentra que el anticuerpo IgM anti-IgG (factor reumatoide) no interfiere en la interpretación de resultados, aun con títulos altos, sin embargo los anticuerpos antinucleares de clase IgM provocan pruebas "falsas positivas".

Se estudiaron además 122 pacientes en lista de espera del Registro Nacional de Trasplantes, la mayoría con historia de inmunizaciones previas por: trasplante previo, o embarazo, o multitransfusiones. Sus sueros fueron evaluados por la prueba cruzada linfocitotóxica mediada por complemento (PCCDC) y por citometría de flujo (PCCF) contra un panel de células de 22 voluntarios sanos que representaron el 75% de las especificidades

antigénicas de la población mestiza mexicana. La proporción de pacientes sensibilizados fue de 23.7% por PCCDC y de 81.1% para PCCF mostrando una sensibilidad 3.4 veces mayor de esta última. La citometría de flujo se muestra como una herramienta muy útil en la detección de anticuerpos citotóxicos anti-HLA fijadores y no fijadores de complemento por su rapidez, reproducibilidad y sensibilidad.

INTRODUCCION.

Desde las observaciones de Peter Medawar sobre el rechazo de injertos en los años 40's (14) hasta hoy, la presencia de anticuerpos citotóxicos en el suero de pacientes candidatos a trasplante, es una condición que hay que descartar antes de intentar cualquier tipo de trasplante.

Los anticuerpos que originalmente fueron propuestos, tenían especificidad para el Sistema HLA; producidos como respuesta a 3 causas principales de sensibilización (22): EMBARAZO (24), TRANSFUSION SANGUINEA (12,17) y TRASPLANTE PREVIO (23), este último es la fuente principal de anticuerpos citotóxicos, todavía mas dañinos que los que se originan por las otras condiciones. Consecuentemente la proporción de sobrevida del segundo trasplante es igual o menor del 10% que en el primer injerto (27).

Dependiendo del título de anticuerpos citotóxicos, el tiempo de sobrevida del órgano transplantado varía considerablemente, y se encuentra desde el rechazo hiperagudo hasta uno a largo plazo (20,22). Este tipo de evolución generalmente ocurre en pacientes con aplasia medular o con insuficiencia renal en donde tienen como común denominador a la anemia severa con la que cursan, la cual es corregida a base de transfusiones sanguíneas (5,18). Estos eventos gradualmente sensibilizan al paciente y en combinación con el embarazo y trasplantes previos provocan que la producción de anticuerpos citotóxicos sea elevada (6,18,22,27). Para detectar el estado de presensibilización, se han desarrollado algunas metodologías que parten desde el simple retrasplante en modelos

animales (14), que ha permitido establecer que el rechazo hiperagudo es de tipo humoral; en la práctica médica el procedimiento más usado actualmente para detectar esta presensibilización es la prueba cruzada por microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (1).

En esta prueba la compatibilidad donador-receptor se investiga por medio de la búsqueda de anticuerpos citotóxicos en el suero del paciente, el cual, al ponerlo en contacto con las células del donante dan lugar a una reacción antígeno-anticuerpo en la microplaca. Posteriormente al agregarle complemento de conejo, la inmunoglobulina involucrada (IgG) fija y activa al complemento lesionando la membrana celular, haciéndola permeable a colorantes tales como el azul tripano o la eosina, con los que se demuestra la muerte celular. Esto puede realizarse cuantitativamente a través de diluciones que nos proporcionan el título de anticuerpos citotóxicos. De esta técnica han surgido variantes buscando

mejorar la sensibilidad, algunas modificando el tiempo de incubación (28) y otras utilizando antiglobulina humana (16).

Actualmente la citometría de flujo (CF) se emplea como herramienta alternativa para obtener mayor sensibilidad y especificidad en la detección de anticuerpos anti-HLA que escapan al método de complemento (2,7,11). En la CF el análisis que se hace sobre las células es sobre 4 parámetros simultáneos: luz transmitida, luz desviada a 90°, detección de fluorescencia verde y roja. De este modo se averigua el tamaño y complejidad celular, así como también las moléculas presentes en su superficie siempre que se tenga el anticuerpo monoclonal apropiado.

Para lograr esto se mezclan alícuotas proporcionales de suero del receptor y células del donante y posteriormente una alícuota de una anti-gammaglobulina humana marcada con fluorocromo verde, o rojo. Al circular la muestra por el citofluorómetro un rayo laser incide sobre la suspensión celular en la que las células se mueven una a una. Así, los detectores instalados para cada uno de los parámetros mencionados nos darán información suficiente para distinguir las características de la célula en cuestión (9).

OBJETIVOS

- 1.-Estandarizar la prueba cruzada por Citometría de Flujo (PCCF).
- 2.-Comparar la PCCF con la prueba cruzada por microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento (PCCDC).
- 3.-Determinar el estado de presensibilización en un grupo de pacientes en espera de transplante renal.
- 4.-Evaluar las principales causas de la sensibilización como: las transfusiones, embarazos y trasplantes de los pacientes.

MATERIAL Y METODOS

PACIENTES.

Durante el período comprendido entre diciembre de 1992 y junio de 1993 se colectaron 122 sueros de pacientes en espera de transplante renal cadavérico que acuden al "Registro Nacional de Transplantes". De estos pacientes: 50 reciben atención médica en el Centro Médico "20 de Noviembre", 65 en el Hospital de Petróleos Mexicanos y 7 en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez". A todos los pacientes se les aplicó el siguiente cuestionario: Nombre, edad, sexo, estatura, peso, número de embarazos, grupo sanguíneo, número de transfusiones recibidas, tipo de transplante recibido previamente, diagnóstico original y si se había tratado su anemia con eritropoyetina.

PANEL DE LEUCOCITOS.

Se colectaron paquetes de concentrados leucocitarios de un total de 22 donadores que cumplen con los requisitos fisiológicos para la donación voluntaria de sangre. Estos paquetes se captaron del Centro Nacional de la Transfusión y obligadamente debieron resultar negativos a las pruebas de HIV y HBAGs. Las células sanguíneas obtenidas se transportaron inmediatamente al laboratorio de Inmunología de Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias para su posterior procesamiento.

Las células leucocíticas totales de los 22 donadores se diluyeron cada una 1/3 (v/v) con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS), pH 7.36. Las células mononucleares fueron obtenidas por

centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep Nycomed, Densidad=1.007).

Las células mononucleares aisladas se separaron de la interfase ficoll-plasma y se lavaron 3 veces con medio RMPI-1640 (Sigma Chemical Company) con suero fetal de ternera (SFT) al 20% (Sigma Ch.Co.). Posteriormente se verificó la viabilidad de estas células con el método de azul de tripano resultando en un 90-95%. Simultáneamente se hizo la cuenta celular con el hemocitómetro de Neubauer para calcular el rendimiento de cada concentrado leucocitario.

Los linfocitos así aislados y contados se ajustaron en medio RMPI-1640 a una concentración de 6 a 12 X 10 células/ml/vial y el tubo se conservó a 4°C en baño de hielo. Se preparó la mezcla congelante con SFT al 90% y dimetil-sulfóxido (Sigma Co.) al 10% a 4°C y se resuspendió en ella a las células. Se colocaron viales a 4°C por 10 minutos y luego en vapor de nitrógeno líquido por 2 horas para posteriormente introducirlos en el nitrógeno líquido hasta su uso.

Antes de procesar las células se descongelaron con rapidez. Después de sacar el(los) vial(es) necesarios del tanque de nitrógeno, se colocaron en un baño a 37°C hasta la desaparición de los cristales de hielo y el contenido se vació en un tubo al que se le agregó medio RMPI-1640 con 10% de SFT y se lavaron 2 veces con el mismo medio.

La viabilidad celular fué del 75% al 70% procediéndose a diluirse a la concentración deseada.

PRUEBA CRUZADA POR CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DE COMPLEMENTO (PCCDC).

Esta prueba se realizó como se ha descrito previamente (1,26) y la cual consiste en adicionar a los pozos de microplacas de Terasaki una gota de aceite mineral para evitar la desecación, luego en el primer pozo se agrega 1 ul del suero control negativo y en los siguientes 1 ul de los sueros del panel de prueba. En el último pozo se agrega 1 ul del suero control positivo.

Las células del donador se ajustan a 4×10^6 células/ml y se agrega 1 ul de la suspensión a todos los pozos de la placa, se mezclan suavemente y se incuban a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se lava una vez con RPMI-1640 y se agregan 5 ul del complemento de conejo previamente titulado en cada pozo, se mezcla y se incuba 60 minutos a temperatura ambiente. Se lava una vez con RPMI-1640 y se agrega una gota de eosina al 5 % (Sigma Co.) a cada pozo y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el exceso de colorante, se adicionan 5 ul de paraformaldehído al 40% y se hace la lectura en microscopio invertido evaluando muerte celular debida a complemento.

El control positivo para la prueba de citotoxicidad fué un suero antilinfocito humano comercial (ORTHO) (CLONE-OKT3, CILAG Co.)

PRUEBA CRUZADA POR CITOMETRIA DE FLUJO (PCCF).

Para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo se usó un anticuerpo anti-inmunoglobulinas humanas (IgA, IgG, IgM, H y L) obtenidos de cabra marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Kiergaard and Perry Lab. Inc.).

Una mezcla de 8 sueros conocidos conteniendo anticuerpos anti-HLA fue utilizada como control positivo.

El suero control negativo fue obtenido de un donador varón, sano, no transfundido, de grupo sanguíneo AB.

El método para la PCCF fue una modificación del protocolo original de Garovoy y cols. (7). Brevemente, esta prueba consistió en ajustar una suspensión de linfocitos descongelados a $2-3 \times 10^6$ células/ml y agregar 30 μ l de esta suspensión a tubos de microcentrífuga (International Equipment Co.). Posteriormente se agregaron 2 μ l a igual número de tubos adecuadamente rotulados con los sueros problema, control positivo y negativo. Esta mezcla se agitó en el vórtex (Thermolyne Co.) y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Luego los tubos se centrifugaron 1 minuto a 10,000 rpm y se lavaron una vez con amortiguador salino de fosfatos (PBS), pH 7.36.

Al paquete de células de cada tubo se le agregan 30 μ l de la gamma globulina policlonal de cabra conjugada con FITC (KPL Inc.) titulada previamente, se mezcló y se dejó incubar 30 minutos a 4°C en la oscuridad y después las células se lavaron 2 veces con 500 μ l de PBS, 0.1% de azida de sodio.

Al final las células ya lavadas se resuspendieron en 500 μ l de paraformaldehído al 4% en PBS, se agitaron en el vórtex y se pasaron a los tubos apropiados (Falcon No. 2058 Becton Dickinson Co.) para el citofluorómetro. Se almacenaron a 4°C en la oscuridad pudiendo ser analizadas hasta una semana después de procesadas.

El análisis de las células fue hecho en un FACScan (Becton Dickinson Co.) equipado con un rayo laser de argón de 15 mW. Los datos de las células fueron adquiridos en el programa LYSYS II. Los datos de intensidad de fluorescencia colectados fueron expresados en una escala semilogarítmica de 4 ciclos.

Con los eventos obtenidos sobre los mapas del trazado de puntos (luz transmitida contra luz desviada a 90°) se delimitó la población de linfocitos en una "región" para su posterior análisis de fluorescencia (13). Este se hizo sobre el parámetro de FL1-H1 (fluorescencia verde). Sólo se hicieron ajustes mínimos sobre la posición de la "región" para cada tipo de células. Los datos de cada muestra fueron 5,000 y se incluyeron un control negativo (inespecífico) y uno positivo los que fueron evaluados en cada corrida.

INTERPRETACION DE RESULTADOS.

PCCDC.- Se evaluó la proporción de células muertas.

Prueba cruzada negativa: <30% de células muertas.

Prueba cruzada positiva: >30% de células muertas.

PCCF.- La cantidad de anticuerpo unido a la célula blanco es calculada de la siguiente forma:

Cambio medio de canal = $\frac{\text{canal medio de fluorescencia verde del suero problema} - \text{canal medio de la fluorescencia verde del suero control negativo}}{\text{canal medio de fluorescencia verde del suero control negativo}}$

ESTANDARIZACION DE LA PCCF (7).

REPRODUCIBILIDAD.- Para obtener la línea de corte entre una PCCF negativa o positiva, se procesó un suero humano normal (control negativo de grupo sanguíneo AB) sobre linfocitos de un donador sano 20 veces por el método descrito anteriormente.

Para este trabajo la zona de negatividad se limitó hasta el valor positivo de 3 veces la desviación estándar del canal medio del control negativo.

SENSIBILIDAD.- Para este ensayo se realizaron diluciones 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:100 y 1:200 para titular la gammaglobulina total fluoresceinada. Las diluciones probadas para el suero fueron 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32.

Todos los sueros del panel de prueba fueron centrifugados previamente por 10 minutos a 10,000 rpm y congelados a -72°C antes de su uso.

Se tituló el suero antilinfocítico para la prueba de linfocitotoxicidad.

ESPECIFICIDAD.

Cinco sueros conteniendo anticuerpos anti-DR2, -DR5, -poliDR, -DQw3 y un suero sin anticuerpos anti-HLA fueron procesados por PCCF contra células cuyos haplotipos contenían el antígeno correspondiente y además contra otras células que no poseían al antígeno.

Un total de 8 sueros provenientes de pacientes con enfermedad autoinmune se procesaron con PCCF. Uno de estos sueros se absorbió y se procesó 20 veces como prueba de reproducibilidad para anticuerpos antinucleares.

Los 18 sueros conteniendo títulos desde 1:8 hasta 1:1024 unidades de factor reumatoide se procesaron por duplicado.

ANALISIS ESTADISTICO.

Se utilizó la prueba de 2 muestras de Kolmogorov-Smirnov (3,25) para comparar los grupos que estuvieron en contacto con alguna fuente sensibilizante contra aquellos que no lo hayan estado, además, para comparar la sensibilidad de las metodologías.

DISEÑO EXPERIMENTAL

SUEROS DEL REGISTRO
 ↙ NACIONAL DE TRANSPLANTES ↘

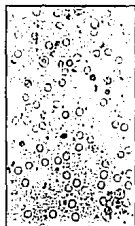
PRUEBA CRUZADA POR CITOTOXICIDAD

Suero
 +
 Cél. donador
 +
 Complemento
 +
 Colorante vital (eosina)

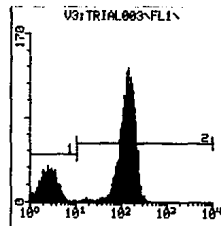
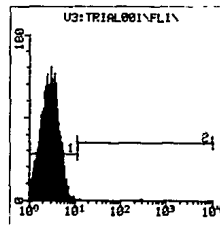
PRUEBA CRUZADA POR CITOFLUOROMETRIA

Suero
 +
 Cél. donador
 +
 Ac. anti- γ -(IgG,IgA,IgM)humana/FITC

SUEROS NEGATIVOS ← SUEROS POSITIVOS



SUEROS NEGATIVOS ← SUEROS POSITIVOS



RESULTADOS.

Los datos del grupo sanguíneo de los donadores de células y del panel de sueros permitieron eliminar las PCCDC y PCCF positivas debidas a estas moléculas.

El estado general aparente de los pacientes investigado por peso y estatura no fue diferente de los patrones internacionales (4) como se muestra en la Tabla 1.

Del ensayo de reproducibilidad del suero control negativo obtenemos que el canal promedio donde se ubica el pico mayor de fluorescencia para las 20 repeticiones esta en 6.55 ± 1.4 (Fig.1), considerando una zona de negatividad como $X \pm 3 DS = 10.75$ canales y una línea de corte para positividad de la PCCF a partir de 11 canales de fluorescencia (Fig. 2).

La dilución óptima para la gammaglobulina total fue de 1:100 (Fig.3). Una dilución 1:16 resultó adecuada para el suero de prueba (Fig.4) mientras que para citotoxicidad la dilución máxima del suero resultó 1:8.

Con respecto a la especificidad del método, el reconocimiento antígeno HLA-anticuerpo se hizo evidente por una PCCF positiva en las células que contenían el antígeno en cuestión sin observarse falsos positivos en las células que no lo contenían (Fig.5).

Los histogramas de fluorescencia obtenidos por los sueros con anticuerpos antinucleares se localizan entre la zona de negatividad y la de positividad originando una prueba "falsa positiva" (Tabla 2 y Fig 6).

La presencia de factor reumatoide en los sueros no interfiere en la interpretación de resultados (Tabla 3 y Fig 7).

El efecto de las transfusiones en pacientes sin transplante previo, ni embarazo se representa en las gráficas 1 y 2 observándose una relación directamente proporcional entre la transfusión y la sensibilización por ambos métodos.

En mujeres nefrópatas sin transfusiones el efecto sensibilizante con el número de embarazos se muestra en las gráficas 3 y 4 en donde se observa que por CF el porcentaje del reconocimiento de sensibilización previa en mujeres nulíparas se eleva a un 50%, en contraste con la PCCDC que resultó 0% en el mismo grupo.

En las gráficas 5 y 6 se representa el efecto sensibilizante tanto de transfusiones como de embarazos, observándose una mayor sensibilidad para detectar anticuerpos preformados por CF.

Con respecto al sexo de los pacientes la tendencia a la sensibilización debida solamente a transfusión es semejante en hombres y mujeres, usando el método de CDC como lo muestra la gráfica 7. La gráfica 8 muestra que la sensibilización con pocas transfusiones es evidente con un alto porcentaje de reconocimiento por CF en ambos grupos.

Las gráficas 9 y 10 muestra el efecto de las transfusiones en pacientes sin embarazo ni transplante previo clasificados en grupos de edad, resultando una mayor sensibilidad en el método de CF con respecto a la PCCDC, no observandose diferencia en cuanto al reconocimiento celular por edad.

La combinación de efectos inmunizantes en paciente con insuficiencia renal se muestra en las gráficas 11 y 12, observando

una correlación elevada entre la transfusion y el estado de sensibilización en ambos métodos $r=0.99$, por CDC y $r=0.94$ por CF (Gráficas 13 y 14).

La gráfica 15 muestra la diferencia en sensibilidad entre los métodos usados.

En la gráfica 16 se presentan las distribuciones de Kolmogorov-Smirnov (3,25) en donde se observa una mayor sensibilidad de la CF con respecto al método tradicional en microplaca.

ANALISIS ESTADISTICO
COMPARACION DE METODOS POR LA PRUEBA DE
DOS MUESTRAS DE KOLMOGOROV-SMIRNOV

No. de pruebas positivas		
Transfusión	C.D.C	C.F.
cero	1	9
1 - 5	8	46
5 - 10	5	23
11 - 50	13	19
> de 50	2	2
TOTAL	29	99

Suma acumulada		
Transfusión.	C.D.	C.F.
cero	0,03	0,09
1 - 5	0,31	0,55
5 - 10	0,48	0,79
11 - 50	0,93	0,98
> de 50	1	1

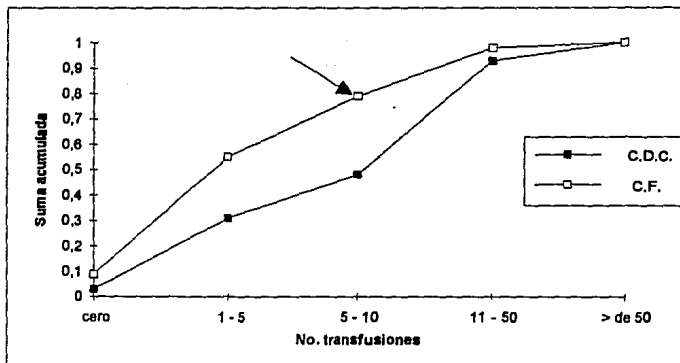
Coeficiente K-S	
Δ K-S	
0,06	
0,25	
0,31	
0,05	
0,0	

$$\Delta K-S = 1,38 \sqrt{\frac{n1+n2}{n1 \times n2}}$$

p=0.05

$$\Delta K-S = 1,38 \sqrt{\frac{29+99}{29 \times 99}}$$

$$\Delta K-S = 0,285$$



Nota: La flecha indica diferencia estadísticamente significativa.

RELACION PESO-ESTATURA EN LOS PACIENTES DE ESTUDIO

N	EDAD (años)	PESO (Kg.)	ESTATURA (mts.)
13	7 - 17	39.2 +/- 7.8	1.42 +/- 0.09
69	18 - 40	54.6 +/- 10.9	1.58 +/- 0.08
40	41 - 60	65.1 +/- 13.3	1.62 +/- 0.07

TABLA No.1

RELACION DE LOS PACIENTES (8) CON ENFERMEDAD AUTOINMUNE

Enfermedad	Título de acs.
DERMATOMIOSITIS	1:128
ESCLERODERMIA	1:512
L.E.G.	1:256
L.E.G.	1:256
L.E.G.	1:512
L.E.G.	1:128
MIASTENIA GRAVIS	1:128
SINDROME DE SJOGREN	1:256

acs = anticuerpos

L.E.G. = lupus eritematoso generalizado

Tabla No. 2

**RELACION DE PACIENTES CON
FACTOR REUMATOIDE (IgM anti-IgG)**

Número	Título
1	1:128
2	1:64
3	1:32
4	1:32
5	1:64
6	1:256
7	1:128
8	1:32
9	1:256
10	1:64
11	1:512
12	1:64
13	1:128
14	1:1024
15	1:64
16	1:512
17	1:128
18	1:128

Tabla No.3

REPRODUCIBILIDAD DEL SUERO CONTROL NEGATIVO

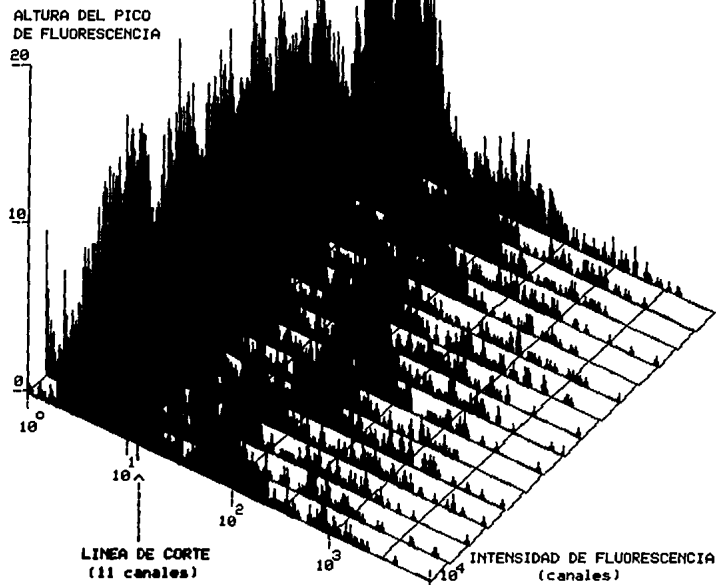


FIGURA 1.- En esta figura se muestran al azar 16 de las 20 repeticiones de la PCCF con un suero humano normal de grupo AB estableciendo una línea de corte para negatividad hasta 11 canales de fluorescencia.

PRUEBA CRUZADA POSITIVA

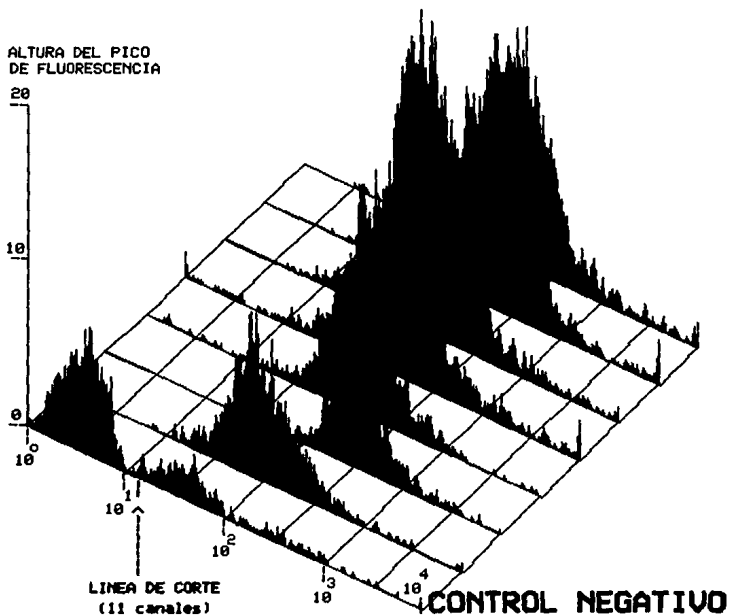


FIGURA 2.- Aquí se muestran algunos ejemplos de histogramas de fluorescencia que indican pruebas cruzadas positivas por citofluorometría frente a un suero control negativo.

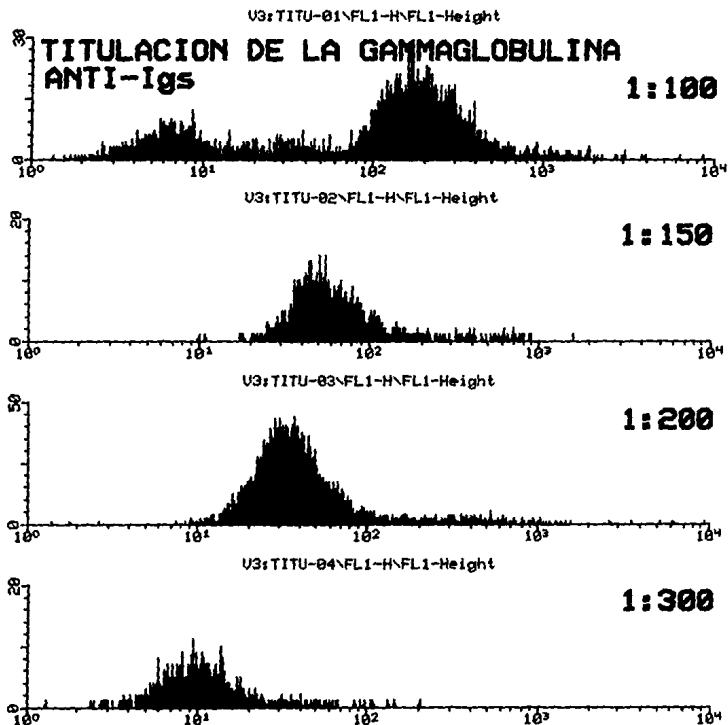


FIGURA 3.- En esta figura se presentan las diluciones ensayadas al titular la gammaglobulina anti-Igs., usando una mezcla de sueros conteniendo anticuerpos anti-HLA. La dilución óptima con la cual las células presentan positividad franca es 1:100.

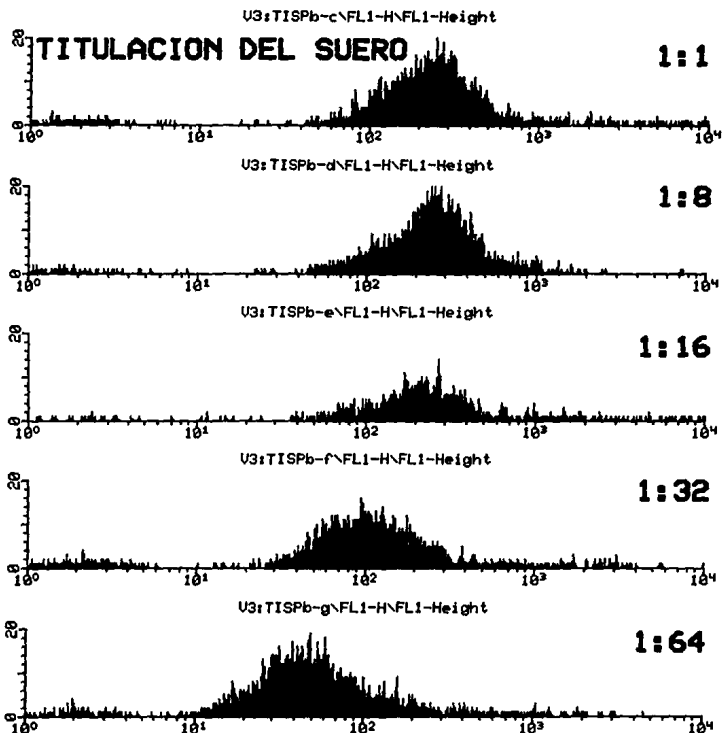


FIGURA 4.- Aquí se presentan las diluciones ensayadas al titular el suero de prueba usando una mezcla de sueros conteniendo anticuerpos anti-HLA. La dilución óptima sin que se presente positividad dudosa es 1:16.

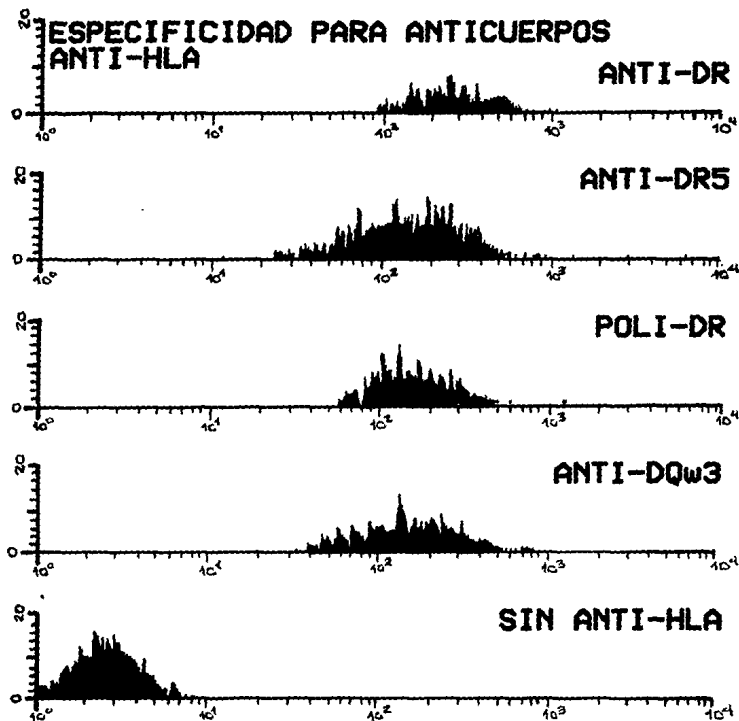


FIGURA 5.- En esta figura se muestra la especificidad de la PCCF en cuanto al reconocimiento de células con diferentes antígenos HLA por sueros que contienen los anticuerpos respectivos, resultando en reacciones positivas

SUEROS CON ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

ALTURA DEL PICO
DE FLUORESCENCIA

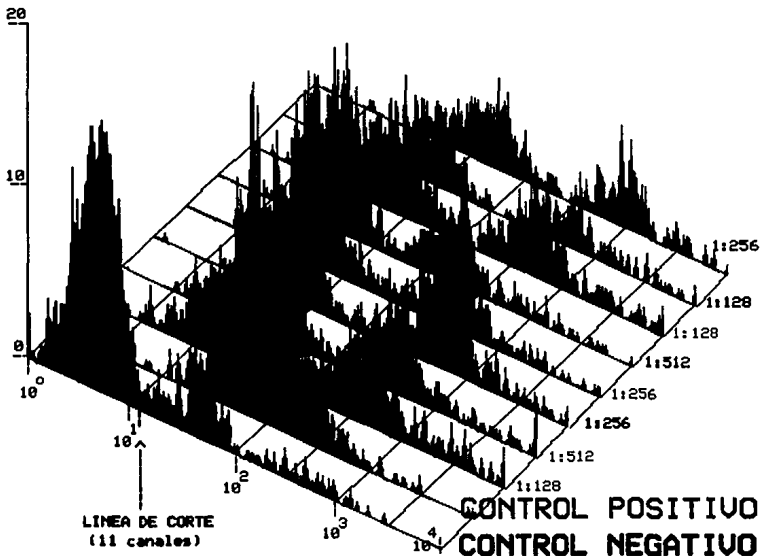


FIGURA 6.- Aquí se muestran los histogramas de fluorescencia de los 8 sueros conteniendo anticuerpos antinucleares. Se puede observar la heterogeneidad de las distribuciones de cada uno de los sueros y la interferencia de estas moléculas para clasificar una PCCF positiva o negativa.

U3:SUN0-03\FL1-H\FL1-Height

SUEROS CON FACTOR REUMATOIDE

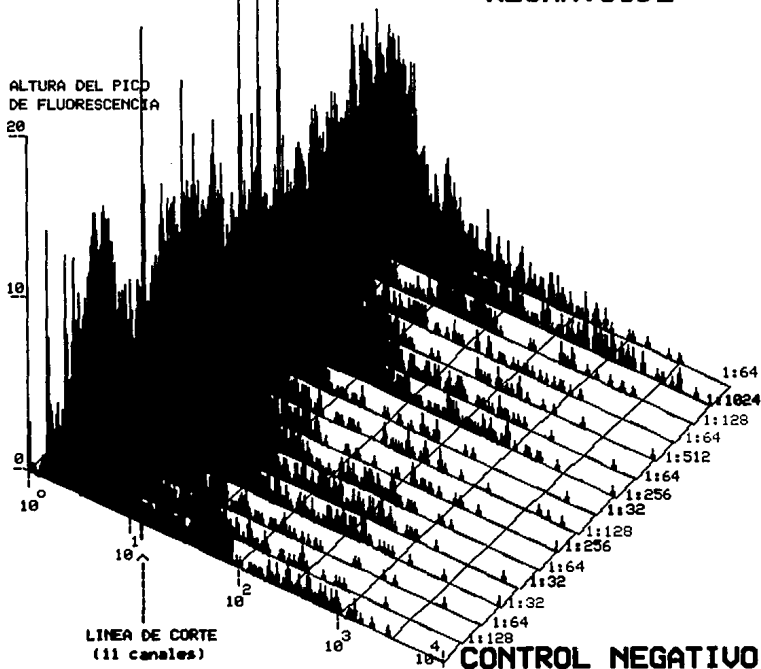
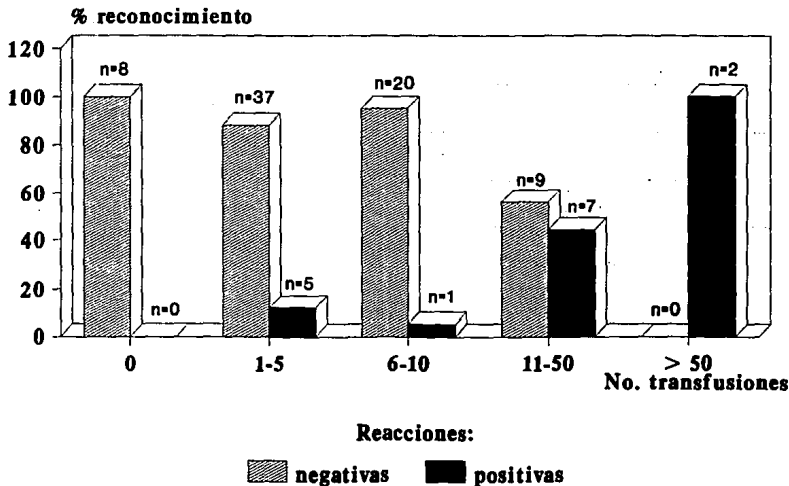


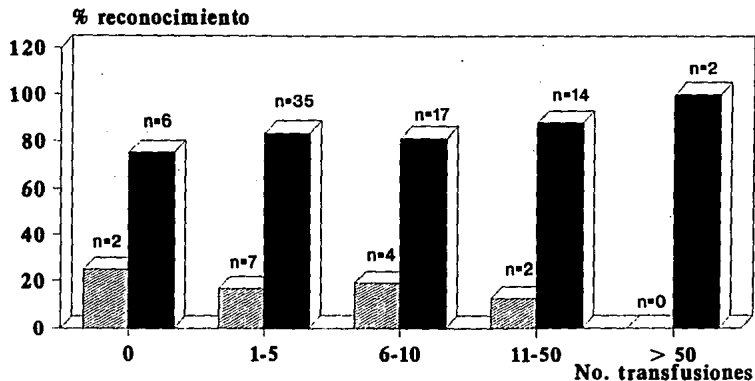
FIGURA 7.- Aquí se presentan algunos ejemplos de histogramas de fluorescencia de sueros conteniendo anticuerpos IgM anti-IgG en donde se observa que este "factor reumatoide" no interfiere en la interpretación de una PCCF.

FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS TRANSFUSIONES CITOTOXICIDAD

GRAFICA 1



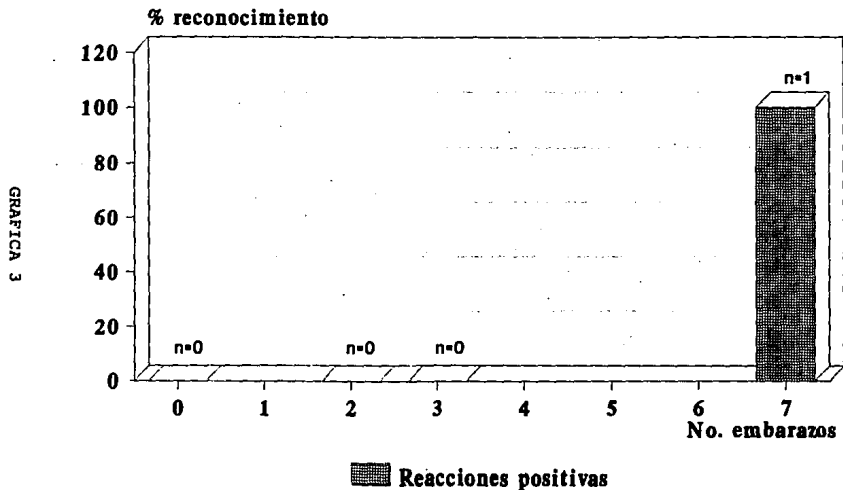
FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS TRANSFUSIONES CITOFLUOROMETRIA



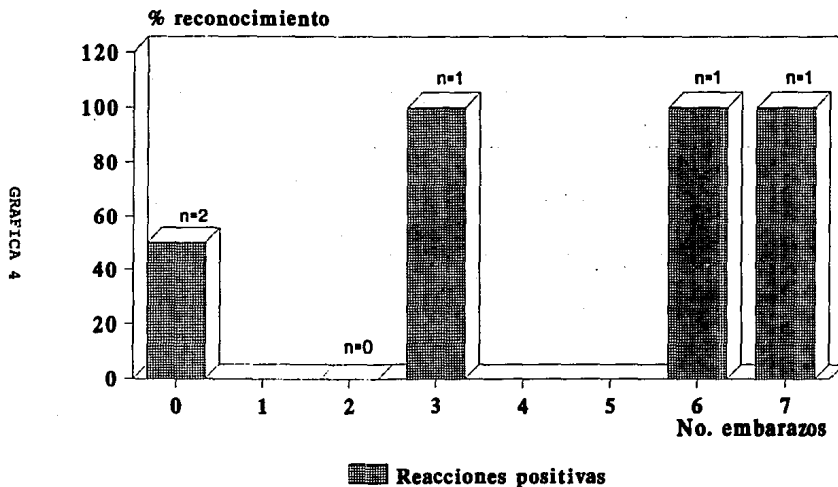
Reacciones:

negativas positivas

FRECUENCIA DEL RECONOCIMIENTO CELULAR RELACION AL NUMERO DE EMBARAZOS CITOTOXICIDAD

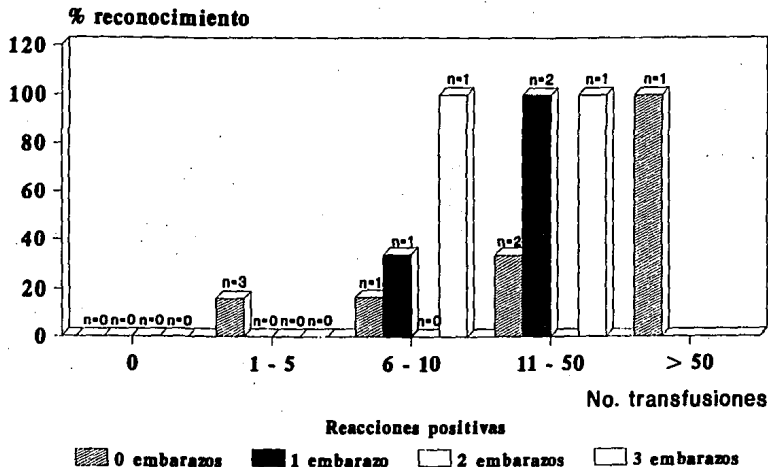


FRECUENCIA DEL RECONOCIMIENTO CELULAR RELACION AL NUMERO DE EMBARAZOS CITOFLUOROMETRIA



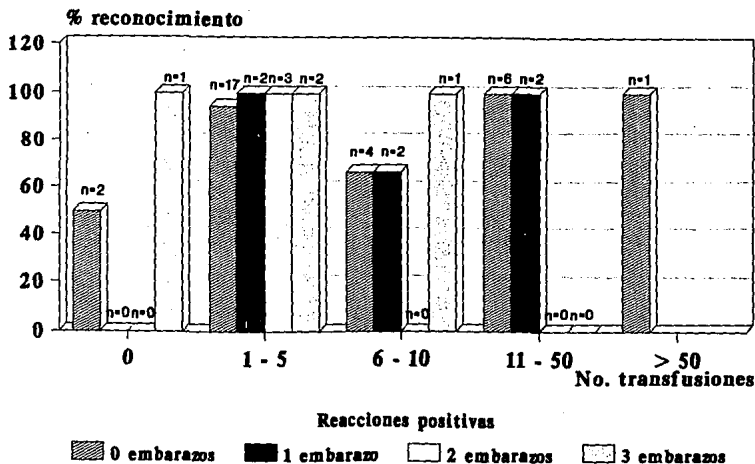
FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VS. EMBARAZO Y No. TRANSFUSIONES CITOTOXICIDAD

GRAFICA 5



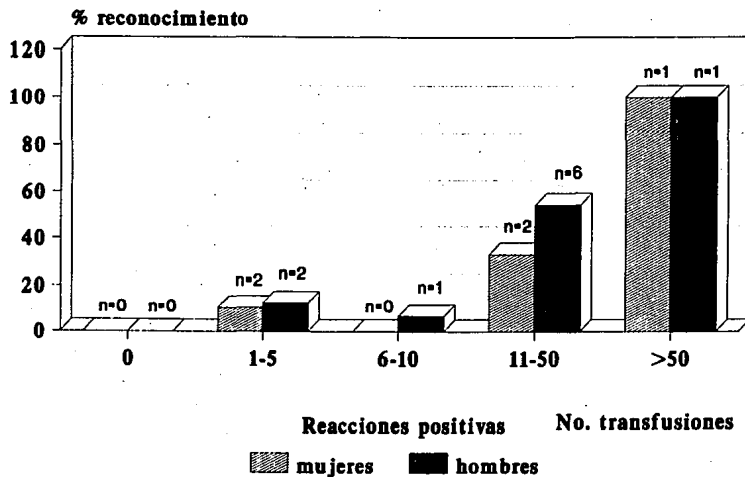
FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VS. EMBARAZO Y No. TRANSFUSIONES CITOFUOROMETRIA

GRAFICA 6



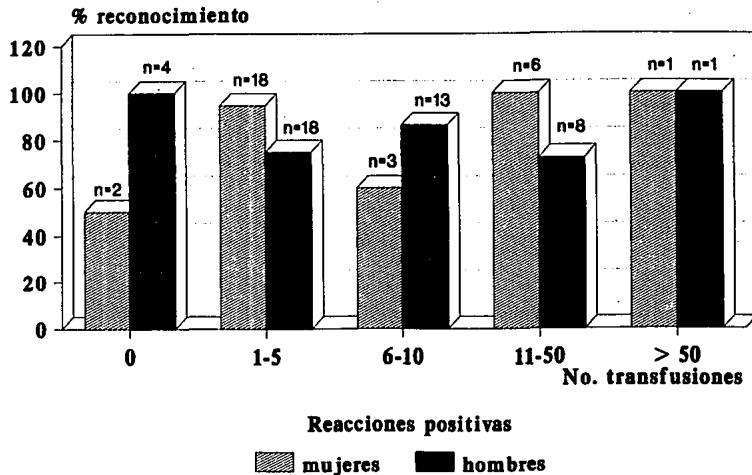
EFFECTO DE LAS TRANSFUSIONES EN HOMBRES Y MUJERES CITOTOXICIDAD

GRAFICA 7

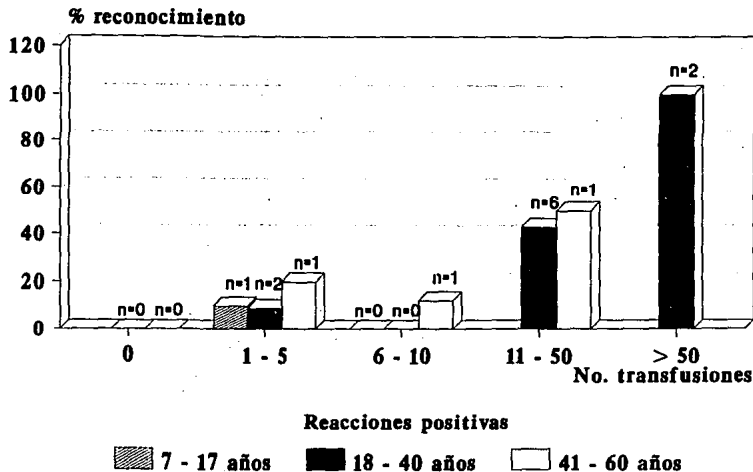


EFFECTO DE LAS TRANSFUSIONES EN HOMBRES Y MUJERES CITOFLUOROMETRIA

GRAFICA 8

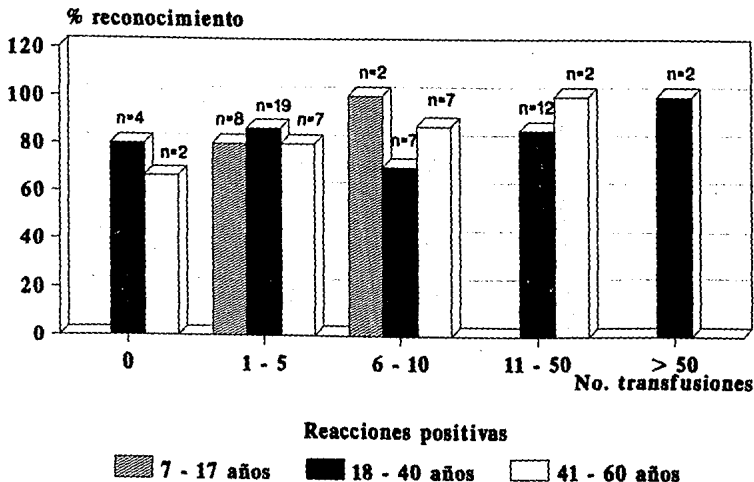


FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS EDAD Y No. DE TRANSFUSIONES CITOTOXICIDAD



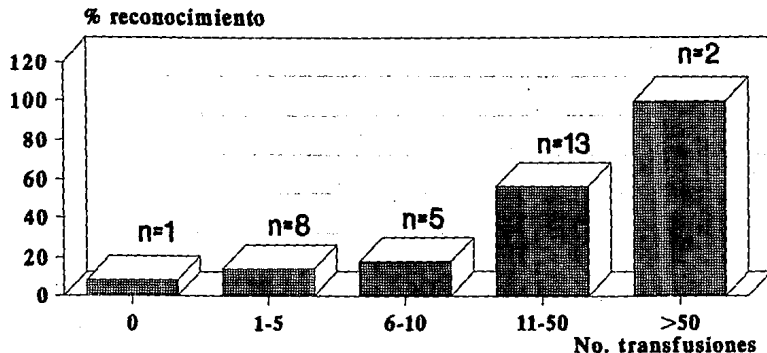
FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS EDAD Y No. TRANSFUSIONES CITOFLUOROMETRIA

GRAFICA 10



FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS FUENTES SENSIBILIZANTES CITOTOXICIDAD

GRAFICA 11

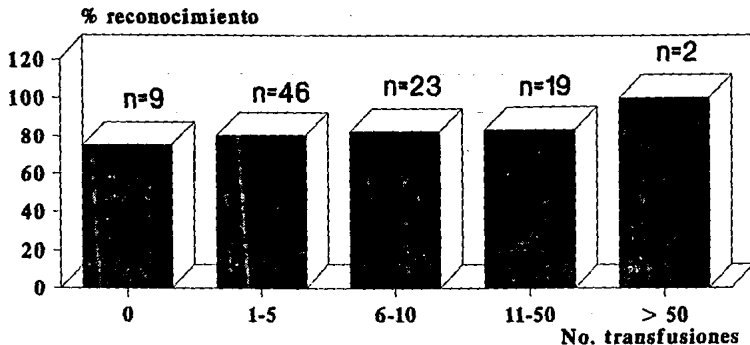


Reacciones positivas

Tf., Emb., Tx.

Tf. = Transfusiones
Emb. = Embarazos
Tx. = Transplante previo

FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS FUENTES SENSIBILIZANTES CITOFLUOROMETRIA



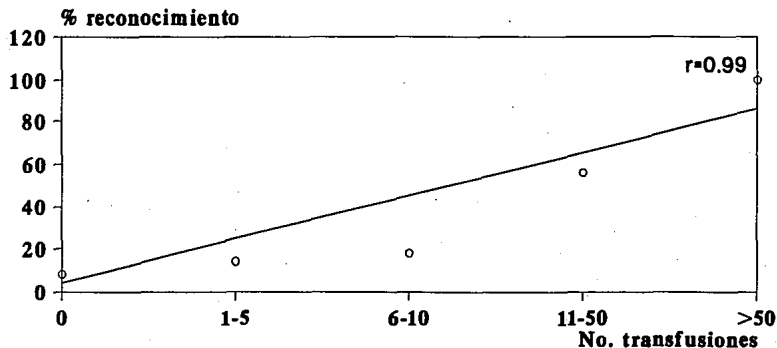
Reacciones positivas

■ Tf., Emb., Tx.

Tf. = Transfusiones
 Emb. = Embarazo
 Tx. = Transplante previo

FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS FUENTES SENSIBILIZANTES CITOTOXICIDAD

GRAFICA 13



Reacciones positivas

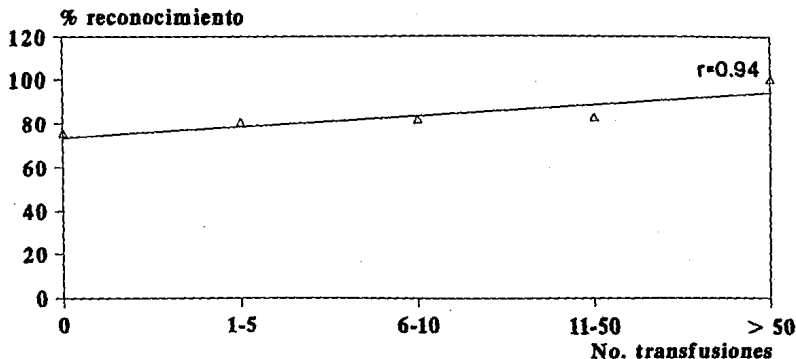
○ Tf., Emb., Tx.

Tf.= Transfusiones

Emb.= Embarazos

Tx.= Transplante previo

FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR VERSUS FUENTES SENSIBILIZANTES CITOFLUOROMETRIA



Reacciones positivas

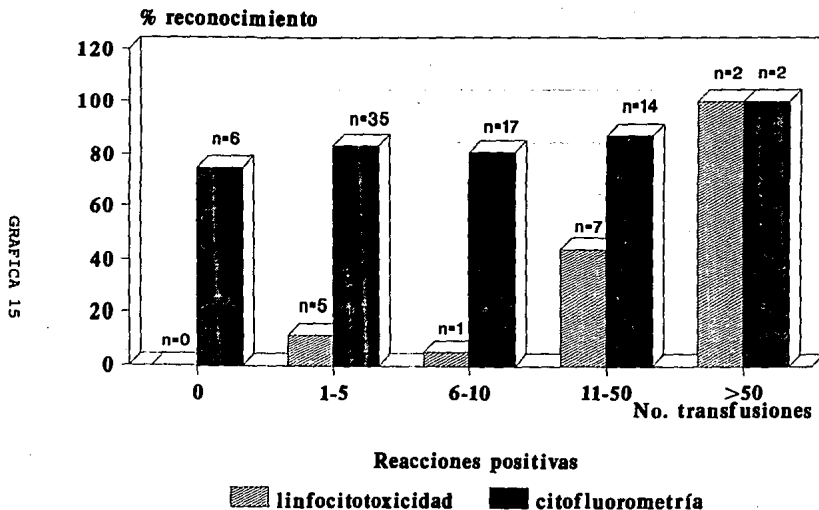
—△— Tf., Emb., Tx.

Tf. = Transfusiones

Emb. = Embarazos

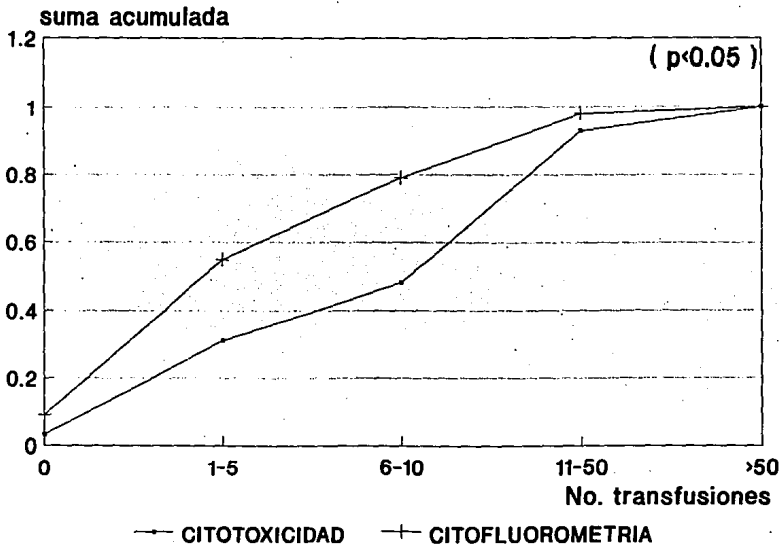
Tx. = Transplante previo

FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CELULAR COMPARACION DE METODOS.



COMPARACION DE METODOS POR LA PRUEBA DE DOS MUESTRAS DE KOLMOGOROV-SMIRNOV

GRAFICA 16



ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSION

Los resultados indican el importante papel de las transfusiones sanguíneas en la sensibilización de los pacientes hacia injertos renales. La prueba de citotoxicidad usada por muchos años (1), aún con sus variantes (15,16,26), no es suficiente para detectar niveles mínimos de anticuerpos anti-HLA, pues la lectura de muerte celular esta sujeta a variaciones subjetivas entre los lectores al microscopio de esta prueba, además de que sólo se detectan anticuerpos fijadores de complemento. Si bien el tipo de análisis que se realiza con el citofluorómetro (8,9) permite tener más información acerca de la estructura celular y las reacciones antígeno-anticuerpo que ocurran en su superficie; la detección de anticuerpos preformados en los sueros de pacientes nefróticas es más fina, pues aunque se ha reportado que su sensibilidad es de 10 a 100 veces mayor que la citotoxicidad (2), nosotros encontramos una sensibilidad 3.4 veces mayor.

Otras ventajas de la citometría de flujo son: la detección de anticuerpos fijadores y no fijadores de complemento, mayor rapidez del proceso, buena reproducibilidad ($D.S.=+/-1.4$) para controles negativos y positivos y con buena especificidad pues el uso de células conteniendo antígenos de clase II frente a los sueros que tienen los anticuerpos correspondientes resultó ser francamente positiva en pruebas cruzadas.

La presencia de autoanticuerpos en el suero de los pacientes hace que se presente una prueba "falsa positiva", tanto en PCCDC (19) como en PCCF (21) por lo que al procesar el panel de sueros por

PCCF la interferencia por estas moléculas se eliminó al efectuar de 3 a 4 lavados entre incubación de especímenes cuando en la técnica original se sugiere que solamente sea de 1 a 2 lavados.

El anticuerpo IgM anti-IgG conocido como factor reumatoide no interfirió con los resultados pues los histogramas de fluorescencia correspondientes se localizan en la zona de negatividad para CF aún cuando existieron títulos altos de este factor. La proporción de pacientes sensibilizados en nuestro universo, que reconocen al menos 2 células del panel fué de 23.7% por CDC y de 81.1% para CF.

Analizando cada una de las fuentes sensibilizantes reportadas, las transfusiones como único evento inmunizante ocasionan un incremento en el reconocimiento celular mientras mas transfundido esté dicho sujeto nefrópata. Se aprecia un fenómeno semejante con el efecto del número de embarazos, sin embargo en nuestro panel de sueros, los grupos de pacientes que solo habían sido transfundidos y las que solo se habían embarazado no son numéricamente iguales.

Respecto al efecto exclusivo de transplantes previos, en nuestro panel hubo solo 6 pacientes que anteriormente habían recibido alguno, pero que además habían sido transfundidos, o habían estado embarazadas. No obstante se pudo apreciar un efecto aditivo de la sensibilización debido a este hecho al analizar los grupos de pacientes anteriores por separado.

En cuanto al reconocimiento antigénico en hombres y en mujeres solamente por transfusión, no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$), pues en ambos fué directamente proporcional al número de

transfusiones. Se observa solo una ligera tendencia a una mayor sensibilización en hombres.

Con respecto a inmunización por transfusión en cuanto a grupos de edad, se observa también un incremento en la detección de anticuerpos sensibilizantes por citometría de flujo.

Se ha encontrado que cada fuente sensibiliza gradualmente al paciente y la combinación de 2 de ellas, o bien de las 3, hace que el título de anticuerpos antidonador se eleve. Por ejemplo; en pacientes con 6 a 10 transfusiones recibidas, el porcentaje de reconocimiento celular se incrementa del 13% al 16% cuando ya tuvieron al menos 1 embarazo, esto por citotoxicidad, y por CF resulta 66.6% (n=4) a 66.6% (n=2).

Deberíamos esperar que con más embarazos, la proporción de inmunización sea mayor pero el tamaño de muestra diferente produce la igualdad en porcentajes.

El efecto acumulado de trasplante, embarazo y transfusión en todos nuestros pacientes resulta en una tendencia directamente proporcional a sensibilizarse a mayor número de transfusiones en las 2 técnicas como lo muestran sus coeficientes de correlación.

Existe diferencia en sensibilidad entre CF y CDC en el grupo que recibió de 6 a 10 transfusiones. Esto indica que la PCCF detecta más eficazmente los anticuerpos citotóxicos, ya sean fijadores y no fijadores de complemento, a diferencia del método tradicional en microplaca. Cuando el paciente ha recibido hasta 10 transfusiones se presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) pero con más eventos sensibilizantes la

detección de anticuerpos en ambos métodos es semejante (Gráfica 16).

Nuestro panel celular representó el 75% de las especificidades antigénicas de nuestra población, por lo tanto un suero que haya reaccionado con todas las células, difícilmente podrá aceptar un riñón de un mestizo mexicano. En nuestro universo existieron 2 sueros que reaccionaron con 11 poblaciones celulares (50%).

Durante el procesamiento de las células se observó un cierto grado de susceptibilidad de la membrana celular al congelamiento pues en esta experiencia la viabilidad disminuyó de un 95-90% a un 75-70% por lo que fue necesario suspenderlas en medio de cultivo celular, por ejemplo RMPI-1640 complementado con suero de ternera fetal después de descongelarlas y procesar la prueba cruzada sobre hielo para evitar más muerte celular.

Cabe hacer mención de la proporción de reconocimiento celular cuando los pacientes no habían estado en contacto con alguna fuente sensibilizante (Gráfica 15). Esto hace sospechar sobre ciertas reacciones cruzadas (10) en las que se involucra el contacto con proteínas bacterianas por ejemplo de Streptococcus sp. Se sospecha también que se pueda deber a embarazos previos no manifestados en el cuestionario.

CONCLUSIONES

Se estandarizó la prueba cruzada por citometría de flujo (PCCF) obteniendo una línea de corte para positividad a partir de 11 canales de fluorescencia.

No se presentaron pruebas "falsas positivas" debidas al factor reumatoide, pero sí las hay por anticuerpos antinucleares aunque se pueden evitar lavando las células de 3 a 4 veces luego de mezcladas con el suero de prueba.

La PCCF es 3.4 veces más sensible en la detección de anticuerpos citotóxicos con respecto al método tradicional en microplaca (PCCDC).

En cuanto al estado de presensibilización de los pacientes estudiados, se observa una correlación directamente proporcional entre el número de transfusiones y el reconocimiento celular en ambas técnicas ($r=0.99$ para CDC y $r=0.94$ para CF), sin embargo la sensibilidad para detectar anticuerpos en un paciente con un número mínimo de transfusiones resulta mucho mayor por CF.

Cada evento (transplante previo, transfusión o embarazo) sensibiliza gradualmente al paciente y la combinación de 2 o de los 3 aumenta en gran medida el estado de sensibilización de los nefrópatas.

No es muy conveniente almacenar células en congelación y luego procesarlas para leerlas en el citofluorómetro pues resulta una disminución en la viabilidad del 15-20%, además de modificarse su estructura. Es preferible usar células frescas.

Así, la citometría de flujo representa una herramienta útil por su sensibilidad como prueba de escrutinio para la donación de riñones cadavéricos o vivos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Amos D.B., Bashir H., Boyle W., MacQueen M., Tilikainen A.. A simple microcytotoxicity test. Transplantation 7:220, 1969.
- 2.-Bray R.A., Lebeck L.K., Gebel H.M.. The flow cytometry crossmatch dual-color analysis of T cell and B cell reactivities. Transplantation 48:834, 1989.
- 3.-Castilla L., Cravioto J.. Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud. 1ª ed. Ed. Trillas pp 89-93 1991, México.
- 4.-Davidson I., Henry J.B.. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 7ª ed. Ed. Salvat p. 1447 España 1989
- 5.-Donnall E., Sargur M.. Organ Transplantation and Replacement. Bone Marrow Transplantation. Chapter 40 p.p. 608-616 1988.
- 6.-Gailunas P., Suthanthiran M., Busch G.J., Carpenter Ch., Garovoy M.R.. Role of humoral presensitization in human renal transplant rejection. Kidney International 17:638, 1980.
- 7.-Garovoy M.R., Rheinschmidt M.A., Bigos M., Perkins H., Colombe B., Feduska M., Salvatierra O.. Flow Cytometry Analysis: A high technology crossmatch technique facilitating transplantation. Transplant. Proc. 15:1939, 1983.
- 8.-Haynes J.L.. Principles of Flow Cytometry. Cytometry Supplement 3:7-17 1988.
- 9.-Herzenberg L.A., Sweet R.G., Herzenberg L.A.. Fluorescence-Activated Cell Sorting. Sci. American 234:108, 1976.
- 10.-Hirata A.A., Terasaki P.I.. Cross-Reactions between Streptococcal M Proteins and human transplantation antigens. Science 168:1095, 1970.
- 11.-Iwaki Y., Cook J., Terasaki P.I., et. al.. Flow cytometry crossmatching in human cadaver kidney transplantation. Transplant. Proc. 19:764, 1987.
- 12.-Kissmeyer-Nielsen F., Olsen S., Peterson V.P., Fjelborg O.. Hyperacute rejection of kidney allograft associated with preexisting humoral antibodies against donor cells. Lancet 2:662, 1966.
- 13.-McCoy J.P., Carey J.L., Krause J.R.. Quality Control in Flow Cytometry for Diagnostic Pathology. A.J.C.P. Supplement 1 93:527, 1990.

- 14.-Medawar P.B.. The behavior and fate of skin allografts and skin homografts in rabbits. J. Anat. 78:176. 1944.
- 15.-Mittal K.K.. Standardization of the HLA typing method and reagents. Transplantation 25:275, 1978.
- 16.-Nelken D., Cohen I., Furcaig I.. A method to increase the sensitivity of the lymphocyte microcytotoxicity test. Transplantation 10:346, 1970.
- 17.-Opelz G., Graver B., Mickey M.R., Terasaki P.I.. Lymphocytotoxic antibody responses to transfusions in potential kidney transplants recipients. Transplantation 32:177, 1981.
- 18.-Opelz G., Terasaki P.I.. Enhancement of kidney graft survival by blood transfusions. Transplant. Proc. 9:121, 1977.
- 19.-Park M.S., Terasaki P.I., Bernoco D.. Autoantibody against B lymphocytes. Lancet 3:465, 1977.
- 20.-Roitt I., Brostoff J., Male D.. Immunología. 2da. ed. Ed. Salvat. p.p.24.1-24.10, 1992 España
- 21.-Salvatierra O.; The role of blood transfusions in transplantation. In Cerilli J.G. (ed): Organ Transplantation and Replacement. pp 151-161 Philadelphia 1988 USA.
- 22.-Scornik J.C., Brunson M.E., Howard R.J., Pfaff W.W.. Alloimmunization, memory and the interpretation of crossmatch results for renal transplantation. Transplantation 54:389, 1992.
- 23.-Scornik J.C., Ireland J.E., Howard R.J., Fennell R.S., Pfaff W.W.. Role of regular and leukocyte-free blood transfusions in the generation of broad sensitization. Transplantation 38:594, 1984.
- 24.-Scornik J.C., Ireland J.E., Salomon D.R., Howard R.J., Fennell R.S., Pfaff W.W.. Pretransplant blood transfusions in patients with previous pregnancies. Transplantation 43:449, 1987.
- 25.-Siegel S.. Estadística no paramétrica. 3ª ed. Ed. Trillas pp 155-165 1990, México
- 26.-Terasaki P.I., Bernoco D., Park M.S., Ozturk G., Iwaki Y.. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. A.J.C.P. 69:103, 1978.
- 27.-Terasaki P.I., Cicciarelli J.; Sensitization and its role in transplantation. In Cerilli J.G. (ed): Organ transplantation and replacement. pp 196-207 Philadelphia 1988 USA.
- 28.-Ting A., Hasegawa T., Ferrone S., et. al.. Presensitization detected by sensitive crossmatch tests. Transplant. Proc. 5:813, 1973