



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Laboratorio de Histocompatibilidad del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Relación de la presencia de anticuerpos anti-HLA y rechazo agudo de pacientes con trasplante renal de la UMAE HE del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

TESIS

Que para obtener el grado de Especialista en Bioquímica clínica.

PRESENTA:

QFB. Omar Morales Ramírez



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente	D. en C. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa.
Vocal	M. en C. Guadalupe Ortiz López.
Secretario	Dr. Rodolfo Pastelín Palacios.
1er Suplente	M. en C. Isela Montúfar Robles
2do Suplente	M. en C. Mario Cárdenas León

Trabajo Realizado en El laboratorio de HLA del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Asesor del Tema EBC. Julio Martínez Álvarez.

Sustentante Q.F.B. Omar Morales Ramírez.

DEDICATORIAS

Me es grato dedicar este trabajo de tesis a mi nena Erika que ha sido la estrella de la mañana y mi Hatzell que ha sido la estrella polar que me guía en esas noches de obscuridad, sin ustedes no sería posible terminar cada uno de mis proyectos.

No siempre puedes obtener lo que quieres, pero si lo intentas, algún día podrás lograrlo.....

Por medio de la paciencia no hay nada que no se pueda lograr.

Piensa, cree, sueña y atrévete.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **UNAM** la máxima casa de estudios que me ha otorgado un tercer nombre a lo largo de mi vida profesional y al **IMSS** por permitirme realizar este proyecto.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento permitiéndome priorizar a la **Dra. Rosenda Peñaloza**, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a sus clases de genética y biología molecular.

Esta tesis, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte del autor, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Primero y antes que nada, dar gracias a **Dios**, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Asimismo, agradezco a mi Tutor el EBC. Julio Martínez Álvarez y al equipo de trabajo del laboratorio HLA del Banco Central de Sangre por su apoyo personal y humano, especialmente a la Química Araceli Arrazola, Claudia de Leo Cervantes, a los Doctores: Carmen Gracida Juárez, Jorge Cancino López, Araceli Ibarra Villanueva, Ramón Espinoza Pérez, a mis compañeros con quienes he compartido proyectos e ilusiones durante estos años.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. En este caso mi más sincero agradecimiento de nueva cuenta a la Dra. Rosenda Peñaloza, con cuyo trabajo estaré siempre en deuda. Gracias por su amabilidad al ayudarme con la tesis, su tiempo y sus ideas.

Por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología, mi agradecimiento a los integrantes del jurado: a la M en C Guadalupe Ortiz, la M en C Isela Montúfar y al Dr. Rodolfo por el material facilitado y las sugerencias recibidas. Finalmente, gracias al M en C Mario Cárdenas, por la revisión cuidadosa que ha realizado de este texto y sus valiosas sugerencias en momentos de duda.

Pero un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales.

Gracias a mi padre, a mis hermanos, a mi nana sandy, a mi cachito y a mi erika, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo y esta profesión. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también el suyo.

A todos, gracias totales.....

INDICE GENERAL

	Paginas
Índice de tablas y figuras	ii
Abreviaturas	iii
Resumen	iv
1.-Introducción	1
2.-Antecedentes	2
3.-Generalidades	5
3.1.- Sistema de Histocompatibilidad	5
3.1.1.- Estructura, organización genética y función del sistema HLA	5
3.1.2.- Presentación de antígenos	9
3.1.3.- Nomenclatura	10
3.1.4.- El sistema HLA y el trasplante	13
3.1.5.- Trasplante de órganos sólidos	14
3.1.6.- Pruebas de laboratorio existentes	15
3.1.7.- Pruebas clínicas de laboratorio clínico de HLA	16
3.1.8.- Tipificación serológica de antígenos HLA	17
3.1.9.- Tipificación molecular de alelos HLA	17
3.1.10.- Tamizado de anticuerpos HLA y prueba cruzada linfocitaria	18
3.1.11.- HLA y su asociación con la Enfermedad	19
3.1.12.- Características clínicas de rechazo del injerto	20
3.1.13.- Rechazo mediado por anticuerpos	20
3.1.14.- Anticuerpos contra antígenos del sistema ABO	20
3.1.15.- Rechazo hiperagudo	21
3.1.16.- Rechazo agudo mediado por anticuerpos o rechazo humoral agudo	21
3.1.17.- Rechazo vascular	22
3.1.18.-Rechazo agudo tardío	23

3.1.19.- Rechazo crónico	23
3.1.20.- Rechazo crónico mediado por anticuerpos	23
3.1.21.- Rechazo mediado por células T (Presentación de antígenos)	23
3.1.22.- El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)	24
3.1.23.- Procesamiento de Antígenos	24
3.1.24.- Reconocimiento de aloantígenos por células T	26
3.1.25.- Subgrupos de células T	27
3.1.26.- Respuesta inmune innata en alotrasplantes	28
4.0.- Objetivo General	30
4.1.- Objetivos particulares	30
5.0.- Hipótesis	30
6.0.- Planteamiento del problema	31
7.0.- Materiales y Métodos	31
7.1.- Metodología CDC	32
7.1.1.- Metodología determinación de anticuerpos anti-HLA (Luminex®)	34
7.1.2.- Tipificación de los antígenos HLA clase I y clase II	35
7.1.3.- Metodología HLA PCR-SSP	35
7.1.4.- Metodología HLA PCR-SSO	36
8.0.- Diagrama de Flujo Experimental	37
9.0.- Análisis Estadístico	38
9.1.1.- Hipótesis nula	38
9.1.2.- Hipótesis alterna	38
9.3.- Estadístico de prueba	38
10.0.-Resultados	39
11.0.- Discusión	45
13.0.- Conclusiones	49
14.0.- Bibliografía	50

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pagina
Fig.1. Representación de los distintos genes situados en la región 6p21.3.	6
Fig. 2. Herencia de haplotipos HLA	7
Fig. 3. Estructura polipeptídica de las moléculas HLA clase I(A) y Clase II (B).	8
Fig. 4. El rechazo celular y transporte de células en el trasplante.	22
Fig.5. Procesamiento de antígenos endógenos y exógenos clase I y clase II.	26
Fig.7. Los mecanismos de alorreconocimiento	27
Fig.8. La vía directa e indirecta para la presentación de aloantígenos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	27
Fig. 9. Activación de linfocitos	28
Fig.10. Respuesta inmune innata en el aloinjerto	29
Fig.11.- Representación en porcentajes de haplotipos más frecuentes en el binomio receptor donador	41
Fig.12.-Éxito del trasplante	44
Tabla 1. Breve descripción de las moléculas clásicas del sistema HLA	10
Tabla 2. Ejemplos de especificidad en función del número de dígitos en la nomenclatura	12
Tabla 3. Numero de alelos descritos y validados a enero de 2011	13
Tabla 4. Especificidad de anticuerpos HLA	39
Tabla 5. Haplotipos y antígenos compartidos en el binomio: receptor-donador	40
Tabla 6.Frecuencia de haplotipos en el binomio receptor-donador	41
Tabla 7. Tabla de contingencia de la prueba <i>versus</i> resultado	42
Tabla 8. Tabla de contingencia del PRA clase I <i>versus</i> PRA clase II	43
Tabla 9. Tabla de resultados del PRA	44

ABREVIATURAS

- ADN** Ácido Desoxirribonucleico
- Alelo** Una de entre varias formas alternativas de un gen.
- APC** (*Antigen Presenting Cells*) – Células presentadoras de antígeno
- DSA** Anticuerpos Donador Específicos
- β2M** Beta-2-Microglobulina
- CENATRA** Centro Nacional de Trasplantes
- DC** Células Dendríticas
- EA** Espondilitis anquilosante
- Fenotipo** La expresión del genotipo en un individuo (ej. El grupo sanguíneo).
- **FMR** Fundación Mexicana del Riñón
- Genotipo** La información genética diploide, es decir la información total de una célula.
- HLA** (Human Leukocyte Antigen) –Antígenos de los leucocitos humanos
- Haplotipo** grupo de genes que codifican para la expresión de un conjunto de proteínas que están bajo el control de un solo cromosoma.
- IFN γ** Interferón gamma
- IL** Interleucina
- Locus** La posición de un gen en un cromosoma.
- MHC** (*Major Histocompatibility Complex*) – Complejo Principal de Histocompatibilidad
- NK** Célula Natural Asesina
- NKT** Célula Natural Asesina T
- pb** (Pair bases) – Pares de bases
- PCR-rSSO** (*PCR Reverse Sequence Specific Oligonucleotide*) – PCR inversa con sondas específicas de oligonucleótidos
- PCR-SSP** (*PCR Sequence Specific Primers*) – PCR con Iniciadores de Secuencia Específica
- Primers** Iniciadores o cebadores
- Th** Linfocitos T cooperadores
- TCR** (T-cell receptor) – Receptor de células T
- TNF α** (*Tumor Necrosis Factor*) – Factor de Necrosis Tumoral alfa
- USRDS** (United States Renal Data System)- Sistema de Datos Renales en los Estados Unidos
- UNOS** (United Network for Organ Sharing)-Red Unida para el compartimiento de Órganos

RESUMEN

Los anticuerpos anti-HLA se han asociado cada vez con mayor frecuencia a la menor sobrevida del injerto renal. El objetivo de este estudio es comparar los resultados de la prueba CDC con los obtenidos usando la plataforma Luminex[®] y evaluar la asociación de ambos métodos para la mejor asignación de riñones en el trasplante. Se estudiaron 109 muestras de sangre que fueron sometidos a trasplante renal, previo consentimiento informado. 1.- Se realizó el grupo sanguíneo y el factor Rh 2.- Se extrajo el ADN a partir de leucocitos de sangre periférica y se realizó la tipificación molecular HLA utilizando para la amplificación *primers* de secuencia específica en el caso de (PCR-SSP) y la amplificación de ADN seguida de la hibridación con sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSOP). 3.- En la prueba CDC el suero se incubó con células de HLA conocido seguido por la adición de suero de conejo como fuente de complemento y se evaluó el grado de muerte celular microscópicamente con el uso de fluorocromos 4.- En la prueba de fase sólida el suero de los pacientes fue analizado para la presencia de anticuerpos IgG anti-HLA clase I y clase II con Luminex utilizando LABScreen®Mixed y LABScreen® PRA[®] respectivamente.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

1.- Una especificidad HLA similar a la reportada por Arrazola y Cols.²⁴ En el 2006 para la población mexicana, encontrándose para el locus HLA-A2 de 35.5%, para el locus HLA-B B35 de 22.24%, para el locus HLA-DR4 de 34.40% y para el locus HLA-DQ8 de 32.79%.

2.- La frecuencia de los haplotipos más comunes en el binomio receptor-donador fueron los siguientes: el HLA-A2 -B39 -DR4 -DQ8 con un 32%, HLA-A24 -B39 -DR4 -DQ8 con 15.59%, HLA-A24 -B39 -DR14 -DQ7 con 13.76%, HLA-A68 -B61 -DR4 -DQ8 con 9.17%, y HLA-A2 -B35 -DR4 -DQ4 con 8.25%.

3.- Otro de los estudios realizados fue el de demostrar la dependencia o asociación entre la prueba cruzada CDC *versus* el resultado obtenido del PRA clase I *versus* PRA clase II. Para ello se utilizó la prueba de chi-cuadrado (X^2) de

Pearson con corrección de Yates, se fijó una p de significancia < 0.05 con un intervalo de confianza del 95%, y las medidas de asociación.

La prueba de chi cuadrado (X^2) de Pearson calculado fue de 84.7204 con 4 grados de libertad y un valor de $p < 0.0001$, y el valor teórico de una distribución X^2 con 4 grados de libertad reportado en tablas fue de 9.49, poniendo en evidencia una notable diferencia estadísticamente significativa,

Los resultados obtenidos en la prueba PRA clase I *versus* PRA clase II.

La prueba de chi-cuadrado (X^2) de Pearson calculado fue de 32.1648 con 1 grado de libertad y un valor de $p < 0.0001$, la corrección de Yates fue de 28.8518 por otra parte el valor teórico de una distribución X^2 con 1 grado de libertad reportado en tablas fue de 3.84 mostrando de igual manera una diferencia estadísticamente significativa, en lo que respecta a las medidas de asociación se observó una asociación completa en ambos casos.

Con los resultados obtenidos de los 109 pacientes se pudo observar un éxito del trasplante del 91.76%.

Se concluye que la prueba cruzada CDC y el %PRA clase I y clase II están asociados significativamente, y que en conjunto con la tipificación serológica HLA proporcionan los datos necesarios de histocompatibilidad para evaluar el riesgo inmunológico del paciente que es sometido a procedimiento de trasplante renal.

El éxito del trasplante depende de evitar la alorrespuesta del receptor frente a las diferencias en los antígenos principales de histocompatibilidad del órgano trasplantado, principalmente del sistema HLA. Se sugiere estudiar en un futuro la presencia de los anticuerpos anti-HLA clase I y clase II en el postrasplante ya que tendría un valor predictivo en el rechazo del injerto y la menor sobrevida del injerto. Además de la determinación de anticuerpos anti-MICA a los cuales se ha sospechado su participación en pacientes que han perdido de un injerto previo con evidencias de rechazo humoral.

1.- INTRODUCCIÓN

En México la incidencia y prevalencia de la enfermedad renal terminal ha ido en aumento cada año en todo el mundo. La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, el número de pacientes se está incrementando tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo.⁶ En el IMSS representa la tercera causa de muerte hospitalaria, como consecuencia, cada vez es mayor la necesidad de recurrir a procedimientos de diálisis o hemodiálisis que no solo se asocia con la reducción de la calidad de vida si no que también se incrementa progresivamente el costo de la atención, motivo por el cual el trasplante renal se ha convertido en el tratamiento de elección ya que mejora la calidad de vida y disminuye el costo a largo plazo.⁵ Sin embargo, el rechazo contra injerto se ha convertido en la principal barrera del trasplante debido a la producción de anticuerpos contra antígenos HLA (Antígeno Leucocitario Humano) los cuales pueden ser producidos antes o después del injerto, además de asociarse con la menor supervivencia del trasplante contribuyendo al daño o la pérdida del injerto.¹¹ La importancia de las pruebas de compatibilidad en los programas de trasplante es que con la tipificación HLA se determina el grado de compatibilidad que exhibe el binomio receptor-donador para el trasplante.² Se tiene conocimiento que el grado de compatibilidad HLA representa un efecto positivo en el trasplante renal y en la disminución de los episodios de rechazo. Una prueba cruzada citotóxica dependiente de complemento (CDC) positiva, se considera como contraindicación para el trasplante por la presencia de anticuerpos preformados detectables en suero de tipo IgG en contra de los antígenos del donador en estudio, el porcentaje del Panel Reactivo de Anticuerpos (PRA) es útil para conocer el grado de aloinmunización humoral del paciente, además de que permite conocer la especificidad del anticuerpo anti-HLA presente y así evaluar el estatus inmunológico del paciente y la selección del donador.^{2,23} Por lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo es comparar los resultados de la prueba CDC con los obtenidos de la plataforma Luminex[®] y evaluar la asociación de ambos métodos para la mejor asignación de riñones en el trasplante. De esta forma se podrá predecir alguna falla del injerto y determinar el papel que juega en los diferentes tipos de rechazo ya que son pocos los estudios en la población mexicana sobre la presencia de anticuerpos anti-HLA en el rechazo agudo y su relación con la evolución del injerto.

2.- ANTECEDENTES

El concepto de trasplante aparece en muchas culturas a finales del siglo XIX. La sustitución del órgano enfermo por otro sano ha sido un sueño largamente acariciado por la humanidad. La época propiamente científica del trasplante de órganos empieza en el siglo XX, con los primeros intentos de trasplante renal realizados en perros, en todos los casos con localización extra abdominal, cuando se pusieron a punto las técnicas de sutura vascular, En 1902 Ullman, comunicó el autotrasplante de un riñón de un perro. En 1906 Alexis Carrel realizó un alotrasplante renal en un perro mediante anastomosis vascular directa estableciendo los principios básicos de la técnica quirúrgica. Carrel demostró que un autoinjerto puede sobrevivir indefinidamente, pero el aloinjerto rápidamente cesa en sus funciones y postula que el organismo elimina el tejido extraño mediante el bazo o la médula ósea. Sin embargo se encontrarían con otro obstáculo, el rechazo anticipado demostrado por Dempster y Simonsen.

En 1933 YuYu Voronoy realiza el primer trasplante de riñón de humano a humano en Ucrania. Se trasplantó el riñón de un cadáver de grupo sanguíneo B a una enferma de grupo 0. El injerto nunca funcionó y el receptor falleció a los pocos días de la operación.

Un momento histórico en el trasplante renal tiene lugar en 1959 en el cual Calne demostró que la mercaptopurina prolongaba la supervivencia de los riñones trasplantados a perros y en este mismo se empleó por vez primera en un trasplante renal humano. Los trabajos de Calne prosiguieron, demostrando que el imidazol derivado de la mercaptopurina, la azatioprina, era más activa.

En 1940 Peter Medawar estableció las bases inmunológicas del rechazo y tolerancia tisular trabajando con implantes de piel.

En 1952 Jean Dausset describe el complejo principal de histocompatibilidad en los humanos (HLA), lo que permitió primeramente avanzar en el tan soñado campo de los trasplantes dándonos el conocimiento para entender el mecanismo molecular individual en el reconocimiento de lo propio y extraño. Así es como llegamos al primer trasplante renal con éxito absoluto realizado en 1954 Joshep Murray y

colaboradores en el hospital Peter Bent Brigham en Boston, quienes trasplantaron un riñón entre gemelos univitelinos, documentando con esto que el sistema inmunitario era clave para el trasplante óptimo de órganos y tejidos y por consiguiente, el aumento en la supervivencia del injerto. Por otra parte, Paul Terasaki en (1964) desarrolla la técnica básica de Microlinfocitotoxicidad para el estudio de las Pruebas Cruzadas Linfocitarias.^{1, 2.}

En México, se realiza el primer trasplante de riñón en el país por Manuel Quijano, en el Hospital de Especialidades del Centro Médico siglo XXI, IMSS (1963). En este mismo lugar se realiza el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en 1979 y en 1988 el primer trasplante de corazón realizado no solo en el país, sino en toda América latina y el de pulmón (1989) en el Centro Médico La Raza, IMSS.

Dentro de los múltiples avances científicos en el campo de la medicina, el trasplante de un órgano o tejido ha sido una meta afanosamente perseguida ya que la sustitución de un órgano o tejido enfermo por uno sano, representa una acción totalmente curativa, otorgando al paciente que cursa con una disfunción terminal, la oportunidad de recuperar un estado de calidad y vida saludable.^{2, 4.}

La Insuficiencia Renal Crónica (IRC), es una enfermedad silenciosa e irreversible que afecta el funcionamiento de ambos riñones ya que el organismo pierde la capacidad de filtrar las sustancias tóxicas de la sangre. Como consecuencia, cada vez es mayor la necesidad de recurrir a procedimientos de diálisis, hemodiálisis o trasplante renal y por lo tanto se incrementa progresivamente el costo de su atención.^{5, 6.}

Actualmente la Insuficiencia Renal (IR) representa la tercera causa de muerte hospitalaria en la población mexicana, y se le considera un problema de salud pública en nuestro país. Con una incidencia y prevalencia de 548.9/2,698.8 por millón de habitantes según el Sistema de Datos Renal de los Estados Unidos (USRDS por sus siglas en inglés "*United States Renal Data System*). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial se estima que el

riñón es el órgano con mayor demanda para ser trasplantado, teniendo en espera alrededor de 6189 pacientes.^{7, 8.}

Por otra parte, de acuerdo con las cifras reportadas por la fundación mexicana del riñón (FMR), existen actualmente en México 8.3 millones de personas con IR leve, 129 mil personas con IRC y 37,642 personas con tratamiento continuo de diálisis. Así mismo, el Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA) estimó que se deberían realizar 5,000 trasplantes anuales y reportó que en el año 2009 se realizaron un total de 2,378, de los cuales 1805 fueron provenientes de donador vivo y 490 de donador cadavérico.^{9, 10.}

En el IMSS se atiende al año y a nivel nacional, alrededor de 40 mil pacientes en diálisis peritoneal y otros 10 mil reciben tratamiento de hemodiálisis a causa de enfermedades como insuficiencia renal crónica, diabetes e hipertensión, y realiza 1790 trasplantes de riñón al año; Sin embargo, esta cifra no satisface las necesidades que actualmente demanda la población que padece insuficiencia renal, por lo que, es urgente concientizar a las personas sobre la necesidad de ser donantes.

Un trasplante de riñón le cuesta a la institución alrededor de 288 mil pesos, y fuera del Instituto, es de 350 mil pesos, aproximadamente, mientras que en Europa varía entre los 650 mil y casi dos millones de pesos. En cuanto a las expectativas de vida que tienen los pacientes con insuficiencia renal crónica, el tratamiento con diálisis peritoneal le ofrece, a cinco años 43 por ciento de sobrevida; con hemodiálisis alcanza 35 por ciento en el mismo lapso, mientras que para una persona con trasplante de riñón, su sobrevida, en un periodo similar, se incrementa hasta 90 por ciento. Razón por la cual el trasplante se ha convertido en la mejor forma de tratamiento para pacientes con falla renal en estado terminal y en el modo óptimo terapéutico del remplazo renal, incrementando la calidad de vida y prolongando la sobrevivencia de los receptores.^{2, 11.}

El órgano que más se requiere para trasplante es el riñón, seguido de córnea, mientras que el número de pacientes que requieren trasplantes de hígado,

corazón y pulmón es mucho menor. En el caso del riñón y córnea el tiempo promedio de espera es entre 24 y 30 meses.¹⁰

3.- GENERALIDADES

3.1.- El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (del inglés MHC *Major Histocompatibility Complex*) llamado sistema HLA en humanos (del inglés *Antigen Leucocyte Human*), está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3), tiene alrededor de 3600 kilo bases y se divide en tres regiones, la región clase I que contiene los genes clásicos HLA-A, HLA-B, HLA-C, que codifican para las cadenas pesadas de las moléculas clase I. La región clase II contienen los genes A y B que codifican a las cadenas alfa y beta. La familia de genes DR consiste en un gen DRA y nueve DRB (DRB1-DRB9), la especificidad antigénica HLA-DR es determinada por la cadena polimórfica DR β 1 que codifica para los alelos DRB1. Las familias DP y DQ cada una expresa genes para las cadenas α y β y pseudo genes no expresados. La región clase III no codifican a moléculas HLA, pero tiene genes para componentes del complemento, factor de necrosis tumoral y algunos otros.¹²

3.1.1.- Estructura, organización genética y función del sistema HLA.

Todos los genes del sistema HLA se hallan situados en una región cercana al centrómero en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.31-6p21.32). La región abarca una distancia de unos 4.1 Mb y contiene más de 200 *loci*. Los *loci* están agrupados físicamente en tres regiones, llamadas clase I, clase II y clase III (*Figura 1*). Los *loci* de clase I se hallan más cerca de la zona telomérica que los de clase II.

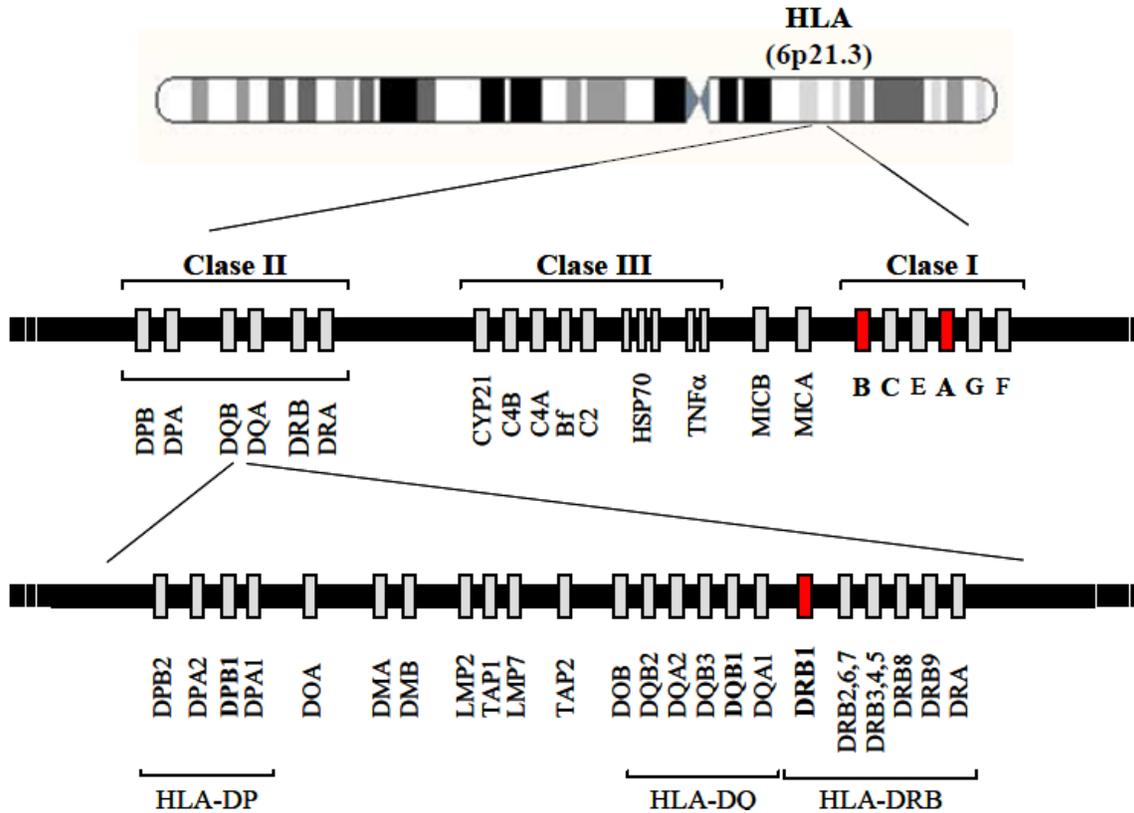


Fig. 1. Representación de los distintos genes situados en la región 6p21.3. Se muestran en negrita los genes empleados en el trasplante alogénico (-A, -B, -DRB, -DQB1 y -DPB1), resaltándose en rojo los tres empleados en la compatibilidad. (Tomado de Alcoceba Sanchez 2010).

La región de clase I codifica genes de la cadena pesada de las moléculas clásicas de trasplante, HLA-A, -B, -C, los genes no clásicos HLA-E, -F, -G, MICA, MICB, un número largo de pseudogenes de clase I y otros genes, algunos de los cuales tienen una función desconocida (IMGT/HLA30;31). La región de clase II contiene los genes que codifican las cadenas α y β de los cinco tipos de moléculas de clase II: HLA-DR, -DQ, -DP, -DP y -DM. En esta región hay también otros 4 genes que intervienen en el procesamiento de antígenos; PSMB8 y PSMB9 codifican componentes del proteosoma responsables de transformar proteínas en péptidos; TAP1 y TAP2 participan en el transporte de estos péptidos del citosol al retículo endoplasmático para su unión a las moléculas de HLA y la formación del complejo proteico HLA-péptido.

Finalmente, la región de clase III codifica varias moléculas estructural y funcionalmente distintas, incluyendo las fracciones del complemento C4, C2 y el

factor Bf, la 21-hidroxilasa, el factor de necrosis tumoral (TNF α) y la proteína de choque térmico Hsp70 (*Heat shock protein 70*). El gen del *locus* de la cadena asociada a la cadena α de clase I, la β -2-microglobulina (β 2M), está en el cromosoma 15.

Este grupo de genes tiene herencia mendeliana como caracteres codominantes simples. La región genética de un cromosoma que contiene todos los genes HLA transmitidos en un mismo bloque se denomina haplotipo HLA (*Figura 2*)

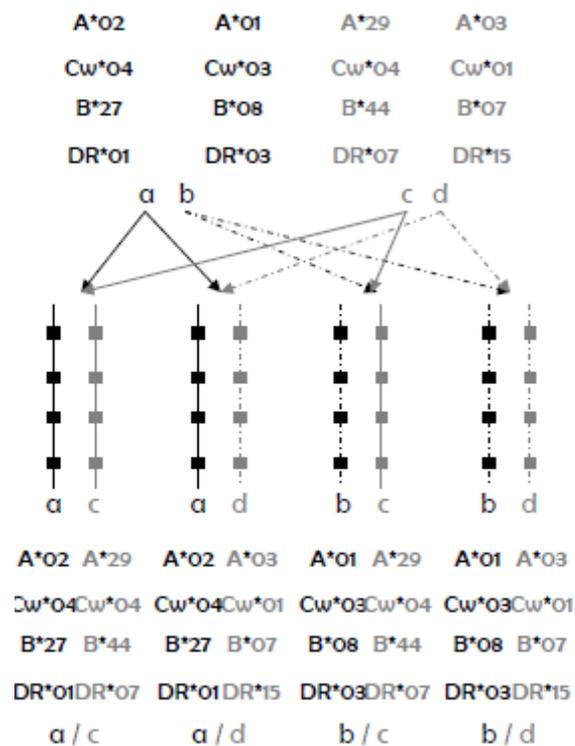


Fig. 2 Herencia de haplotipos HLA (Tomado de Alcoceba Sanchez 2010).

Todas las proteínas del sistema HLA se localizan en la membrana plasmática en forma de dímeros, presentando su mayor parte al exterior de la célula. La relevancia práctica del HLA se basa principalmente en aquellos *loci* cuyos productos génicos son proteínas heterodiméricas que se expresan en la superficie celular, jugando un papel crítico en el reconocimiento y en la respuesta inmune. Las estructuras de las proteínas de clase I y II están relacionadas, aunque tienen distintos componentes.

Las moléculas de clase I consisten en dos cadenas polipeptídicas, una larga de 346 aminoácidos (cadena pesada) y una corta (cadena ligera) de 99 aminoácidos, la β -2-microglobulina.

La cadena pesada consiste en 5 regiones principales o dominios: Tres dominios extracelulares, designados como α 1 (incluye el N'-terminal), α 2 y α 3; un dominio transmembrana donde la cadena polipeptídica pasa a través de la membrana de la célula; un dominio citoplasmático (donde está el C'-terminal) dentro del citoplasma celular.

Los dominios externos α 1 y α 2 contienen dos segmentos de alfa hélice que forman dos cadenas con un surco entre ellas. Los péptidos (de un tamaño entre 8-19 aa) presentados por las moléculas de HLA de clase I son de origen endógeno y se une no covalentemente en el surco entre las dos cadenas alfa. La cadena ligera, constituida por la molécula β -2-microglobulina, se une mediante interacciones no covalentes al dominio α 3. Este dominio contiene una región conservada de unión a la molécula CD8 del linfocito T. Un esquema de esta estructura puede observarse en la Figura 3A.

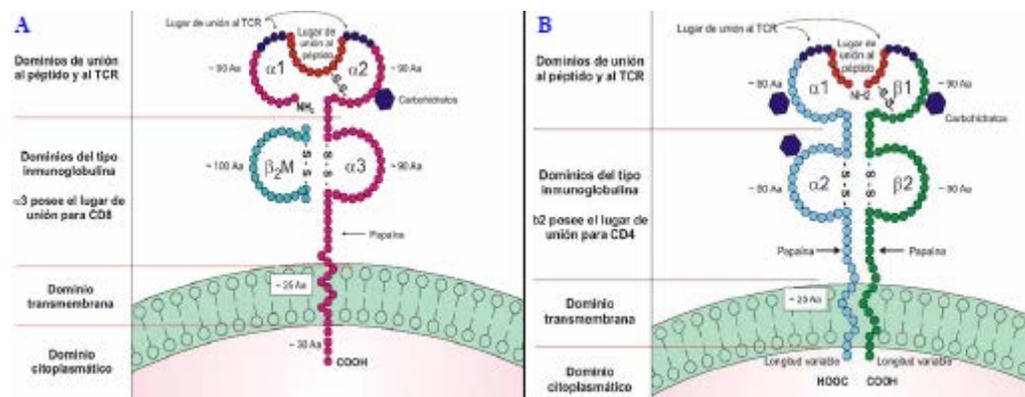


Fig. 3. Estructura polipeptídica de las moléculas HLA clase I(A) y Clase II (B). (Tomado de Alcoceba Sanchez 2010).

Las moléculas de clase II, a diferencia de las de clase I, están constituidas por dos polipéptidos transmembrana, cada una con dos dominios extramembrana (α 1 y α 2, β 1 y β 2) unidos mediante enlaces no covalentes. Interactúan para formar un surco a la cara exterior (formado por los dominios α 1 y β 1) que, al igual que en las

moléculas de clase I, es el lugar de unión del péptido, si bien estos son de mayor tamaño (12-24 aa).

Así mismo, el dominio $\beta 2$ contiene una región conservada de unión a la molécula CD4 del linfocito T (Figura 3B). Al contrario del origen endógeno de los péptidos unidos a moléculas de clase I, los fragmentos antigénicos (péptidos) unidos a moléculas de clase II derivan de antígenos de origen exógeno. Las moléculas extracelulares son internalizadas por endocitosis. Los endosomas se fusionan con lisosomas y su contenido es digerido parcialmente. Los fragmentos resultantes se colocan en moléculas de clase II y retornan a la superficie celular.^{12, 13.}

3.1.2.- Presentación de antígenos.

Las moléculas HLA de clase I se encuentran en todas las células nucleadas. Por el contrario, las moléculas de clase II sólo se expresan en ciertos tipos de células especializadas en el procesamiento y presentación extracelular de antígenos a los linfocitos T, tales como macrófagos y linfocitos B. Además, los fragmentos de antígenos mostrados por las moléculas de clase I se generan por macromoléculas sintetizadas dentro de la célula, mientras que las de clase II son moléculas adquiridas en el exterior de la célula.

Las moléculas HLA presentan fragmentos de antígenos a diferentes subpoblaciones de linfocitos T, la mayoría de los cuales pertenecen a uno de los dos subtipos CD4+ ó CD8+. Ambos subtipos de linfocitos tienen un receptor de antígenos (TCR) que reconoce un epítipo del antígeno presentado. Además de la interacción de la molécula de HLA con el TCR, es necesaria la participación de las moléculas CD4 y CD8. Así, las moléculas CD8 de los linfocitos T CD8+ se unen a un sitio localizado únicamente en las moléculas de histocompatibilidad de clase I (dominio $\alpha 3$), mientras que las moléculas CD4 de los linfocitos T CD4+ se unen al dominio $\beta 2$, exclusivo de las moléculas de histocompatibilidad de clase II. Un resumen de las principales características de las moléculas clásicas de clase I y II que intervienen en el reconocimiento y respuesta inmune se encuentra en la tabla 1.^{12, 13, 14.}

Tabla 1. Breve descripción de las moléculas clásicas del sistema HLA. (Tomado de Alcoceba Sanchez 2010).

	HLA-Clase I	HLA-Clase II
Cadenas	1 polimórfica alfa y	2 alfa y beta
Tipos	1 no polimórfica	DR, DP y DQ
Presentan	A, B y C	Antígenos extracelulares
Expresión	Todas las células excepto hematíes	Macrófagos, Dendríticas, Langerhans, Kuppfer, algunas endoteliales. Linfocitos B
Inducen	Respuesta citotóxica	Activación de células cooperadoras

3.1.3.- Nomenclatura.

En la actualidad hay en uso dos formas de nomenclatura HLA: Serológica: establecida en 1975 y modificada en 1984, se basa en las especificidades (epítopes) de los productos de los genes HLA definidos por técnicas inmunológicas serológicas o celulares. 2) Molecular: establecida en 1987 y se basa en alelos definidos por secuenciación.

Las técnicas serológicas y celulares son técnicas inmunológicas que detectan determinantes o epítomos de los productos genéticos del HLA. Cuando un epítomo se da en más de un producto genético HLA se definen grupos de alelos más que alelos individuales. Este fenómeno creó al principio un proceso denominado “*splitting*”.

Por ejemplo, el HLA-A10, reconocido como nueva especificidad en 1970, fue considerado como un producto genético distinto. De hecho, el antisuero que definía el HLA-A10 en realidad reconocía un epítomo público o con reactividad cruzada, común a varias especificidades más concretas. Después se vio que el suero reaccionaba con varias subpoblaciones específicas de células A10 que se podían distinguir unas de otras con otros antisueros (A25, A26, A34 Y A66). Estas subpoblaciones fueron denominadas “*splits*” o especificidades “subtípicas” que quedaban incluidas en la especificidad A10, más amplia. Los *splits* en realidad son productos genéticos HLA concretos que parecen compartir epítomos comunes definidos serológicamente.

Así, podemos definir a las especificidades (“*splitting*”) como el descubrimiento de productos genéticos que previamente se creían eran únicos que en realidad son múltiples mediante el empleo de procedimientos moleculares genéticos o bioquímicos con mayor poder de discriminación. Este proceso todavía continúa.

En la nomenclatura molecular los alelos específicos son designados mediante un asterisco seguido de un número de hasta 7 dígitos (Tabla 2). Los dos primeros dígitos indican la especificidad serológica más estrechamente relacionada, si bien recientemente se utilizan para indicar la similitud estructural de nuevos alelos con los miembros de un grupo ya definido, incluso aunque estos puedan no ser serológicamente similares o la serología no esté clara. Los dígitos tres y cuatro definen la especificidad alélica. Por ejemplo, la especificidad serológica HLA-A1 en realidad comprende más de 45 alelos distintos, que se denominarían desde HLA-A*0101 hasta HLA-A*0145. Hay que destacar que estas variantes alélicas diversas, definidas por secuenciación, son análogas al proceso de “*splitting*” previamente descrito para las especificidades descritas por serología. La nomenclatura de ciertos alelos contienen un 5º y 6º dígito, como el HLA-Cw*020201 y *020202, en la que dichos dígitos indican que hay dos o más variantes por una sustitución nucleotídica silente, en la que se cambia una base sin que tenga repercusión en la secuencia aminoacídica. La nomenclatura de algunos alelos puede tener un 7º y un 8º dígito para indicar que hay polimorfismos en una región no codificante del alelo. Cuando se encuentra una variante alélica por alteración de la secuencia en una región nucleotídica no codificante los dígitos 02 se añaden a la designación, quedando la 01 como la normal y la 02 como la polimórfica. Por último, se pueden añadir una N o una L de forma opcional en algunos alelos, en los que la N indica que el producto no es expresado (N) o es expresado con un nivel muy bajo (L). En la tabla 2 se puede ver un ejemplo de esta nomenclatura.

Tabla 2. Ejemplos de especificidad en función del número de dígitos en la nomenclatura. (Tomado de Alcoceba Sanchez 2010).

Nomenclatura	Indica
HLA	Región HLA y prefijo para un gen HLA
HLA-DRB1	Un <i>locus</i> particular de HLA por ejemplo DRB1
HLA-DRB1*13	Un grupo de alelos que codifican el antígeno DR13
HLA-DRB1*1301	Un alelo específico HLA
HLA-DRB1*1301N	Un alelo nulo
HLA-DRB1*130102	Un alelo que difiere por una mutación sinónima
HLA-DRB1*13010102	Un alelo que contiene una mutación fuera de la región codificante
HLA-DRB1*13010102N	Un alelo nulo que contiene una mutación fuera de la región codificante

Cuando se lleva al cabo una tipificación molecular HLA, la nomenclatura molecular debería asignarse de acuerdo con el nivel de discriminación del procedimiento empleado. Si el procedimiento no es capaz de discriminar entre variantes moleculares del HLA-A2, por ejemplo, lo apropiado es asignar al resultado la nomenclatura HLA-A*02. El estudio con los dos primeros dígitos se denomina baja resolución, ya que no llegan a discriminar entre alelos, pero permite definir entidades de similitud estructural. Los estudios de alta resolución permiten discriminar entre alelos, y se identifican con el tercer y cuarto dígito.

El sistema HLA es probablemente el sistema genético más polimórfico del ser humano, y prueba de ello son los más de 5,000 alelos descritos hasta enero de 2011 en la base de datos del Instituto Anthony Nolan (Inglaterra) (Tabla 3).

Si hubiera una distribución aleatoria de los alelos HLA, existirían unos 10^{23} genotipos únicos HLA-A, -B, -C, -DR y -DQ. Sin embargo, se sabe que los distintos alelos HLA se heredan en haplotipos, por lo que los alelos de diferentes *loci* no se asocian al azar. Así, se observa una asociación más frecuente de ciertos alelos con otros en comparación con la frecuencia que cabría esperar si la asociación fuera aleatoria en base a sus frecuencias alélicas, lo que se conoce como desequilibrio de unión. Este hecho permite la presencia de haplotipos más frecuentes. Además, la frecuencia de los distintos alelos varía entre poblaciones.

14,15.

Tabla 3. Numero de alelos descritos y validados a enero del 2011, de las moléculas clásicas HLA clase I y II. (Tomado de base de Datos IMGT/ HLA).

Molécula	Locus	Alelos (ADN)
HLA-A	A	1519
HLA-B	B	2069
HLA-Cw	Cw	1016
HLA-DRB1	DRB1	873
HLA-DPB1	DPB1	145
HLA-DQB1	DQB1	144

3.1.4.- El sistema HLA y el trasplante.

Los antígenos HLA-A, -B, -DR, en el trasplante han sido durante mucho tiempo los más conocidos. Recientes estudios indican que la compatibilidad HLA-Cw también tiene efecto en los resultados clínicos del trasplante de células madre hematopoyéticas y que las células B y T son importantes en el rechazo del injerto ya que los linfocitos T reconocen péptidos derivados de células del donador en asociación con las moléculas HLA en el injerto. Las células cooperadoras T CD4+ se activan por las células presentadoras de antígenos llevando moléculas HLA clase II. Las células presentadoras de antígenos (CPA) provenientes del donador o receptor pueden activar los receptores de células T. La presentación de CPA del donador, causa en el injerto la directa activación de los receptores de células T cooperadoras. Los receptores de CPA pueden adquirir aloantígenos a partir del injerto, procesando péptidos y presentado a células T cooperadoras para desarrollar la activación indirecta. El alorreconocimiento directo de células T juega un papel importante en el rechazo agudo y el alorreconocimiento indirecto de células T en el comienzo del rechazo crónico.

Los anticuerpos se enlazan al injerto fijan complemento y causan daño al endotelio vascular, resultando en trombosis, agregación plaquetaria y hemorragia. El rechazo hiperagudo ocurre en pacientes quienes ya tienen anticuerpos específicos dirigidos contra el injerto. Los anticuerpos naturales contra el grupo sanguíneo del sistema ABO y los anticuerpos pre formados inducen al rechazo hiperagudo. Los anticuerpos naturales anti-A, anti-B causan rechazo hiperagudo porque los antígenos AB se expresan en células endoteliales del injerto. La aloinmunización

HLA puede ser inducida por transfusiones sanguíneas, embarazos y trasplantes previos. El rechazo hiperagudo puede ser evitado en la mayoría de los casos por un idéntico ABO y por la confirmación negativa de la prueba cruzada linfocitaria. El rechazo agudo es principalmente el resultado de la respuesta mediada por células T. El rechazo crónico puede ser debido a anticuerpos y la mediación de la respuesta celular.¹²

3.1.5.- Trasplante de órganos sólidos.

El incremento en el número de pacientes en espera de un donador de órgano cadavérico y la lista nacional de espera en la UNOS (*United Network for Organ Sharing*) excede los 94000. Todo el potencial de donadores de órganos cadavéricos es registrado por la UNOS. Esta toma en cuenta la compatibilidad HLA, tiempo de espera, estado de aloinmunización HLA, edad y previa donación de órganos. Los candidatos a trasplante pediátricos y con PRA de 80% o más altos se les dan preferencia.^{12, 16.}

Los beneficios de la compatibilidad HLA está bien establecida en el trasplante de riñón. Hay una clara relación entre el grado de compatibilidad HLA y la sobrevivencia del riñón implantado en trasplante de donadores vivos. Mejores resultados se obtienen en HLA a partir de donadores hermanos que con parientes con HLA haploidénticos ya que la segregación de haplotipos entre una familia puede ser asignado por estudios de HLA familiares. Dos hermanos tienen un 25% de probabilidad de ser haploidénticos (comparten un haplotipo) y un 25% de probabilidades de que no compartan haplotipos.^{12.}

El trasplante de riñón a partir de donadores no relacionados presentan sobrevivencia del injerto superior al trasplante de donadores cadavéricos (excepto por la compatibilidad de seis antígenos).^{17, 18.}

Se ha demostrado que anticuerpos anti-HLA son la principal barrera en el rechazo crónico en el trasplante de riñón. Los anticuerpos pueden destruir células en minutos *in vitro* y puede tomar meses o años para producir endotelio vascular crónico que últimamente obstaculiza el injerto. La carencia de donadores

apropiados por receptores altamente sensibilizados, hace que el acceso a un trasplante sea muy difícil resultando en un incremento significativo en el tiempo en la lista de espera y el número de complicaciones pos trasplante en esos pacientes. El trasplante mismo se asocia con alto riesgo de sensibilización. La fuerte correlación entre anticuerpos donador específicos (DSA) y rechazo del injerto se ven inmediatamente después del trasplante y las complicaciones en tiempo prolongado tales como la nefropatía crónica aloinjerto que pueden ser una explicación simple para estos efectos. Evidencias actuales sugieren que la detección temprana de DSA pos trasplante pueden servir como un excelente marcador para el pronóstico de la función del injerto. Otros estudios sugieren que cuando la falla del injerto ocurre después del primer año esta puede usualmente ser atribuida a la recurrencia o enfermedad de *novo* del riñón, toxicidad con fármacos, rechazo agudo tardío o nefropatía crónica aloinjerto.^{19, 20, 21,22.}

En un trasplante de órganos sólidos se requiere una tipificación HLA exacta además de una compatibilidad en la prueba cruzada linfocitaria para prevenir el rechazo del injerto.

3.1.6.- Pruebas de Laboratorio EXISTENTES.

Actualmente hay, tres pruebas diferentes de uso general, la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), la prueba en fase solida por citometría de flujo en particular la metodología Luminex® y los métodos moleculares como son la tecnología basada en PCR-SSP y PCR-SSO que es usada en la tipificación de HLA. Los anticuerpos HLA se producen contra epítopes de reacción cruzada de otras especificidades, y puede ser detectado por el panel de anticuerpos reactivos de rutina (PRA). El significado clínico de los anticuerpos HLA en trasplantes depende de su capacidad para activar el complemento. Estos avances tecnológicos combinados con un mejor entendimiento de los epítopes de los antígenos HLA han proporcionado una mayor eficiencia.^{2,17, 23,}

La citotoxicidad celular dependiente de complemento (CDC) ha sido usada como el estándar para la tipificación serológica de antígenos clase I y II. El cual involucra

la incubación del suero de prueba con células de tipo HLA conocidas, seguidas por la adición de suero de conejo como fuente de complemento y el uso de linfocitos T y B para evaluar el grado de muerte celular, el uso de antiglobulina humana como anticuerpo secundario y el uso extenso de tiempos de incubación.

El método Luminex® detecta simultáneamente anticuerpos clase I y II, usando microesferas cubiertas con antígenos purificados y el moderno establecimiento del PRA en porcentaje para la especificidad de anticuerpos clase I y II.

En algunos estudios se ha observado que las perlas cubiertas con antígenos purificados en la plataforma Luminex® es más sensible y específico que la prueba CDC en la detección de anticuerpos clase I y II de tipo IgG. Luminex® tiene un mayor valor predictivo, hay evidencia de que los anticuerpos clase II están fuertemente asociados en el rechazo crónico, los anticuerpos HLA-DP juegan un papel importante en el proceso de rechazo, detecta niveles bajos de anticuerpos.

En otros estudios se ha observado que la prueba CDC detecta anticuerpos IgM pero no identifica la especificidad de anticuerpos anti-HLA clase II, y a todos los pacientes en lista de espera se les realiza la prueba CDC y Luminex LABScreen Mixed® y el análisis específico se realiza usando Luminex LABScreen PRA®.^{25,26,27.}

3.1.7.- Pruebas de laboratorio clínico de HLA.

En los programas de trasplante se realizan varias pruebas de laboratorio clínico; que incluyen la tipificación potencial de HLA en receptores y donadores, tamizado e identificación de anticuerpos anti-HLA en receptores y la detección de anticuerpos en el receptor que son reactivos con los linfocitos de un donador (crossmatching), anticuerpos anti-MICA, pruebas cruzadas utilizando precursores endoteliales, por captación de aloantígenos solubilizados del donante sobre fase sólida.^{12,23.}

3.1.8.- Tipificación serológica de antígenos HLA.

La técnica de microlinfotoxicidad mediada por complemento ha sido usada como el estándar para la tipificación serológica de antígenos clase I y II. La tipificación del suero HLA es obtenido a partir de mujeres multíparas aloinmunizadas y su especificidad HLA es determinada por un panel con un tipo de HLA conocido. También son usados algunos reactivos de anticuerpos monoclonales que derivan de ratones inmunizados.

Los linfocitos de sangre periférica expresan antígenos de clase I que son usados para la tipificación serológica de HLA-A, HLA-B, HLA-C y la tipificación de HLA clase II se realiza con linfocitos B aislados a partir de sangre periférica porque esas células son las que expresan moléculas de clase II. La tipificación de HLA es realizada en una placa con multipozos, cada pozo contiene un suero con HLA de especificidad conocida. Los linfocitos son agregados en cada pozo de la placa y se incuba y se adiciona complemento (proveniente de suero de conejo), para mediar la lisis de linfocitos enlazados a anticuerpos. La nomenclatura del sistema HLA es establecida formalmente por el comité de nomenclatura de la OMS.^{12.}

3.1.9.- Tipificación molecular de alelos HLA.

Estudios han revelado que hay un extenso polimorfismo del HLA. Serológicamente las variantes o subtipos indistinguibles de antígenos HLA clase I y II fueron identificados, y esas variantes son diferentes del tipo silvestre por sustitución de algunos aminoácidos pero pueden ser funcionalmente distintos y relevantes en la compatibilidad HLA en el trasplante de células madre hematopoyéticas. La tipificación molecular basada en la reacción en cadena de la polimerasa PCR permite diferenciar productos alélicos HLA indistinguibles serológicamente y funcionalmente distintos.^{12, 16.} El primer método emplea Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Especifica (SSOP) y para la tipificación de HLA clase II, se amplifican las secuencias de exones variables que codifican el primer dominio del amino terminal del gen DRB1 y DBQ1 a partir del DNA genómico. Se diseña una secuencia de oligonucleótidos sintéticos a partir de la región variable

del gen como hibridador con los productos de PCR amplificados en SSOP. Como un método alternativo, las secuencias de DNA polimórfico pueden ser usados como primers amplificadores y en este caso solo las secuencias que contienen alelos complementarios para esos primers serán alineados y se proseguirá a la amplificación. La segunda estrategia de la tipificación de DNA es el método llamado Iniciadores de Secuencia Específica SSP. El desarrollo de la tipificación de alelos HLA clase I se realizó mucho antes que los de clase II.^{2,3.}

3.1.10.- Tamizado de anticuerpos HLA y prueba cruzada linfocitaria.

Los anticuerpos HLA pueden ser detectados probando el suero del paciente contra un panel de linfocitos con un tipo de HLA conocido, la técnica estándar ha sido la microlinfotoxicidad mediada por complemento y la anti-globulina humana ha mejorado el método proporcionándole mayor sensibilidad. Esta prueba ha sido llamada “tamizado de anticuerpos HLA” y el resultado es expresado como porcentaje de células del panel que son reactivas o panel reactivo de anticuerpos (% PRA). Por ejemplo, si 10 células de 40 son reactivas a un suero, el PRA será de 25%. Las células seleccionadas en los pozos de cada panel tienen varios antígenos HLA. La especificidad de los anticuerpos puede ser asignada algunas veces. Esta información es de vital importancia para el probable receptor que recibe el trasplante del órgano ya que predice oportunamente un resultado compatible o una compatibilidad con donadores fallecidos y evitar en el donador una incompatibilidad antigénica específica de HLA. Cuando hay donadores potenciales, se les realiza una prueba cruzada con el suero del receptor y linfocitos del donador para determinar la compatibilidad. Un resultado positivo en la prueba cruzada, es predictivo de riesgo de rechazo del injerto. Los anticuerpos para ambas clases de antígenos I y II respectivamente parecen ser nocivos.

Los métodos alternativos basados en pruebas de ELISA y citometría de flujo basado en fluorescencia o tecnología Luminex® están también disponibles para el tamizado de anticuerpos HLA y la identificación específica de anticuerpos con alta sensibilidad y especificidad. La prueba cruzada linfocitaria usando citometría de

flujo ofrece alta sensibilidad y probablemente es más predictiva de rechazo del injerto en ciertos casos.¹²

3.1.11.- HLA y su asociación con la Enfermedad.

Ciertas enfermedades, especialmente las de naturaleza autoinmune se asocian con particulares tipos de HLA. Los diferentes tipos de asociación varían con la enfermedad y hay generalmente una falta de concordancia entre el tipo de enfermedad y el HLA. El mecanismo exacto para comprender la mayoría de las asociaciones HLA-enfermedad aún no se comprenden y otros factores ambientales y genéticos pueden jugar un papel importante.

Entre la mayoría de las asociaciones están la narcolepsia con un HLA-DQB1*0602/HLA-DRB1*1501. La espondilitis anquilosante con HLA-B27 y enfermedad celiaca con HLA-DQB1*02. Los haplotipos HLA-A1, B8, DR17 son asociados frecuentemente con enfermedades autoinmunes; la artritis reumatoide se asocia particularmente con la secuencia de un aminoácido en la posición 666 a 75 en la cadena DRB1 que es común en los principales subtipos de HLA-DR4 y DR1. La diabetes mellitus tipo 1 está asociada con heterocigotos HLA-DR34 y la ausencia de asparagina en la posición 57 de la cadena DQ β 1 aparece dando susceptibilidad a esta enfermedad. La hemocromatosis hereditaria primaria es una de las más comunes enfermedades hereditarias que se manifiesta por un incremento en la absorción de hierro en la dieta, resultando en depósitos excesivos de hierro en hígado, corazón y órganos endocrinos y finalmente la falla del órgano. Esta enfermedad es determinada por un gen autosómico recesivo y cerca del 10% de la población es heterocigota y 0.5 % homocigota. Las enfermedades genéticas sin identificación han sido postuladas por estar estrechamente relacionadas al locus HLA-A, especialmente el haplotipo HLA-A3.¹²

3.1.12.- Características clínicas de rechazo del injerto.

El rechazo puede ser hiperagudo (ocurre en pocos minutos), agudo (ocurre en semanas o días), agudo tardío (ocurre después de tres meses) o crónico (ocurre en meses o años después del trasplante), este también puede ser clasificado de acuerdo a cambios patológicos (celular-intersticial, vascular, anticuerpos-endoteliales), gravemente (a tal grado de inflamación histológica y daño), respuesta al tratamiento (presencia o ausencia de resistencia a glucocorticoides), presencia o ausencia de disfunción renal (indican rechazo agudo o subclínico, respectivamente), y mecanismos inmunológicos (sistema de respuestas inmune adaptativa o innata).^{14,15, 28.}

3.1.13.- Rechazo mediado por anticuerpos.

Los anticuerpos que pueden mediar el rechazo son aquellos contra moléculas HLA, antígenos de células endoteliales, antígenos de grupos sanguíneos ABO en células endoteliales y glóbulos rojos. La mayoría de los receptores no tienen anticuerpos contra moléculas anti-HLA antes del trasplante a menos que ellos fueran sensibilizados por exposición a aloantígenos en el embarazo, transfusiones sanguíneas o trasplantes previos.^{14, 15, 28.}

3.1.14.- Anticuerpos contra antígenos del sistema ABO.

Antes de proceder a realizar un trasplante debe valorarse la compatibilidad antigénica entre el binomio donador receptor, con la finalidad de optimizar la supervivencia del injerto y minimizar posibles reacciones inmunológicas. De principio tenemos:

La determinación del grupo sanguíneo ABO y Rh.

Su importancia estriba en que están presentes en los endotelios vasculares de diversos órganos. Si se trasplanta un órgano a un individuo ABO incompatible, los anticuerpos naturales llamados isoaglutininas anti-a o anti-B del receptor producen una lesión tisular en el órgano trasplantado, lo que conduce al rechazo. Cabe mencionar que ahora hay evidencias de órganos sólidos trasplantados de manera exitosa con diferencias en grupo. Este tipo de procedimientos se realiza

previa remoción de anticuerpos mediante el uso de plasma aféresis o inmunoadsorción, más la utilización de fármacos inmunosupresores de inducción. El cruzar esta barrera permite que pacientes con tiempos prolongados en lista de espera se vean beneficiados.¹⁴

3.1.15.- Rechazo hiperagudo.

El rechazo del injerto renal ocurre casi inmediatamente, el riñón en lugar de tener un color rosado como resultado de una perfusión normal, aparece flácido y manchado, reflejando un depósito de anticuerpos contra antígenos HLA expresados en el endotelio del glomérulo y microvasculatura. La activación de la cascada clásica del complemento en el injerto es seguida por necrosis endotelial, depósitos de plaquetas y coagulación local. En estos casos el procedimiento inicial del órgano trasplantado usualmente termina con el removimiento del injerto. La detección de antígenos específicos de donador pueden mejorar las pruebas de compatibilidad y eliminar este problema antes de la cirugía.^{14, 28.}

3.1.16.- Rechazo agudo mediado por anticuerpos o rechazo humoral agudo.

El rechazo agudo mediado por anticuerpos empieza días después del trasplante (o en semanas si fue dada una terapia de anticuerpos anti-linfocitos). La principal característica es una rápida disfunción del injerto debido a una inflamación. Una respuesta engendrada por una previa exposición a antígenos rápidamente genera altos títulos de anticuerpos que se fijan al complemento. El blanco principal de esos llamados anticuerpos son antígenos expuestos al MHC por el endotelio de los capilares glomerulares y peri tubulares del donador.

Las células endoteliales dañadas liberan varias moléculas dañinas: factor Von Willebrand, y la P-selectina promueven la agregación plaquetaria: las citocinas y quimiocinas, tales como la interleucina 1alfa, interleucina 8, causan que se adhieran los leucocitos al glomérulo por la dilatación de los capilares; y los quimio attractantes C3a y C5a, una marcada activación del complemento, es frecuentemente encontrada en capilares peri tubulares. C5b desencadena el

acoplamiento al complejo de ataque C5b-C9, los cuales causan necrosis endotelial localizada y apoptosis así como la separación de las células endoteliales de la membrana.^{14, 28.}

3.1.17.- Rechazo vascular.

El rechazo vascular incluye la filtración de vesículas por células mononucleares, y apoptosis de células endoteliales. Las células T CD4, CD8 y macrófagos invaden las arterias musculares sub endoteliales por medio de moléculas de adhesión 1 (ICAM-1) o moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM) en endotelios activados por medio de quimiocinas. Evidencias experimentales sugieren que los anticuerpos anti-MHC, las células T, NK e interferón gamma juegan un papel importante en la invasión de vesículas. El rechazo vascular es una condición severa que no responde al tratamiento con glucocorticoides, requiere fuertes terapias de anticuerpos anti-linfocitos.^{14, 28.}

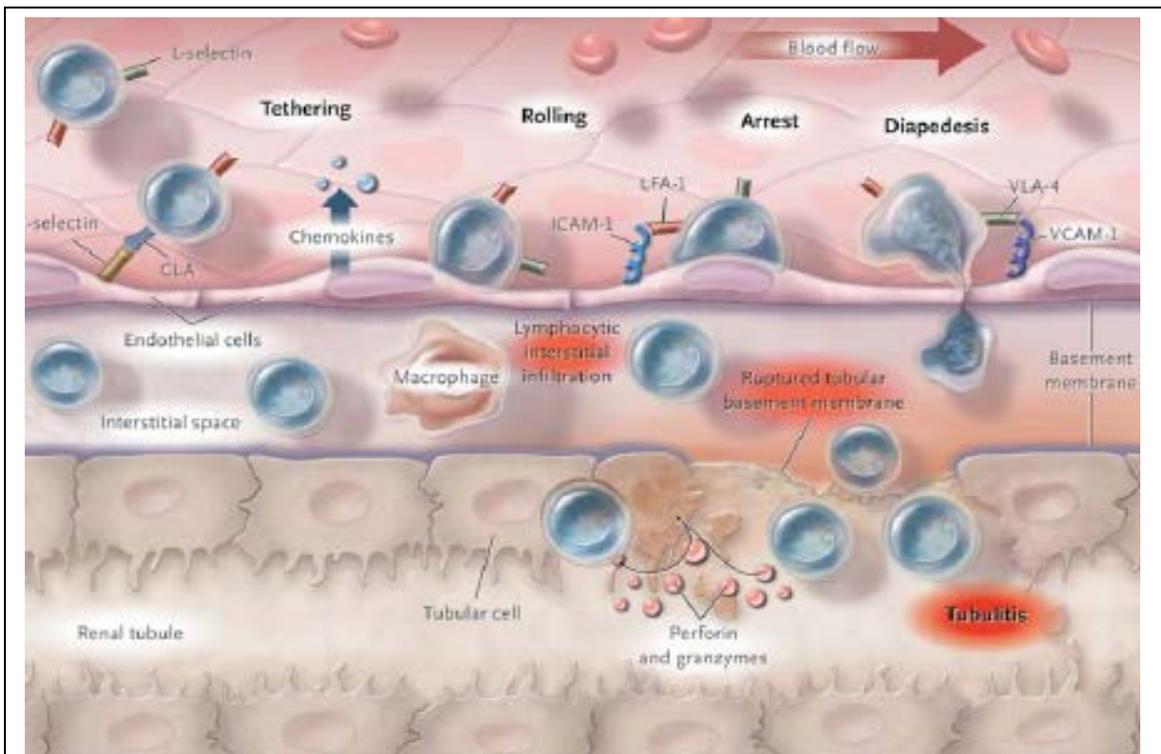


Fig. 4. El rechazo celular y transporte de células en el trasplante. Después de atar, rodar y detener los linfocitos T efectores, (los cuales se enlazan a selectinas e integrinas en células endoteliales), los linfocitos y otras células inmunes entran al espacio intersticial e invaden los túbulos, causando destrucción local del tejido. (Tomado de N ENGL J MED 2010.)

3.1.18.- Rechazo agudo tardío.

El rechazo agudo tardío del injerto es frecuentemente muy severo, hay un alto riesgo de perder el injerto. Su característica principal es activar la inflamación y el daño crónico túbulo intersticial, el cual frecuentemente involucra anticuerpos dirigidos contra el injerto. En receptores del injerto puede desarrollar un alto grado de inmunidad en contra del trasplante.^{14.}

3.1.19.- Rechazo crónico.

El rechazo crónico del injerto prolonga el daño inmunológico del injerto, y es debido a fallas en el mantenimiento de la inmunosupresión para controlar linfocitos residuales anti-injerto o anticuerpos. Sus características incluyen una progresiva disminución de la función renal, invasión del parénquima renal por células T e infiltración persistente del intersticio por células T y macrófagos.^{14, 15, 28.}

3.1.20.- Rechazo crónico mediado por anticuerpos.

Los anticuerpos específicos de donador preexisten sin ser detectados o anticuerpos generados después del trasplante se depositan en los capilares endoteliales. El daño endotelial por capilares peritubulares y glomerulares causan hipertrofia celular.^{14, 28.}

3.1.21.- Rechazo mediado por células T (Presentación de antígenos).

La forma más común de rechazo agudo se inicia cuando los aloantígenos del donador son presentados a los linfocitos T del receptor por las células presentadoras de antígenos (APC). Las células dendríticas inmaduras dentro del injerto transportan los antígenos del donador desde el órgano trasplantado a los receptores vaciándolos en los nódulos linfáticos y el bazo; durante su viaje, esos antígenos maduran dentro de las APC. Las células dendríticas presentan los antígenos a los receptores. Las APC llegan a los órganos linfoides donde activan a los receptores de las células T, estas células T se diferencian en varios sub grupos y regresan al injerto, donde toman parte en la destrucción del órgano trasplantado.

Las células dendríticas y los macrófagos presentan eficientemente los antígenos a las células T, pero las células B también pueden ser funcionales en esta vía capturando y presentando antígenos con el uso de sus inmunoglobulinas y moléculas clase II del MHC. Incluso las células epiteliales tubulares y endoteliales pueden presentar antígenos y activar las células T.¹⁴

3.1.22.- El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).

La principal característica del MHC, es que contiene los genes del HLA que codifican glicoproteínas altamente polimórficas (moléculas MHC) que activan APC al exponer fragmentos de antígenos (péptidos) a los receptores de las células T, la mayoría de las moléculas del MHC son clase I o clase II. La principal diferencia entre ellas es que las moléculas clase I presentan péptidos derivadas de proteínas internas (ejemplo proteínas virales) a células T CD8 citotóxicas, mientras que las moléculas clase II presentan péptidos derivados de proteínas extracelulares (ejemplo proteínas bacterianas) a células T CD4. HLA idénticos provenientes de injertos de hermanos sobreviven mucho más que HLA desiguales provenientes de injertos de hermanos o de donadores no relacionados. La diferencia en solo unos pocos aminoácidos entre el péptido enlazado al sitio del MHC puede ser suficiente para provocar rechazo del injerto.¹⁴

3.1.23.- Procesamiento de Antígenos.

Las moléculas clase I presentan péptidos derivados de la degradación de proteínas endógenas, virales, bacterianas o propias. La degradación de las proteínas es iniciada por la proteólisis de proteínas ubiquitinadas en el citoplasma por los proteosomas, las proteínas enlazadas a ubiquitina se degradan a fragmentos peptídicos de 4 a 11 aminoácidos, los péptidos producidos en el citosol son transportados al lumen del retículo endoplásmico rugoso por el transportador de péptidos TAP, donde los componentes TAP1 y 2 forman un canal que permiten la importación del péptido al retículo endoplásmico. Por otra parte, dentro del RE se lleva a cabo la unión de la cadena alfa con la calnexina, cuando ocurre el ensamble de la cadena alfa con la beta 2 mioglobina, la calnexina es sustituida por

calreticulina, la proteína ERp57 se une a la tapasina y este a su vez se une a la calreticulina permitiendo la unión del péptido adecuado al nicho de la molécula del MHC clase I, la molécula clase I con el péptido cargado pasa del RE al complejo de golgi y es transferido a la superficie celular donde interacciona con el linfocito T citotóxico que expresa el co-receptor CD8+.

En las moléculas clase II, las proteínas son degradadas en la vía endocítica, la cual internaliza moléculas de la superficie celular que provienen de pinocitosis, por otro lado el proceso continúa en los endosomas produciéndose fragmentos peptídicos, en el RE se realiza el ensamble de las cadenas alfa y beta, la molécula CLIP se asocia a las moléculas clase II manteniendo una conformación inestable y es removido por la molécula HLA-DM. Así, el sitio de unión del péptido de las moléculas clase II queda libre para la asociación de otros péptidos generados. La molécula clase II es entonces estable y se dirige a la superficie de la célula presentadora de antígenos para ser reconocido por el linfocito T CD4+ a través de su receptor.

La presentación de los péptidos antigénicos endógenos o exógenos por las moléculas HLA-clase I y II a los linfocitos T, es la primera señal que necesita el linfocito para activarse. Sin embargo, se necesitan las señales de las moléculas coestimuladoras (CD3, CD28, CD4/CD8) para que el linfocito T realice la síntesis de citocinas (IL2, IL6, IL1) y elimine a las células.³⁵

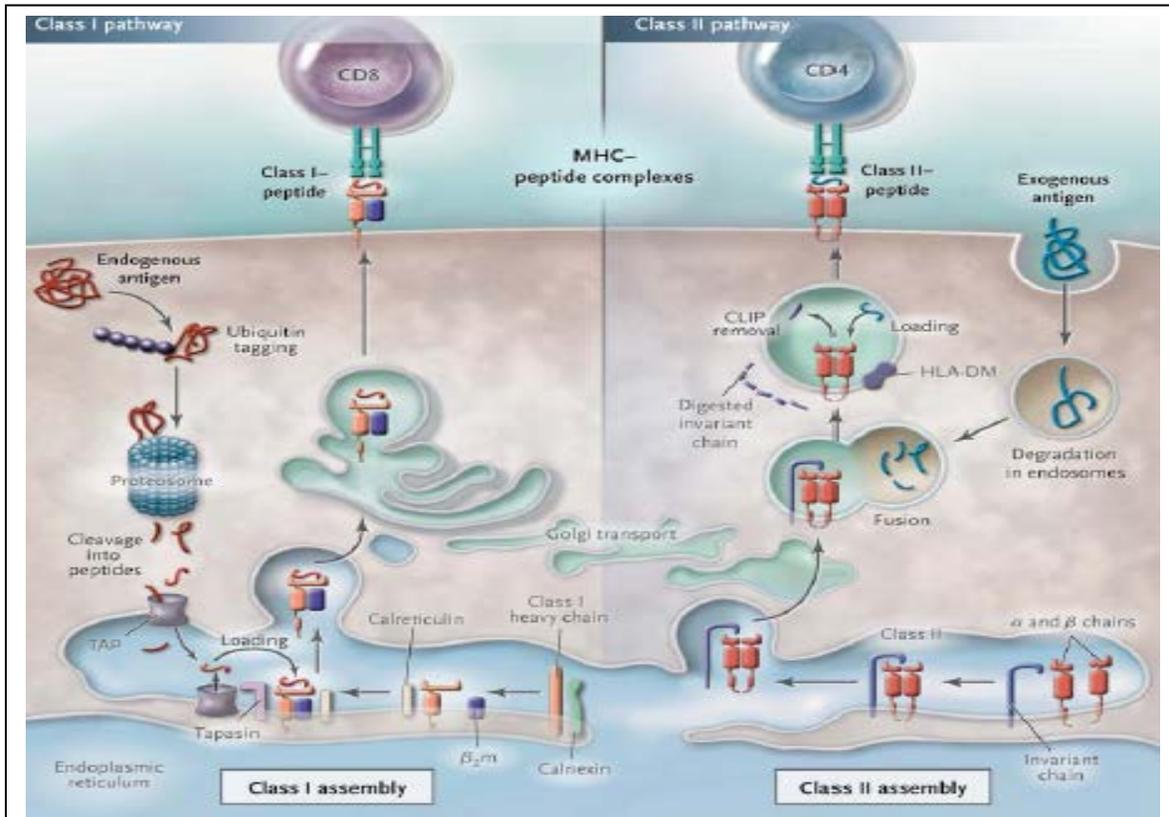


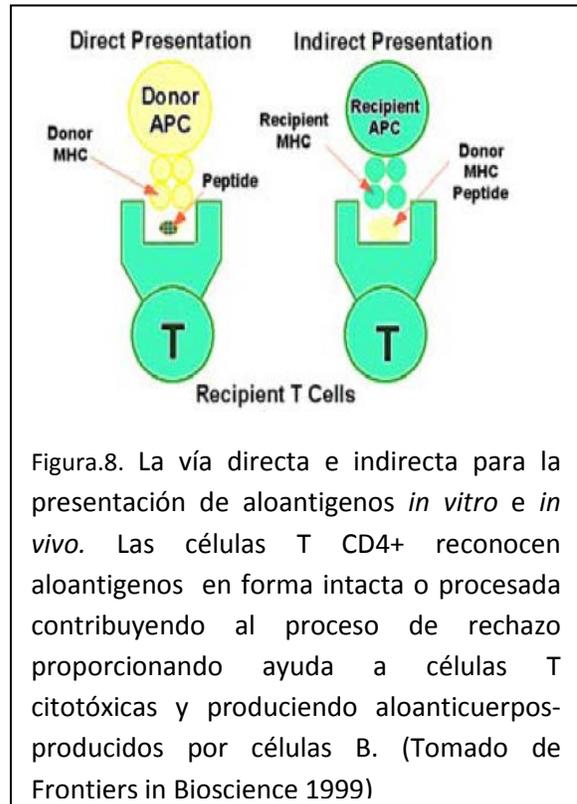
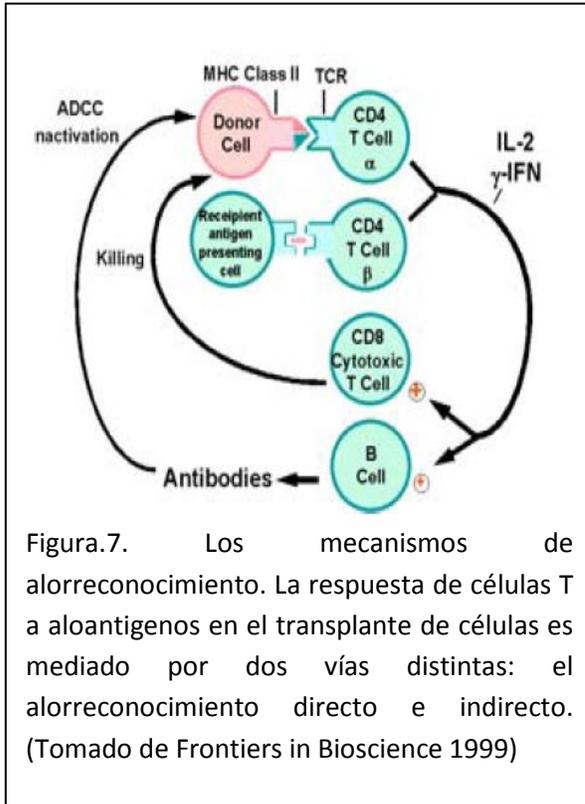
Fig.5. Procesamiento de antígenos endógenos y exógenos por MHC clase I y clase II.

Los antígenos endógenos son digeridos a péptidos por el proteosoma y se acoplan en moléculas MHC clase I. los antígenos exógenos se degradan dentro de los endosomas y se acoplan en moléculas clase II. El ensamble de las moléculas MHC dentro de las células del retículo endoplasmico precede su transporte a través del aparato de golgi y finalmente se expresa a lo largo de la superficie un péptido, donde interacciona el complejo MHC-péptido con linfocitos T CD4+ o CD8+. La beta-2 microglobulina y la asociación del CLIP clase II al péptido de cadena variante y la asociación del transportador TAP con el procesamiento del antígeno. (Tomado de N ENGL J MED 2010.)

3.1.24.- Reconocimiento de aloantígenos por células T.

El alorreconocimiento se refiere a la capacidad que tienen las células T de reconocer genéticamente diferentes moléculas MHC y ocurre por dos distintas vías. En la vía directa las células T alorreactivas reconocen moléculas MHC del donador en las APC que son pasajeras en el tejido trasplantado. En la vía indirecta, en el hospedero las APC procesan los antígenos derivados de moléculas

MHC del donador y las presentan a las células T alorreactivas, después las células T nativas reciben señales que se activan en tejidos linfoides.¹⁴



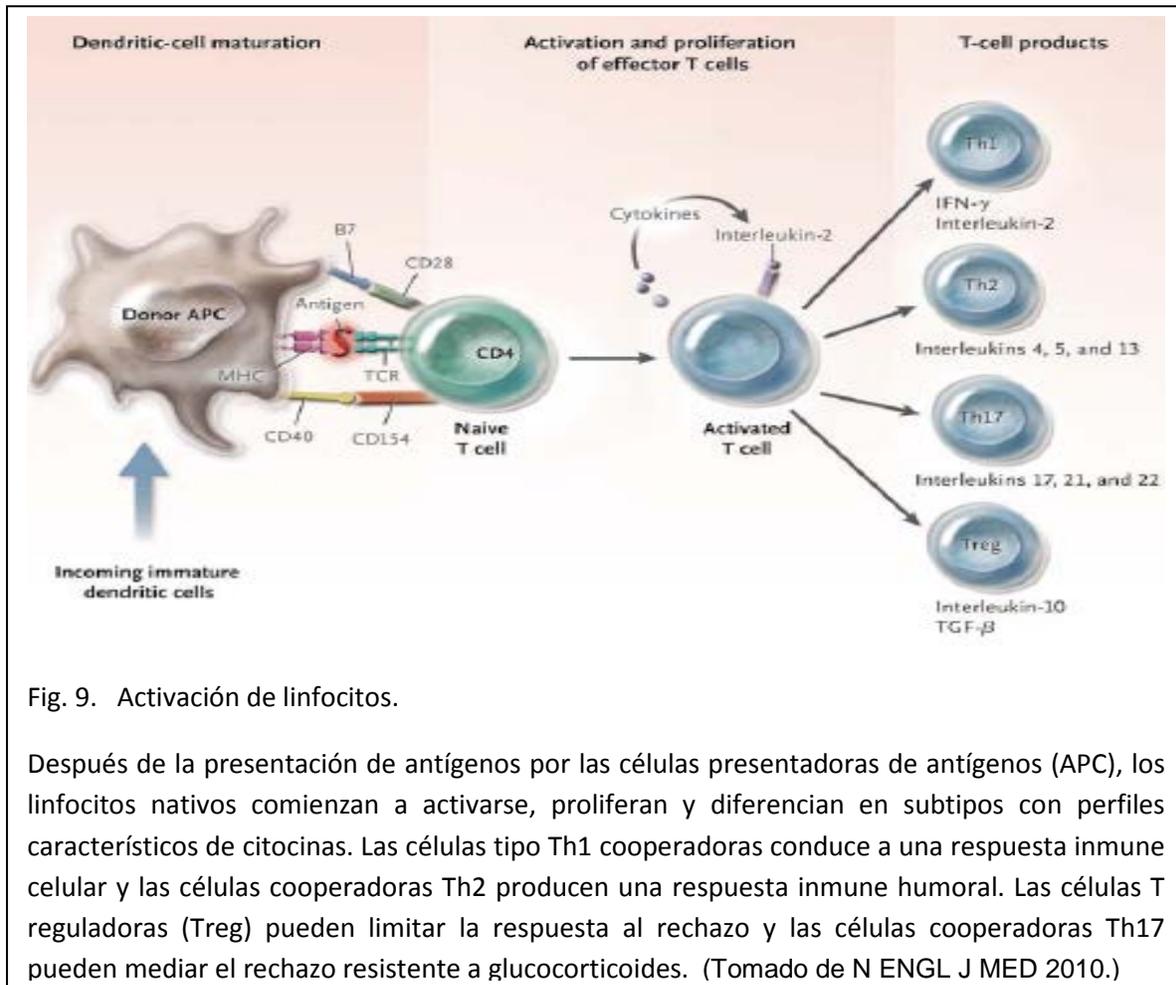
Al inicio del rechazo del injerto, solo unos pocos antígenos son reconocidos indirectamente por células T, pero la vía indirecta empieza a aumentar importantemente. Después las células APC del donador desaparecen y las del receptor pueden también captar fragmentos de la membrana de otras células; esos fragmentos contienen moléculas MHC “predigeridas”, los péptidos derivados de glucoproteínas del MHC del donador (vía semi-directa). Las APC pueden presentar péptidos complejos del MHC a las células T CD4, que regresan y activan a las células T CD8.^{14, 30.}

3.1.25.- Subgrupos de células T.

Los subgrupos de células T cooperadoras tienen distintas citocinas. Las células Th1 median el rechazo mientras que las Th2 promueven la tolerancia, ya que las células Th2 solo pueden rechazar injertos, usando vías que involucran eosinófilos. Aunque las células T CD4 producen citocinas proinflamatorias (interferón gamma, interleucina 2) que

conducen a una respuesta celular, y la interleucina 4, interleucina 5 e interleucina 13 producen una respuesta humoral y las células T CD8 median citotoxicidad.

Las células T reguladoras (Treg) que expresan el factor de transcripción FOXP3 que es la base de muchos tipos de tolerancia en modelos animales; sin embargo en humanos aumenta durante el rechazo agudo del injerto.^{14, 28.}



3.1.26.- Respuesta inmune innata en alotrasplantes.

Poco después del trasplante del órgano sólido, los antígenos independientes del injerto causados por el órgano obtenido y el daño por isquemia/reperfusión promueven inmunogenicidad vía señales peligrosas que conducen a la activación de células APC derivadas del donador. La vía directa de alorreconocimiento describe cuál célula dendrítica (DC) derivada del donador “pasajera” experimenta

maduración funcional en respuesta a moléculas peligrosas asociadas. De esta manera las células T nativas alorreactivas empiezan a estimularse, transicionan a efectoras, y entran directamente al injerto. Otras células del sistema inmune innato, como neutrófilos, macrófagos y células NK, rápidamente infiltran el aloinjerto en respuesta a señales inflamatorias y promueven el daño por mecanismos pro inflamatorios o por mantenimiento de la actividad de células T alorreactivas.^{30, 31}

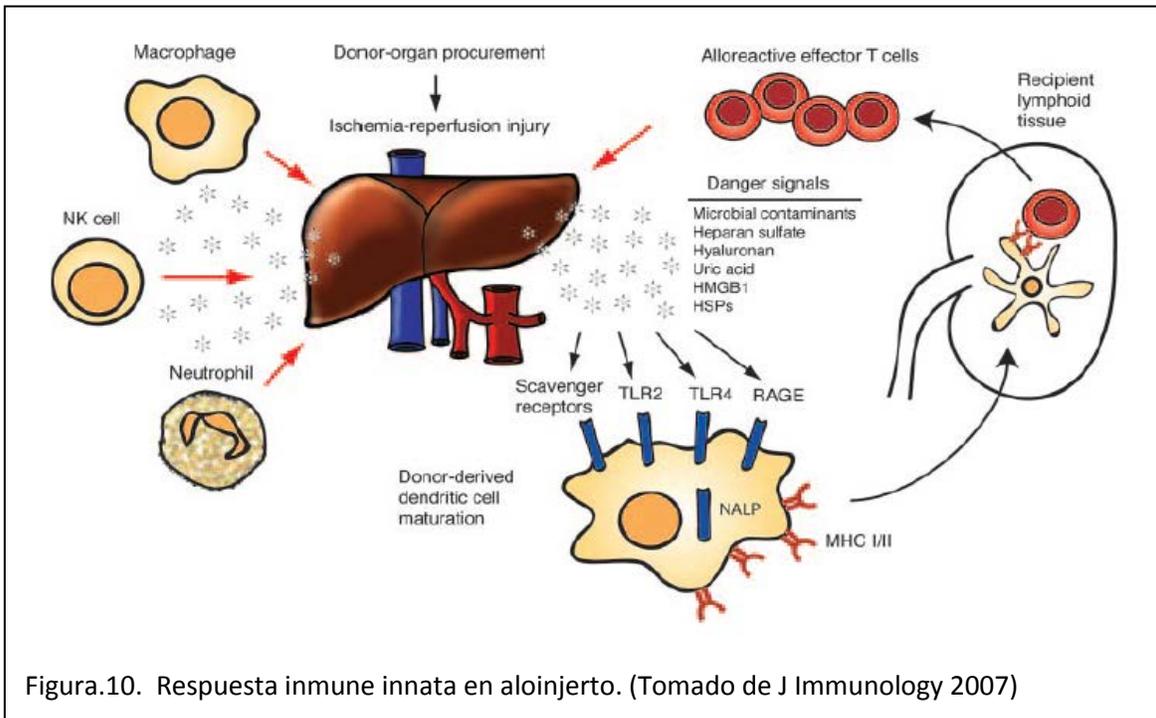


Figura.10. Respuesta inmune innata en aloinjerto. (Tomado de J Immunology 2007)

4.0.- Objetivo General.

Realizar un tamizado de anticuerpos anti-HLA en pacientes candidatos a trasplante de riñón y donadores de riñón utilizando la tecnología Luminex® en paralelo con la prueba CDC para evaluar su asociación en la asignación de riñones en el trasplante.

4.1.- Objetivos Particulares.

- Realizar la tipificación HLA utilizando métodos moleculares como PCR-SSP/SSO para determinar las frecuencias de los haplotipos más comunes en el binomio receptor-donador.
- Determinar aloanticuerpos por citotoxicidad dependiente de complemento.
- Evaluar el grado de sensibilización a través del %PRA clase I y clase II respectivamente, en pacientes en espera de un riñón y demostrar si existe alguna asociación entre ambas.

5.0.- Hipótesis.

Si los anticuerpos anti-HLA causan rechazo agudo entonces los anticuerpos deberían estar presentes antes del rechazo del injerto.

6.0.- Planteamiento del problema.

Debido a que el trasplante renal es la forma óptima de tratamiento para los pacientes con enfermedad crónica terminal y que el principal obstáculo ha sido la detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos leucocitarios humanos que pueden ser producidos antes o después del injerto, además de asociarse con la menor sobrevida del trasplante. Por esto, es necesario comprobar si existe alguna asociación entre la prueba CDC y el PRA, analizando la presencia de anticuerpos anti-HLA en el rechazo agudo y su relación con la evolución del injerto en una muestra seleccionada de la población mexicana.

7.0.- Materiales y Métodos.

Pacientes

Se realizó un estudio clínico prospectivo en el Laboratorio de HLA del Banco Central de Sangre del CMN siglo XXI que incluyó 109 muestras de pacientes con trasplante renal y sus respectivos donadores, en el periodo comprendido de enero del 2009 a octubre del 2010. En todos los casos se recabó un informe de consentimiento bajo información. El estudio fue aprobado por el comité de ética y trasplantes del propio hospital.

Métodos

A cada individuo se tomó una muestra de sangre periférica que se dividió en dos partes. La primera con anticoagulante para la determinación de grupo sanguíneo con antisueros específicos comerciales y extracción de DNA a partir de leucocitos. La segunda sin anticoagulante para la prueba CDC.

En la tipificación HLA se utilizaron métodos moleculares como la PCR-SSP/SSOP, la determinación de la especificidad de anticuerpos anti-HLA clase I y clase II (% PRA) se realizó usando un analizador de flujo LABScan 100 (Luminex®, Austin Tx) y la prueba cruzada (CDC) respectivamente.

Se identificó a los pacientes de acuerdo al tipo de donación: 1.- donador vivo relacionado (DVR) n =83, 2.- donador vivo no relacionado (DVNR) n=15 y 3.- donador fallecido (DF) n=11 (Ver tabla 4). Realizando las pruebas moleculares para la tipificación HLA, PRA % y CDC respectivamente.

Se realizaron los siguientes pasos:

1. Se comprobó la presencia de anticuerpos anti HLA y CDC con el “kit LABScreen Mixed” siguiendo las instrucciones del laboratorio (One Lambda)
2. Las muestras que resultaron positivas o que estuvieron en punto de corte, se les realizó nuevamente la prueba con el LABScreen PRA para identificar la especificidad del anticuerpo y confirmar los resultados del tamizaje.
3. Las muestras con resultados discrepantes para las pruebas CDC versus Luminex LABScreen® PRA se les realizó nuevamente la prueba para eliminar algún error técnico.

Se consideró pacientes sensibilizados aquellos con un %PRA \geq al 30% y con un %PRA $<$ al 30% a aquellos pacientes clínicamente manejables e indeterminados aquellos cuyo %PRA se encontró en el punto de corte o zona gris. En ninguno de los pacientes trasplantados se encontraron anticuerpos donador-específicos

7.1.- Metodología CDC.

La prueba de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento es la técnica serológica estándar fue desarrollada por Terasaki y Clelland en 1964. Su principio se basa en poner linfocitos del donador con un panel de anticuerpos anti-HLA capaces de reconocer determinadas especificidades antigénicas. Tras la adición de suero de conejo como fuente de complemento y los periodos de incubación respectivos en cada etapa, una reacción positiva es indicadora de que la reacción antígeno-anticuerpo ha tenido lugar, y como consecuencia, la activación de la vía clásica del complemento con la formación del complejo de ataque a la membrana que causa la muerte celular, la cual es visualizada microscópicamente con el uso de fluorocromos como el bromuro de etidio o de colorantes como el azul de tripan y la eosina. los resultados se expresan en magnitud de reacción (1= negativo, 2,4=débilmente positivo, y 6,8 fuertemente positivo). Si la prueba es positiva, es importante descartar la presencia de autoanticuerpos no-HLA, los cuales son irrelevantes para trasplantar y se traducen como falsos positivos. Estos

anticuerpos son del tipo IgM. La manera más efectiva de confirmar un resultado positivo es tratar el suero del receptor con un agente reductor como el ditiotreitól que los inactiva, de manera que si aún persiste el resultado positivo este puede atribuirse a anticuerpos de tipo IgG y por lo tanto es una contraindicación para trasplantar. En la actualidad se utiliza la prueba cruzada con antiglobulina humana ya que permite detectar niveles muy bajos de anticuerpos circulantes. Sin embargo, el alto grado de polimorfismo que exhibe el HLA con numerosas variantes alélicas la tipificación basada en DNA ha permitido mejorar la asignación del fenotipo HLA del individuo y facilitando una mayor identificación del grado de compatibilidad del binomio.

Procedimiento para CDC.

Se adicionó 1 uL de suero de los pacientes en las placas (One Lambda, CA. U.S.A) y se incluyeron controles negativos y positivos para propósitos de control de calidad. El suero control negativo se obtuvo de hombres no transfundidos y el control positivo se obtuvo de una mezcla de sueros de pacientes con un PRA mayor a 80%. Las placas fueron utilizadas inmediatamente o almacenadas a -40°C. Las células de donadores se adicionaron a los sueros de los receptores en la placa y se incubaron a 22°C por 60 minutos. Finalmente las células se tiñeron con una solución compuesta por naranja de acridina, bromuro de etidio y se adicionó tinta “quenching” a cada pozo de la placa, las placas fueron leídas usando un microscopio de fluorescencia de doble fase, la reacción positiva fue notada cuando el número de células lisadas en cada pozo fue del 20% o más, la reacción negativa fue notada por muerte celular en un 20% de los pozos. El número de células lisadas en los pozos del control negativo y positivo fue monitoreado por cada placa. El porcentaje del panel reactivo de anticuerpos PRA fue calculado y se evaluó la especificidad con el Software de Análisis Lambda Scan®. ^{26, 27,31,32}

7.1.1.- Metodología Luminex®

Detección de anticuerpos anti-HLA (PRA)

En esta prueba se monitorea periódicamente la presencia de anticuerpos anti-HLA. La información que se obtiene sirve para conocer el grado de aloinmunización humoral y se expresa como % de reactividad (%PRA), siendo el máximo 100%. De igual manera esta prueba permite conocer la especificidad de los anticuerpos formados y esta información nos correlaciona con precisión si existe o no incompatibilidad entre el binomio y la posibilidad de desarrollar algún tipo de rechazo. Así mismo, es una herramienta útil para la selección de donadores en pacientes altamente sensibilizados.

Las fuentes más comunes de sensibilización son las transfusiones, trasplantes previos, embarazos, abortos. Se debe recordar que ni aún el más potente inmunosupresor es efectivo en contra de la memoria del sistema inmune, que incrementa los niveles de anticuerpos anti-HLA si se le reexpone a esos antígenos HLA presentes en el injerto. Pacientes trasplantados con bajos porcentajes de PRA <30% presentan mejores sobrevividas de los injertos comparándolos con los pacientes que tienen un PRA alto, de igual manera pacientes candidatos a retrasplante con presencia de anticuerpos anti-HLA debido al primer trasplante exhiben curvas con disminución en la sobrevida del injerto.

En esta técnica, una perla con una molécula de antígeno leucocitario humano purificado es puesta en contacto con el suero del paciente. Si el anticuerpo apropiado HLA está presente en el suero de prueba, este se enlaza a la molécula HLA, cada perla con HLA es específica dando una única señal cuando es excitada por uno de los láseres del Luminex® debido a una intensidad específica de fluorocromo que cada perla tiene incluida. La excitación y la detección de la señal a partir de la ficoeritrina enlazada a un segundo anticuerpo anti-IgG humano por un segundo laser indica la presencia de un anticuerpo específico HLA. El suero problema y las perlas son incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, después se lava tres veces, posteriormente se le adiciona un anticuerpo marcado anti-IgG; finalmente la mezcla es resuspendida en PBS y se analiza en el equipo

Luminex®. Esta prueba fue llevada al cabo de acuerdo a las instrucciones de manufactura. El análisis fue realizado con el Software One Lambda HLA visual®. 26, 27, 31, 32,33.

7.1.2.- Tipificación de los antígenos HLA clase I y clase II.

El tipo de método para la tipificación HLA (SSP/SSOP) dependerá del grado de resolución (baja, media o alta). Los beneficios que se alcanzan cuando el genotipo HLA del binomio es idéntico son: mayor sobrevida del injerto, disminución de episodios de rechazo, así como reducción de fármacos inmunosupresores. La ventaja de los métodos moleculares es que provee más información sobre las variaciones alélicas debido a que los anticuerpos disponibles en serología pierden su capacidad para identificar todos los productos de los alelos HLA. Las sondas y primers utilizados en esta metodología son fácilmente regenerados, y cuando nuevos alelos son identificados, nuevas sondas y primers son diseñados, ofreciendo mayor exactitud y flexibilidad de resolución.

7.1.3.- Metodología HLA PCR-SSP

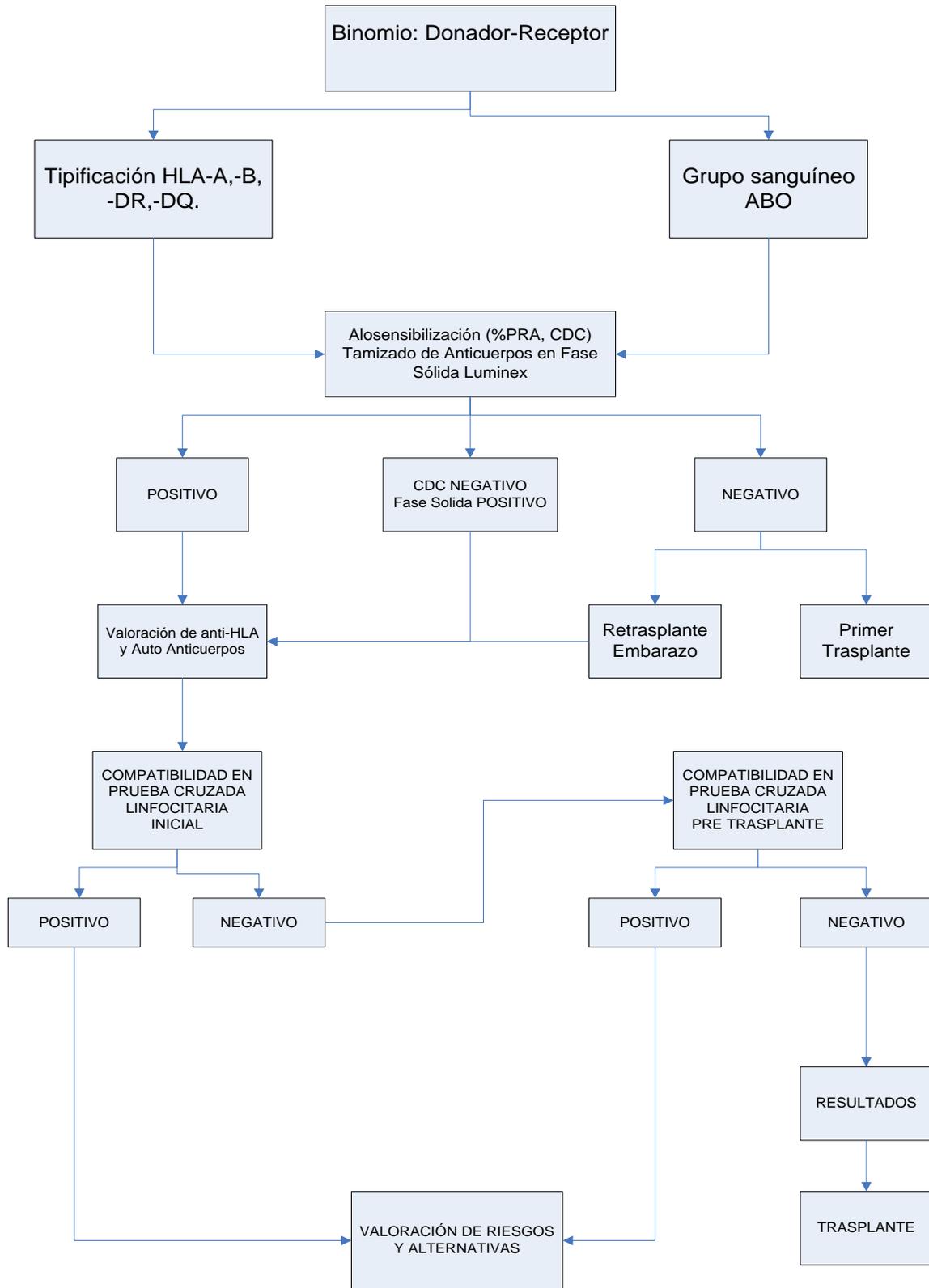
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método rápido y simple para copiar y amplificar secuencias específicas de DNA de hasta 1 kilobase de longitud. Para utilizar este método es necesario conocer la secuencia de una porción corta de DNA en cada extremo de la secuencia grande que se requiere copiar. Estas secuencias cortas se utilizan para especificar sondas de oligonucleótidos. La especificidad de los alelos HLA se determina utilizando un par de iniciadores que puede amplificar uno o varios alelos. El número total de pares de iniciadores deberán amplificar los alelos conocidos para el locus a determinar.

El método consiste en realizar ciclos repetidos de separación (desnaturalización) de las cadenas de DNA, alineación del DNA y amplificación.^{34.}

7.1.4.- Metodología HLA PCR-SSO

La técnica PCR-SSO utiliza iniciadores específicos del locus para amplificar todas las secuencias alélicas codificadas por un solo locus. Los alelos específicos o grupos de alelos amplificados son determinados por sondas de oligonucleótidos marcadas. En este método, (llamado también hibridación reversa, SSO reversa, dot blot reversa) múltiples sondas son unidas a tiras de membrana. El DNA amplificado del paciente es unido a la membrana, mediante hibridación, seguido por un lavado astringente, la marca en el DNA hibridado es convertida en una reacción de color y finalmente es interpretada.³⁴

8.0.- Diagrama de Flujo Experimental



9.0.- ANALISIS ESTADISTICO

Para determinar si había alguna asociación o diferencias estadísticamente significativas entre las variables cualitativas CDC *versus* %PRA clase I y clase II y %PRA clase I *versus* %PRA clase II. Se utilizó en ambos métodos, el porcentaje de la muestra y se comparo usando tablas de contingencia 2x2, χ^2 de Pearson con corrección de Yates, asignándose un nivel de significancia de $p < 0.05$ y un intervalo de confianza del 95 % para comparar la probabilidad de los datos observados con la probabilidad de los datos esperados en caso de ser cierta la hipótesis de independencia. Además de las medidas de asociación tales como el coeficiente de contingencia de Pearson, Phi de Cramer, coeficiente (V) de Cramer, todas ellas para saber si hay alguna independencia o asociación completa y el Tau de Goodman y Kruskal como medida de asociación asimétrica. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statics® Version19.

9.1.- Hipótesis nula: no hay asociación o diferencia entre la prueba CDC y la presencia de anticuerpos anti-HLA (son independientes).

9.1.2.- Hipótesis alterna: si hay asociación o diferencia entre la prueba CDC y la presencia de anticuerpos anti-HLA (son dependientes).

9.1.3.- Estadístico de prueba: prueba chi-cuadrado (χ^2) de Pearson, corrección de Yates y Nivel de significancia: $p < 0.05$ (intervalo de confianza del 95%).

10.0.- RESULTADOS

En la tabla 4 de este estudio clínico se muestra la clasificación de pacientes de acuerdo a el tipo de donación y los haplotipos y antígenos que compartieron el binomio receptor-donador fueron 4 de 8 (35/109), 5 de 8 (20/109), 8 de 8 (10/109) y 1 de 8 (10/109).

Tabla 4. de haplotipos y antígenos compartidos en el binomio: receptor-donador n=109

0 de 8	2	1 de 8	10	2 de 8	8
3 de 8	7	4 de 8	35	5 de 8	20
6 de 8	5	7 de 8	12	8 de 8	10

Donador vivo relacionado 83 (DVR). Donador vivo no relacionado 15 (DVNR). Donador fallecido 11 (DF).

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos del análisis molecular por PCR-SSP/SSO que estudió la especificidad de anticuerpos HLA con la finalidad de contar con una base de datos que contenga la información de las frecuencias de los loci en la población mexicana que sirva como herramienta para aumentar la posibilidad de encontrar un receptor potencial para el trasplante, las especificidades obtenidas se resumen en la Tabla 5. Se encontró en nuestra población un alto porcentaje para el loci HLA-A2 (35.5%), HLA-B35 (22.24%), HLA-DR4 (34.40%) y HLA-DQ8 (32.79%). Por otro lado la metodología empleada (PCR-SSP/SSO) permitió obtener resultados con una resolución que va desde baja, mediana y alta, sin presentar ambigüedades en la interpretación de los resultados.

Tabla 5. Especificidad de anticuerpos HLA							
CLASE I		N= 436		CLASE II		N= 436	
Locus A		Locus B		Locus DR		Locus DQ	
ESPECIFICIDAD %		ESPECIFICIDAD %		ESPECIFICIDAD %		ESPECIFICIDAD %	
A1	4.35	B7	4.12	DR 1	4.35	DQ2	9.86
A2	35.55	B8	1.37	DR4	34.40	DQ3	0.22
A3	4.12	B13	0.22	DR7	4.22	DQ4	16.74
A11	2.06	B14	0.22	DR8	14.22	DQ5	10.77
A23	2.06	B18	2.29	DR9	0.22	DQ6	10.09
A24	16.74	B27	1.37	DR10	1.14	DQ7	19.03
A25	0.45	B35	22.24	DR11	4.35	DQ8	32.79
A26	1.60	B37	0.45	DR12	0.45	DQ9	0.45
A29	2.52	B38	1.37	DR13	5.27		
A30	3.44	B39	22.01	DR14	11.0		
A31	4.81	B40	1.60	DR15	5.04		
A32	0.68	B41	0.22	DR16	3.21		
A33	1.60	B42	0.45	DR17	4.35		
A36	0.22	B44	4.81	DR18	0.45		
A49	0.22	B45	1.83	DR51	0.68		
A60	0.22	B48	4.35	DR52	2.98		
A66	0.68	B49	1.14	DR53	2.75		
A68	18.34	B50	0.91	DR103	0.91		
A80	0.22	B51	6.42				
		B52	2.52				
		B53	0.45				
		B55	0.22				

B57	0.45
B58	0.91
B60	1.14
B61	7.56
B62	2.75
B63	0.22
B64	1.37
B65	2.98
B71	0.68
B72	1.14

En esta tabla se muestra en porcentajes los anticuerpos más frecuentes en la población mexicana.

La frecuencia de los haplotipos más comunes en el binomio receptor-donador fueron los siguientes: HLA-A2-B39-DR4-DQ8 (32%), HLA-A24-B39-DR4-DQ8 (15.59%), HLA-A24-B39-DR14-DQ7 (13.76%), HLA-A68-B61-DR4-DQ8 (9.17%), HLA-A2-B35-DR4-DQ4 (8.25%). (Ver figura 11 y Tabla 6). Esto permite encontrar un donador compatible con el receptor en HLA-DR, favoreciendo el tiempo de supervivencia del injerto al no encontrar diferencias en HLA-DR en comparación a los loci HLA-A y HLA-B, dado que juntos presentan mayor polimorfismo.

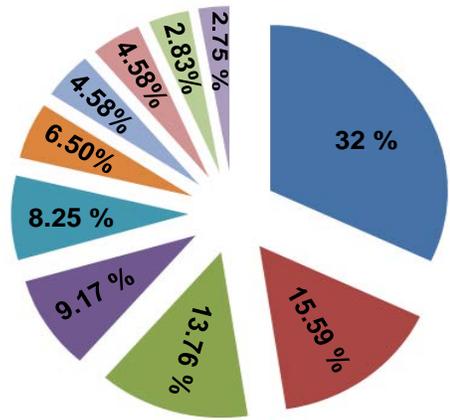


Tabla 6. Frecuencia de haplotipos en el binomio receptor-donador n=109.

HAPLOTIPO	FRECUENCIA EN %
A2 B39 DR4 DQ8	32.0
A24 B39 DR4 DQ8	15.59
A24 B39 DR14 DQ7	13.76
A68 B61 DR4 DQ8	9.17
A2 B35 DR4 DQ4	8.25
A24 B39 DR8 DR4	6.50
A2 B35 DR11 DQ7	4.58
A2 B35 DR14 DQ7	4.58
A68 B39 DR14 DQ5	2.75
A29 B44 DR7 DQ2	2.83

Fig.11. Representación en porcentajes de haplotipos más frecuentes en el binomio receptor- donador n=109.

Los resultados de la prueba cruzada linfocitaria (CDC) fue negativa en todos los casos (Tabla 7). Esta prueba detecta los linfocitos totales que identifican anticuerpos anti-HLA clase I, presentes en los linfocitos T y los anticuerpos anti-HLA clase II que reconocen antígenos HLA clase II, presentes en los linfocitos B. Sin embargo el bajo número de linfocitos B en la muestra sanguínea dificulta en algunas ocasiones la detección de anticuerpos anti-HLA clase II.

El resultado del panel reactivo de anticuerpos (%PRA) fueron los siguientes: 109 fueron negativos a la prueba CDC, 51/109 negativos a PRA clase I, 68/109 negativos a PRA clase II, 36/109 positivos a PRA clase I, 16/109 positivos a PRA clase II, 22/109 indeterminados a PRA clase I y 25/109 indeterminado a PRA clase II. El χ^2 de Pearson calculado fue de 84.7204 con 4 grados de libertad y un valor de $p < 0.0001$, y el valor teórico de una distribución χ^2 con 4 grados de libertad reportado en tablas fue de 9.49, poniendo en evidencia una notable diferencia estadísticamente significativa, en lo que respecta a las medidas de asociación el coeficiente de contingencia de Pearson fue de 0.436, el coeficiente V de Cramer de 0.3599, el Tau de Goodman y Kruskal de 0.1680/0.1295, observándose de esta manera una asociación completa (Tabla 7).

Tabla 7. Tabla de contingencia de la prueba *versus* resultado

Prueba		RESULTADO			TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO	INDETERMINADO	
	CDC	109 (33.33%)	0 (0%)	0 (0%)	109 (33.33%)
	PRA CLASE I	51 (15.59%)	36 (11.0%)	22 (14.06%)	109 (33.33%)
	PRA CLASE II	68 (20.79%)	16 (4.89%)	25 (7.64%)	109 (33.33%)
TOTAL		228	52	47	327 (100%)

^a0 casillas (0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es de 15.67.

^b $P < 0.0001$

El análisis estadístico para demostrar la dependencia u asociación del PRA clase I *versus* PRA clase II se observa en la Tabla 8. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: 15/73 positivos a PRA clase I y II, 0/73 negativos a PRA clase I y positivo a PRA clase II,

12/73 positivos a PRA clase I y negativos a PRA clase II, 46/73 negativos a PRA clase I y II (Ver Tabla 8 y 9).

El χ^2 de Pearson calculado fue de 32.1648 con 1 grado de libertad y un valor de $p < 0.0001$, la corrección de Yates fue de 28.8518 por otra parte el valor teórico de una distribución χ^2 con 1 grado de libertad reportado en tablas fue de 3.84 mostrando de igual manera una diferencia estadísticamente significativa, en lo que respecta a las medidas de asociación el coeficiente de contingencia de Pearson fue de 0.5530, el coeficiente V de Cramer de 0.6638, el Tau de Goodman y Kruskal de 0.4406 / 0.4406, observándose de esta manera una asociación completa.

Por lo anterior en ambos casos se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna como verdadera ya que un valor de p muy significativo como el obtenido nos indica que la hipótesis nula es poco creíble.

Tabla 8. Tabla de contingencia del PRA clase I versus PRA clase II

	PRA CLASE I POSITIVO	PRA CLASE I NEGATIVO	TOTAL
PRA CLASE II POSITIVO	15 (20.54%) 5.5	0 (0%) 9.5	15 (20.54%)
PRA CLASE II NEGATIVO	12 (16.43%) 21.5	46 (63.01%) 46.0	58 (79.45%)
TOTAL	27	46	73 (100%)

^a0 casillas (0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es de 5.55.

^b $P < 0.0001$.

Tabla 9. Tabla de resultados del PRA n= 109

PRA	RESULTADO
POSITIVO CLASE I y II	15
NEGATIVOS CLASE I y II	46
INDETERMINADOS CLASE I y II	11
POSITIVO CLASE I y NEGATIVO CLASE II	12
NEGATIVO CLASE I y POSITIVOS CLASE II	0
INDETERMINADOS CLASE I y NEGATIVOS CLASE II	10
INDETERMINADOS CLASE I y POSITIVOS CLASE II	1
NEGATIVOS CLASE I e INDETERMINADO CLASE II	5
POSITIVO CLASE I e INDETERMINADO CLASE II	9

Con los resultados que se obtuvieron de los 109 pacientes se pudo observar un éxito del trasplante del 91.76%. Sin embargo si tomamos los resultados del éxito y comparamos solo aquellos que tuvieron rechazo tanto agudo como crónico y aquellos que fallecieron por rechazo, se obtendría realmente un éxito del trasplante del 95.42%, ya que tanto los que fallecieron por otras causas y en los que se presentaron otras complicaciones fueron ajenos al rechazo del injerto. (Ver figura 12).

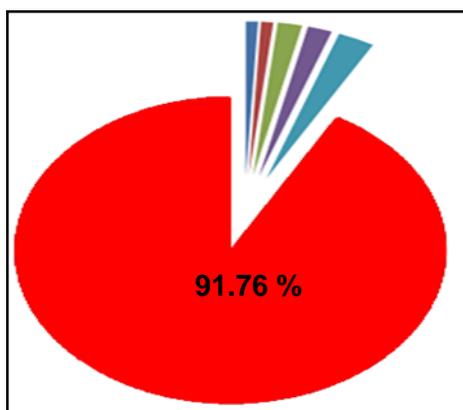


Fig.12.- Éxito del trasplante 1.- rechazo vascular agudo (2.76 %). 2.- otras complicaciones (1.83 %). 3.- fallecidos por otras causas (1.83 %). 4.- fallecido por rechazo vascular agudo (0.91 %). 5.- fallecido por rechazo crónico (0.91%). 6.-éxito del trasplante (91.76 %). **n= 109.**

11.0.- DISCUSION

En este estudio se realizó la tipificación HLA a nivel alélico del paciente y de sus donantes en HLA-A, HLA-B, HLA-DR. HLA-DQ, tales hallazgos mostrados en la tabla 5 son similares a los obtenidos por Arrazola y Cols.²⁴ En donde se puede observar que los porcentajes de especificidad de anticuerpos HLA están relacionados con los haplotipos que más compartieron el binomio receptor-donador sobre todo en A2, A24, A68, B35, B39, DR4, DR14, DQ4 y DQ8.

En algunos estudios se ha observado una mayor sobrevida del injerto mientras más haplotipos o antígenos compartan el binomio receptor-donador sobre todo cuando hay compatibilidad en HLA-DR.^{12, 32}.

También se le realizó al binomio receptor-donador la prueba PRA-CDC ya que de esta se pueden obtener tres tipos de información: A) Si el receptor tiene o no tiene aloanticuerpos. B) El porcentaje de reactividad, que permite predecir la probabilidad de una prueba cruzada linfocitaria positiva. C) Identificar, en algunos casos, contra que antígenos reaccionan estos aloanticuerpos. Este conocimiento permite pronosticar para los donantes que tienen estos antígenos una muy alta probabilidad de prueba cruzada linfocitaria positiva por citotoxicidad.

Una prueba cruzada linfocitaria positiva por citotoxicidad CDC del binomio receptor-donador sobre linfocitos T o totales, tiene un valor predictivo positivo sobre la pérdida del injerto en las primeras 48 horas del 80%, por lo tanto, contraindica el trasplante. El trasplante puede no estar contraindicado si existen evidencias de que la positividad se debe a autoanticuerpos anti-IgM. Para ello es preciso que: A) La positividad se negativice después del tratamiento del suero con DTT (Ditiotrietol), B) No exista evidencia de evento sensibilizante en los últimos 15 días y C) La determinación del tamizado de aloanticuerpos anti-HLA en fase sólida (Luminex®) sea negativa en un suero que haya sido PRA-CDC positivo. Pueden ayudar a confirmar la autorreactividad en evidencias de enfermedad autoinmune como (LES.AR, CBP etc;).

Las 109 pruebas cruzadas linfocitarias CDC en el binomio receptor-donador fueron negativas y en ningún caso se detectó anticuerpos donador específicos (DSA). Se consideró pacientes sensibilizados aquellos con un %PRA \geq al 30% y con un %PRA $<$ al 30% a aquellos pacientes clínicamente manejables e indeterminados aquellos cuyo %PRA se encontró en el punto de corte o zona gris.

Cuando se realizó la tabla de contingencia para comprobar la asociación entre la prueba realizada contra el resultado obtenido, se notó una claramente una diferencia estadísticamente significativa.

En lo que respecta a los resultados obtenidos en la tabla 9 los que más llaman la atención son aquellos con una prueba cruzada CDC negativa pero con un %PRA positivo para clase I y clase II (n=15) ya que en algunos estudios se ha observado una probabilidad de supervivencia del injerto al año un poco inferior a la de injertos con %PRA negativo, por otra parte la fijación de anticuerpos no detectables por fijación de complemento no pronostica un rechazo hiperagudo, pero si pronostica una mejor sobrevivencia del injerto, especialmente en los pretrasplantes.

No debe olvidarse que una parte de los anticuerpos anti-B por citotoxicidad son realmente autoanticuerpos de tipo IgM que no dan reacciones positivas por Luminex®. Sin embargo, los anticuerpos IgG anti.HLA clase II consecuencia de un injerto previo si se han relacionado con episodios de rechazo y se les ha considerado un factor de mal pronóstico relativo para el retrasplante. Tanto la IgG anti HLA-DR como los anti HLA-DQ y HLA-DP han sido relacionados con el rechazo.²⁷

En los resultados que se muestran en la tabla de contingencia en donde se comprobó la asociación del PRA clase I contra PRA clase II, se obtuvo de igual manera una diferencia estadísticamente significativa. En ambas tablas de contingencia realizadas se observa una fuerte asociación o dependencia tanto en la prueba realizada versus resultado obtenido como en la del PRA clase I versus PRA clase II. Razón por la cual se deben realizar ambas pruebas a pacientes que están en lista de espera de un trasplante.

Con respecto al éxito del trasplante en algunos estudios se ha observado que la presencia de anticuerpos anti-HLA clase I postrasplante precede, incluso años, al desarrollo de glomerulopatía, la presencia de anticuerpos clase II se asocia fuertemente a rechazo crónico en receptores renales de donante vivo, pero parece que el peor pronóstico se asocia con la detección simultánea de anticuerpos anti-HLA clase I mas anticuerpos anti-HLA clase II, donde la sobrevida del injerto puede descender a más del 70%, comparado con la presencia de anticuerpos Clase I o Clase II positivos, en los cuales la sobrevida puede alcanzar un 85% a dos años después del trasplante.^{28, 29, 30, 31.}

En estudios del Grupo Colaborativo para Estudios de Trasplante, realizado en 96,574 trasplantes de 1984 a 2001 han demostrado que la disparidad HLA afecta directamente la sobrevida del injerto a 20 años, en este estudio se demostró que disparidades de 6 diferencias en la tipificación HLA, la sobrevida decreció hasta el 20% en comparación a cero disparidades que la sobrevida fue del 40% de pérdida del injerto, ahora bien, aunado a estas disparidades la presencia de anticuerpos anti-HLA por arriba del 50% de sensibilización produce un decremento de hasta del 50% de sobrevida del injerto a 5 años después del trasplante. En este estudio se puede observar la paridad entre el binomio receptor-donador (tabla 6 y figura 11) en el haplotipo más común (32%): HLA-A2 –B39 –DR4 –DQ8, tomando en cuenta que la mayoría de los trasplantes realizados son con donadores vivos relacionados (n=83).^{36, 37.}

Los resultados indican que en los 109 pacientes que fueron sometidos a trasplante renal 1/109 falleció por rechazo vascular agudo, 1/109 falleció por rechazo crónico, 3/109 presentaron rechazo vascular agudo, 2/109 fallecieron por otras causas ajenas al trasplante (insuficiencia cardiaca y neumonía) y 2/109 presentaron algunas complicaciones como (sepsis, histoplasmosis), 100/109 resultaron con trasplante exitoso. Si se tomara en cuenta solo resultados vinculados con rechazo (fallecidos por rechazo agudo, crónico y aquellos con rechazo agudo vascular) en términos de porcentajes se obtendría un éxito del trasplante del 95.4 (ver figura 12). Cabe mencionar que en los pacientes que presentaron rechazo vascular

agudo en 3 de ellos, las pruebas CDC, PRA clase I y II fueron negativas, en el que falleció por rechazo agudo la CDC fue negativa, el PRA Clase I fue positivo y el PRA Clase II indeterminado, el paciente que falleció por rechazo crónico la CDC fue negativa el PRA clase I y clase II fue positivo en ambos casos. Esto puede deberse a los tipos de anticuerpos que detectan ambas pruebas, pues hay que señalar que la prueba cruzada nos va a detectar anticuerpos de tipo IgG y la determinación de PRA nos detecta anticuerpos específicos anti-HLA.

12.0.- CONCLUSIONES

La tipificación HLA por técnicas moleculares o serológicas nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

- A) Que la prueba CDC, PRA clase I y clase II están asociados significativamente.
- B) Nos permite conocer la supervivencia del injerto a largo plazo. Supervivencia a 10 años de los injertos HLA idénticos: 73%; supervivencia de injertos no idénticos del 64% (una incompatibilidad) a 53% (6 incompatibilidades).
- C) Permite evaluar las probabilidades de que una prueba cruzada resulte negativa, conociendo el % PRA-CDC y la especificidad de los anticuerpos del receptor. En pacientes altamente sensibilizados disponer de un hermano HLA idéntico es, en ocasiones, una de las pocas oportunidades de trasplante para estos pacientes.
- D) Facilita la identificación de aloanticuerpos donador específicos (DSA) en el pos trasplante utilizando técnicas de fase sólida.
- E) Hace posible evitar la repetición de las mismas incompatibilidades de trasplantes previos o futuros.
- F) Se sugiere estudiar en un futuro la presencia de los anticuerpos anti-HLA clase I y clase II en el postrasplante ya que tendría un valor predictivo en el rechazo del injerto y la menor sobrevida del injerto. Además de la determinación de anticuerpos anti-MICA a los cuales se ha sospechado su participación en pacientes que han perdido de un injerto previo con evidencias de rechazo humoral.

13.0.- REFERENCIAS

- 1.- Peña J.C y Cols. Historia del trasplante renal en el INCMNSZ. Revista de Investigación Clínica. 2005; 57 (2): 120-123.
- 2.- Leo de Cervantes Claudia. Pruebas de Histocompatibilidad en el Programa de Trasplantes. Revista de Investigación Clínica. 2005; 57 (2):142-146.
- 3.- Bonet Rosello y Martínez Córdova Zuzet. Los Métodos Serológicos y Moleculares en la Tipificación de los Antígenos de Leucocitos Humanos. 2004; 29 (4):126-130.
- 4.- Walraven Carl y Cols. Prediction Potential Survival Benefit of Renal Transplantation in Patients with Chronic Kidney Disease. CMJA. 2010; 182 (7): 666-672.
- 5.- Dirección de Prestaciones Médicas Evolución Coordinación Nacional de Trasplantes. Evolución y perspectivas de los trasplantes de órganos y tejidos en el Instituto Mexicano del seguro Social. 2003.
- 6.- Elpidio Cruz Martínez y Cols. Insuficiencia renal aguda en el paciente crítico. Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva. 1998; 12 (4):145-155.
- 7.- <http://www.usrds.org/reference.htm> [Consulta: 11 Enero 2011].
- 8.- <http://www.who.int/transplantation/organ/en/> [Consulta: 3 Enero 2011].
- 9.- <http://www.fundrenal.org.mx/estadisticas.html> [Consulta 01 Marzo 2011].
- 10.- http://www.cenatra.salud.gob.mx/trasplante_estadisticas.html. [Consulta: 4 Marzo 2011].
- 11.- K. Brown R.E. Phillips y W. Wong. What Have We Learn from Experimental Renal Transplantation. Nephron Exp Nephrol 2010; 115 (9): 9–14.
- 12.- Sung Yoon Choo y Cols. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Complications. Yonsei Medical Journal. 2007; 48 (1):11-23.
- 13.- Alcoceba Sánchez Miguel. Estudios de Polimorfismos Genéticos en la Evolución Clínica de Pacientes sometidos a Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos. Tesis doctoral universidad de Salamanca. 2010. 31-39.
- 14.- Brian J. y Cols. Rejection of the Kidney Allograft. The New England Journal of Medicine. 2010; 3 (63):1451-62.

- 15.- Kathryn Wood. The handbook of transplant immunology, Oxford. Primera publicación 1995. ISBN 1 900 348 00 4. 23,87,113.
- 16.- United Network For Organ Sharing (UNOS)
<http://optn.transplant.hrsa.gov/latestData/viewDataReports.asp>
- 17.- Arrazola García Araceli. Tipificación de Alelos HLA I y II. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2005; 43 (1):95-97.
- 18.- Martínez Álvarez Julio. Importancia de la Tipificación HLA en Alta Resolución para Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2006; 44 (2):11-14.
- 19.- Terasaki. Paul. Prediction Kidney Graft Failure by HLA Antibodies: a Prospective Trial. American Journal Transplantation. 2004; 4: 438-443.
- 20.- Paul I. Terasaki. Humoral Theory of Transplantation. American Journal of Transplantation 2003; 3: pp 665–673.
- 21.- Humar A y Cols. The association Between Acute Rejection and Chronic Rejection in Kidney Transplantation. Transplantation Proceedings. 1999; 31:1302-1303.
- 22.- Toresan R y Cols. Association between the Presence of Anti-HLA Antibodies with Acute Rejection and Chronic Allograft Nephropathy in the first year after Kidney Transplantation. Transplantation Proceedings. 2008; 40:718-120.
- 23.- Ercilla Guadalupe y Cols. Estudio Inmunológico de la pareja donante-receptor. Nefrología. 2010; 30 (2): 60-70.
- 24.- Arrazola García Araceli. Histocompatibilidad en el Programa Donación Cadáver para Trasplante Renal. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2006; 44 (2):19-23.
- 25.- Watanabe. J. y Cols. Measuring Human Complement Activation by HLA Antibodies. Arch Pathol Lab Med. 2006; 130: 368-373.
- 26.- Brian D Tait, Fiona Hudson, Linda Cantwell y Cols, Review article: Luminex Technology for HLA antibody Detection in Organ Transplantation. Nephrology. 2009; 14: 247–254.
- 27.- Maria Bernadette Colombo, Simone Elisabeth Haworth, Francesca Poli y Cols. Luminex technology for anti-HLA antibody screening: evaluation of performance and impact in laboratory Routine. Cytometry Part B (Clinical Cytometry). 2007; 72B:465–471.

- 28.- Lynn D y Cols. Kidney Transplantation: Mechanism of Rejection and Acceptance. *Annu. Rev. Phatol. Mech. Dis.* 2008; 3:189-220.
- 29.- Benichou Gilles. Direct and indirect Antigen Recognition: The Phatways to Allograft Immune Rejection. *Frontiers in Bioscience.* 1999; 4: 476-480.
- 30.- La Rosa David- The innate Immune System in Allograft Rejection and Tolerance. *The Journal of Immunology.* 2007. 178: 7503-7509.
- 31.- Feijo Cristiano. Innate Immunity and Organ Transplantation: The potential Role of Toll-like Receptors. *American Journal Transplantation.* 2005; 5: 969-975.
- 32.- Tait Brian. Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. *Current Opinion in Immunology.* 2009. 21: 573-577.
- 33.- Galeas Arturo y Cols. Anticuerpos anti-HLA y Rechazo agudo del injerto renal en los niños. *Bol Med Hospital Infantil de México.* 2010; 67: 492-501.
- 34.- Martínez Álvarez Julio. Propuesta de un manual de procedimientos para el laboratorio de histocompatibilidad y HLA del Banco central de sangre del CMN siglo XXI.2006; 49-84.
- 35.- Pérez Rodríguez Martha. Procesamiento y Presentación de Antígeno por Moléculas MHC Clase I y Clase II. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social.* 2006; 44 (2):7-10.
- 36.- Süsal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation.* 2002; 73:1269-1273.
- 37.- Süsal C, Opelz G. Good kidney graft outcome in recipients with presensitization against HLA class II but not HLA class I. *Hum Immunol.* 2004; 65:810-816.