



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

SEDE

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"**

TÍTULO

**Asociación de anticuerpos anti-HLA con la presencia y
grado de proteinuria en pacientes adultos con trasplante
renal.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

LLUVIA AURORA MARINO VAZQUEZ

TUTOR DE TESIS

DR. LUIS EDUARDO MORALES BUENROSTRO
Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral

CO-TUTOR

DRA. JOSEFINA ALBERÚ GÓMEZ
Jefe del Departamento de Trasplantes

México, D.F.

2011





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.

INDICE

RESUMEN.....	1
I. MARCO TEORICO.....	2
I.1.- Trasplante Renal	2
I.2.- Medición de la función Renal y estratificación de su deterioro.....	2
I.3.- Daño crónico del injerto (DCI).....	4
I.4.- Patogenia del daño crónico del injerto.....	5
I.4.1- Causas de DCI no inmunológicas (Independientes de aloantígenos).	7
I.4.1.A- Proteinuria	8
I.4.1.B- Proteinuria en el trasplante renal.....	12
I.4.2- Causas de DCI Inmunológicas(Dependientes de aloantígenos).....	13
I.4.2.A- Anticuerpos anti-HLA(Barreras Inmunológicas).....	14
I.5.-Proteinuria y daño endotelial.....	15
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS.....	20
V. OBJETIVOS.....	21
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
a) Diseño.....	22
b) Universo de estudio.....	22
c) Tamaño de muestra	22
d) Lugar de realización.....	23
e) Periodo de estudio.....	23
f) Criterios de inclusión.....	23
g) Criterios de exclusión.....	23
h) Variables.....	24
i) Definición operacional de variables.....	24
j) Procedimientos.....	27
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
VIII. RESULTADOS	33
IX. DISCUSIÓN.....	46
X. CONCLUSIONES.....	51
XI. ANEXOS.....	52
XII. BIBLIOGRAFIA.....	54

INDICE DE CUADROS

Tabla I.1.- Marcadores de daño renal	3
Tabla I.2.-Estadio y prevalencia de la enfermedad renal crónica.....	4
Tabla I.3.-Factores que contribuyen al desarrollo del DCI.....	6
Tabla I.4.-Tipos de Proteinuria.....	10
Tabla VIII.1.- Características basales de la población estudiada.....	34
Tabla VIII.2.- Tratamiento de Inducción y de mantenimiento.....	35
Tabla VIII.3.- Prevalencia de anticuerpos anti-HLA para cada especificidad clase I y clase II.....	39
Tabla VIII.4.- Antecedente de exposición a factores sensibilizantes.....	40
Tabla VIII.5.- Prevalencia de Rechazo.....	41
Tabla VIII.6.- Tasa de Filtrado Glomerular.....	42
Tabla VIII.7.- Presencia de anticuerpos anti-HLA y proteinuria.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1.- Esquema del ciclo estrés-daño-inflamación.....	7
Figura I.2.- Composición proteica normal.....	9
Figura I.3.- Componentes de la barrera de filtración.....	11
Figura VI.1.- Estructura de las moléculas MIC, de las moléculas clase I y II del HLA, así como detalles de la presentación antigénica.....	8
Figura I.5.- Formación de anticuerpos.....	9
Figura I.6.- Interpretación de la prueba con CDC y CDC-AHG.....	11
Figura I.7.- Principios generales de la prueba de ELISA, CF y Luminex.....	12
Figura VI.1.- Esquema que muestra las microesferas con pigmento fluorescente en su interior	30
Figura VIII.1.- Frecuencia y distribución de los anticuerpos anti-HLA encontrados en la población estudiada.....	38
Figura VIII.2.- Tasa de filtrado glomerular (TFG) según presencia y tipo de anticuerpos anti-HLA (Ac-HLA).....	42
Figura VIII.3.- Nivel de proteinuria por grupo de pacientes	44
Figura VIII.4.- Correlación de niveles de luminiscencia del anticuerpo anti-HLA dominante y los niveles de albuminuria	45

ASOCIACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA CON LA PRESENCIA Y GRADO DE PROTEINURIA EN PACIENTES ADULTOS CON TRASPLANTE RENAL.

Introducción. Distintos mecanismos se encuentran involucrados en el daño crónico del injerto renal, haciéndose dos grandes divisiones: a) procesos inmunes (anticuerpos anti-HLA) y b) no inmunes (Proteinuria). Hasta el momento no existen estudios que demuestren la asociación entre la presencia de anticuerpos anti-HLA y la proteinuria que se suele observar en pacientes trasplantados. El objetivo planteado fue determinar correlación entre los niveles de Ac-HLA con la presencia y grado de proteinuria en pacientes adultos receptores de trasplante renal.

Material Y Métodos. Estudio clínico transversal y descriptivo, incluyo pacientes adultos receptores de trasplante renal con seguimiento en el INCMNSZ; de Marzo de 2009 a Febrero de 2011. Se midieron anticuerpos anti-HLA en suero sanguíneo con Labscreen Single Antigen® mediante Luminex y proteinuria en orina de 24 hrs. Se utilizaron frecuencias y proporciones para las variables nominales; Chi cuadrada para variables categóricas y T de Student o ANOVA de 1 vía para las variables continuas. Se consideró significativa una $P < 0.05$.

Resultados. Se incluyeron 61 pacientes, 18 de ellos (29.5 %) tenían algún grado de albuminuria, de los cuales sólo 3(4.9 %) presentaban albuminuria en rangos clínicamente significativos ($\geq 300\text{mg}/24\text{hrs}$). El 40.5% de los pacientes que presentaron Anticuerpos anti-HLA presentó Anticuerpos Donador Especifico (DE). No se encontró correlación entre los niveles de Ac-HLA con la presencia y grado de proteinuria en pacientes adultos receptores de trasplante renal.

Conclusiones. Si bien en este estudio no hubo una clara asociación entre el desarrollo de anticuerpos anti-HLA y la presencia de proteinuria, no hay duda que son necesarios mejores biomarcadores para el adecuado monitoreo de los pacientes y que nos puedan apuntar hacia el mejor momento para realizar intervenciones para la remoción de dichos anticuerpos, con el fin de mejorar el pronóstico de los receptores de trasplante renal.

I. MARCO TEÓRICO

1.1.- Trasplante Renal

El trasplante renal es la forma preferida de tratamiento renal sustitutivo en casi todos los pacientes con enfermedad renal terminal. A pesar del éxito progresivo del trasplante renal, el rechazo agudo y crónico continúan siendo los problemas principales. Los descubrimientos recientes han llevado a un mejor conocimiento de la inmunobiología del trasplante. Es así que la intervención terapéutica más eficaz para controlar la morbi-mortalidad y reducir los costos asociados a la enfermedad renal crónica terminal (ERCT) y terapia dialítica implica la restitución de la función renal perdida, colocando al trasplante renal como el tratamiento de elección con el mayor índice de rehabilitación y reintegración a la vida laboral.¹⁻⁶

1.2.- Medición de la función renal y estratificación de su deterioro

El término enfermedad renal crónica (ERC) incluye toda condición que involucra daño renal, ya sea estructural (evidenciado por estudio de gabinete o histopatológico) o funcional (evidenciado por alteración en la composición sanguínea y/o urinaria), persistente por un periodo mayor o igual a 3 meses (**Tabla I.1**). Por lo general es de carácter progresivo así que, dependiendo de la etapa clínica puede o no haber disminución de la tasa de filtrado glomerular (TFG) además de proteinuria; esta última como marcador de daño renal temprano. Puede definirse la ERC con base en una TFG menor a 60 mL/min/1.73 m² durante el mismo lapso citado con anterioridad, con o sin daño estructural.⁷

Tabla I.1.- Marcadores de daño renal⁷

Bioquímicos	Imagen	Histopatología
Creatinina sérica	Dimensión reducida	Esclerosis glomerular
Proteinuria/albuminuria	Relación corteza: medula alterada	Fibrosis Intersticial
Otros indicadores de daño renal	Contorno irregular	Atrofia tubular

La cuantificación de la función renal se basa en un indicador, la TFG. Este parámetro se cuantifica directamente mediante una técnica compleja que mide a intervalos seriados (en promedio cada 30 minutos) la concentración sérica y urinaria de un fármaco exógeno (V. gr. Inulina, ¹²⁵I – iotalamato, ^{99m}Tc – ácido dietilen triamino penta acético [DTPA]) cuya eliminación es exclusivamente por vía renal y que es administrado a una tasa constante por vía endovenosa.⁸⁻¹⁰ Estas técnicas, consideradas como estándar de oro, requieren infraestructura especial así como personal capacitado, por lo que en la actualidad se emplean fórmulas matemáticas relativamente sencillas que se basan en la creatinina sérica (CrS), datos demográficos (edad, género y raza) y antropométricos (peso). Esto permite estimar indirectamente la TFG con facilidad y rapidez.⁷⁻⁹ Tal es el caso de la fórmula derivada del estudio *Modification of Diet in Renal Disease*, (MDRD) que es actualmente la más recomendada para la evaluación y estratificación de la enfermedad renal crónica;⁷ no sólo por la fortaleza metodológica con la que fue desarrollada, sino también por el menor margen de error (de – 5.5 a 0.9 mL/min/1.93 m²) en comparación con otras ecuaciones (V. gr. Cockcroft – Gault).¹⁰⁻¹² Pese a esto, se discute todavía su perfectibilidad.¹³ La estratificación de ERC y ERCT basada en la TFG

y marcadores tempranos de daño renal (V. gr. proteinuria) se muestra en la [Tabla I.2.](#)

Tabla I.2.- Estadio y prevalencia de la enfermedad renal crónica.^{7,14}

Estadio	Definición	TFG (mL/min/1.73 m ²)	Prevalencia	
			1988-1994	1999-2004
1	TFG normal y albuminuria	≥90	1.71	1.78
2	Disminución leve de TFG	60-89	2.70	3.24
3	Disminución moderada de TFG	30-59	5.42	7.69
4	Disminución grave de TFG	15-29	0.21	0.35
5	Insuficiencia renal terminal	<15(diálisis)		

Incluye población ≥ 20 años. TFG= tasa de filtrado glomerular cuantificada en mL/min/1.73 m² de superficie corporal.

El daño renal puede estar presente aún cuando la creatinina sérica o la TFG se encuentren dentro de parámetros “normales” y la morfología renal por estudios de gabinete no muestre alteración. Este grupo de casos con “daño renal temprano” son identificados gracias a la presencia de una anomalía en el análisis de orina: proteinuria / albuminuria.⁷

1.3.- Daño crónico del injerto

El Daño Crónico del Injerto (DCI) representa cambios ultraestructurales en los componentes de la nefrona. Las lesiones histopatológicas reconocidas en el daño crónico del injerto son la fibrosis intersticial / atrofia tubular y el daño glomerular crónico. Estas lesiones constituyen el

punto donde confluyen distintos mecanismos de daño, inmunológico y no inmunológico.¹⁵⁻¹⁶ Desde hace más de una década se ha descrito al DCI como la principal alteración causante de retorno a diálisis o retransplante.¹⁷⁻²³ Por lo general, este conjunto de alteraciones histopatológicas “típicas” en la biopsia renal percutánea se presentan en asociación con deterioro de la función del injerto renal, proteinuria de magnitud variable e hipertensión; aunque en etapas iniciales prevalecen sólo alteraciones histológicas leves sin manifestación clínica alguna, reconociéndose también su carácter progresivo y acumulativo.^{17,19,24,25}

1.4.- Patogenia del daño crónico del injerto

Distintos mecanismos se encuentran involucrados en el daño crónico del injerto renal, haciéndose dos grandes divisiones: a) procesos inmunes (dependientes de aloantígenos) y b) no inmunes (independientes de aloantígenos);^{15,17,20,21} ambos, invariablemente culminan en inflamación, proceso constante que se perpetúa por diversas causas. (**Tabla I.3**)

Así pues, los acontecimientos en el periodo postrasplante en asociación con la respuesta inmune dirigida contra el aloinjerto desencadenan un círculo vicioso: estrés - daño - inflamación - respuesta inmune - estrés; que culmina en el deterioro progresivo del injerto renal.^{15,24,19,26,27} (**Figura I.1**)

Tabla I.3.- Factores que contribuyen al desarrollo de DCI ^{15,17,24,18,20}

Dependientes de Aloantígenos	Independientes de Aloantígenos
Inmunidad celular	Viabilidad del órgano
Discordancia HLA D/R*	Edad del donador
Inflamación persistente	Tiempo de isquemia fría
Inmunosupresión deficiente	Historia de función retardada del injerto/NTA
	Donador vivo vs cadavérico
Inmunidad humoral	Donador con lesión cerebral
Grado de sensibilización (PRA)	Masa renal disminuida
Episodios de rechazo (celular y/o humoral)	Factores propios del receptor
	Diabetes Mellitus
	Uropatía obstructiva
Infecciones	Patología recurrente
Citomegalovirus	Apego al tratamiento
Poliomavirus	Proteinuria
	Radicales libres
	Dislipidemia
	Hipertensión
	Tabaquismo
	Toxicidad por fármacos (ICN)

DCI= daño crónico del injerto; HLA= Human leukocyte antigen, antígeno leucocitario humano;

D= donador; R= receptor; NTA= necrosis tubular aguda; PRA= panel reactivo de anticuerpos;

ICN= Inhibidores de calcineurina.

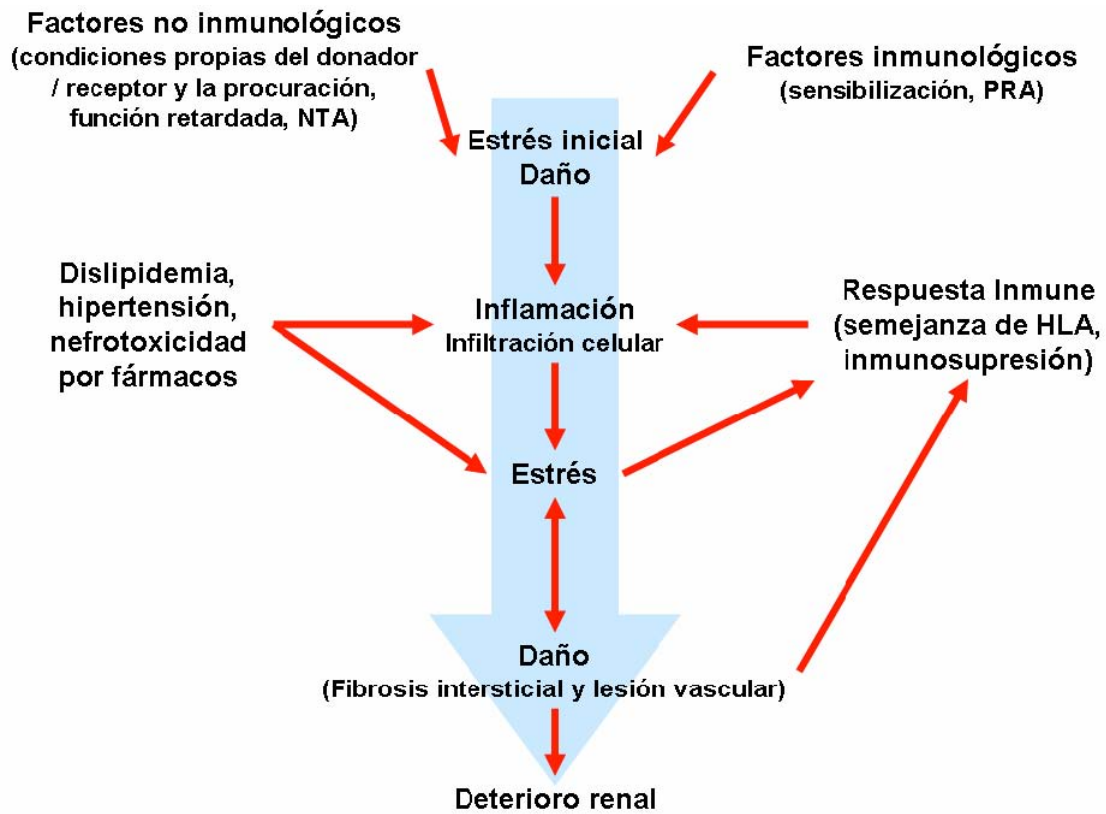


Figura I.1. Esquema que representa los iniciadores del ciclo estrés – daño – inflamación – respuesta inmune – estrés. NTA, necrosis tubular aguda. PRA, panel reactivo de anticuerpos.

1.4.1.- Causas de DCI no inmunológicas (Independientes de aloantígenos)

Diferentes factores no inmunológicos son ampliamente citados como predisponentes para el desarrollo de DCI.^{20,24,28} Tal es el caso de la exposición crónica a inhibidores de calcineurina (ICN), nivel de presión arterial postrasplante renal, tiempo de isquemia,²⁹⁻³² condiciones de

procuración y preservación³³ así como factores propios del donador que modifican la viabilidad del injerto (patologías previas a la donación y características del donador como el género, edad e incluso tamaño y número de nefronas donadas) y proteinuria.^{34,35}

I.4.1.A.- Proteinuria

En condiciones normales, la excreción urinaria de proteínas se encuentra restringida tanto por la carga eléctrica, tamaño, estructura molecular de las mismas, así como por el metabolismo tubular proximal.^{36,37} A pesar de esto existe cierta excreción que en un adulto sano alcanza los 50 mg/24h en promedio (aunque se reportan valores entre 40 – 80 mg/24h)³⁸ con un umbral máximo para la “normalidad” de 75 – 150 mg/24h (este umbral máximo se puede alcanzar e incluso rebasar en condiciones de estrés como ejercicio extenuante, fiebre y estrés emocional intenso o incluso como respuesta a la infusión de norepinefrina o angiotensina).³⁹ Esta proteinuria normal es una mezcla de proteínas plasmáticas de alto (inmunoglobulinas), mediano (albúmina) y bajo peso molecular (PM < 25 kD, lisosimas, ribonucleasas, cadenas ligeras de inmunoglobulinas, productos de degradación de la fibrina, hormonas peptídicas, proteínas transportadoras de hormonas, etc.),^{39,40} además de proteínas no plasmáticas de origen tubular renal (uromodulina o proteína de Tamm Horsfall).^{30,40} Así pues, podemos hablar de proteinuria en términos generales y como un caso particular de ésta, la albuminuria. (**Figura I.2)**

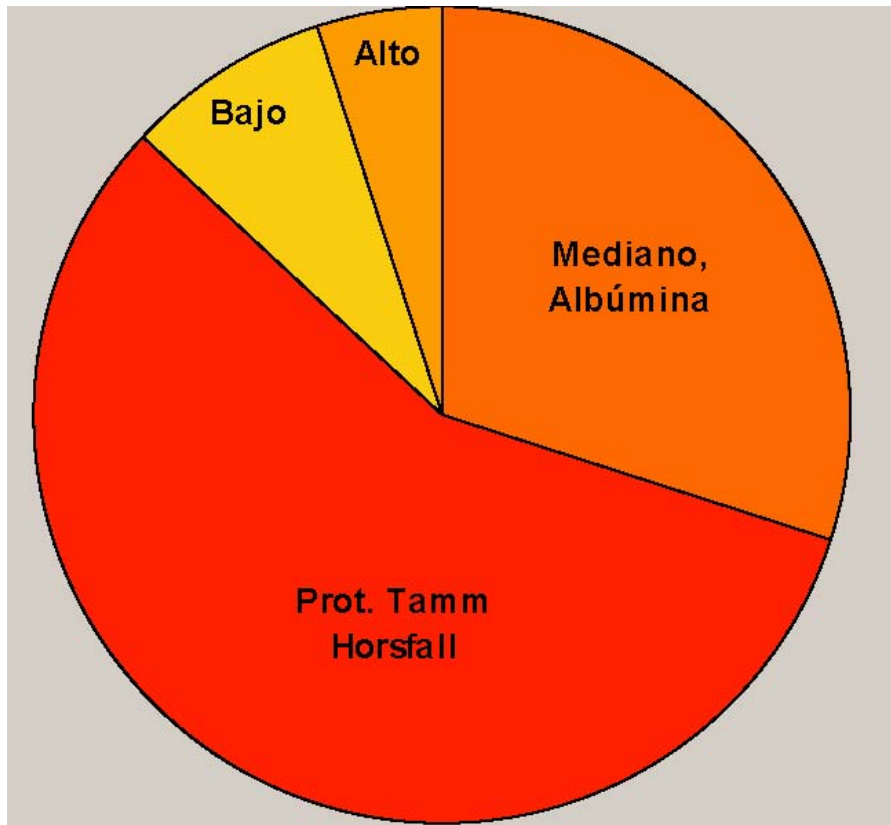


Figura I.2. Composición proteica normal de una muestra urinaria.^{39,40}

Las proporciones se muestran como de origen plasmático: alto, mediano y bajo peso molecular; y las de origen tubular (no plasmáticas): proteínas de Tamm Horsfall.

Para fines del presente trabajo, el término proteinuria se empleará para describir la presencia anómala de proteínas en orina de acuerdo a la [Tabla I.4](#), que refleja el consenso internacional. Como se ha mencionado, la proteinuria constituye un marcador sensible de daño en diferentes tipos de enfermedad renal crónica, antecedendo al deterioro de la TFG y desarrollo de lesiones visibles por estudios de gabinete.^{7,39,40}

Tabla I.4: Tipos de Proteinuria⁷

	Normal	Clínicamente significativa
Proteinuria Total	< 300 mg	≥300 mg*
Albuminuria	< 30 mg	≥30 mg**

*Los términos subnefrótico y nefrótico se refieren al grado de proteinuria o albuminuria que se encuentra dentro de los rangos 300-3499mg/24h o por encima de ese rango, respectivamente.

**El termino microalbuminuria describe el rango entre 30 y 299 mg/24h.

Tradicionalmente el origen de la albuminuria ha sido atribuido a la disfunción de la barrera de filtración glomerular.^{36,37,41} Sin embargo, existen mecanismos descritos recientemente que localizan el origen de la proteinuria más allá de esta barrera. De entre sus componentes (**Figura I.3**), los de mayor relevancia en lo que a proteinuria respecta son el glucocaliz y los diafragmas de hendidura de las células epiteliales viscerales o podocitos.^{36,37,41-43}

El primero (glucocaliz), consiste en una “malla” de glicoproteínas y proteoglicanos que se extiende en toda el área de superficie del endotelio vascular glomerular (incluyendo las fenestras) y de células epiteliales viscerales (podocitos).^{36,41,43} Debido a sus componentes altamente sulfatados y glucosilados (principalmente podocalixina) prevalece una carga negativa que repele a las moléculas de albúmina sérica.^{36,41-43} Los diafragmas de hendidura son los responsables de la permeabilidad selectiva para las proteínas y albúmina y se componen por una intrincada red de proteínas ancladas en la membrana celular que se extienden de un pedicelo a otro formando una especie de “cremallera” (**Figura I.3**).^{36,43,45}

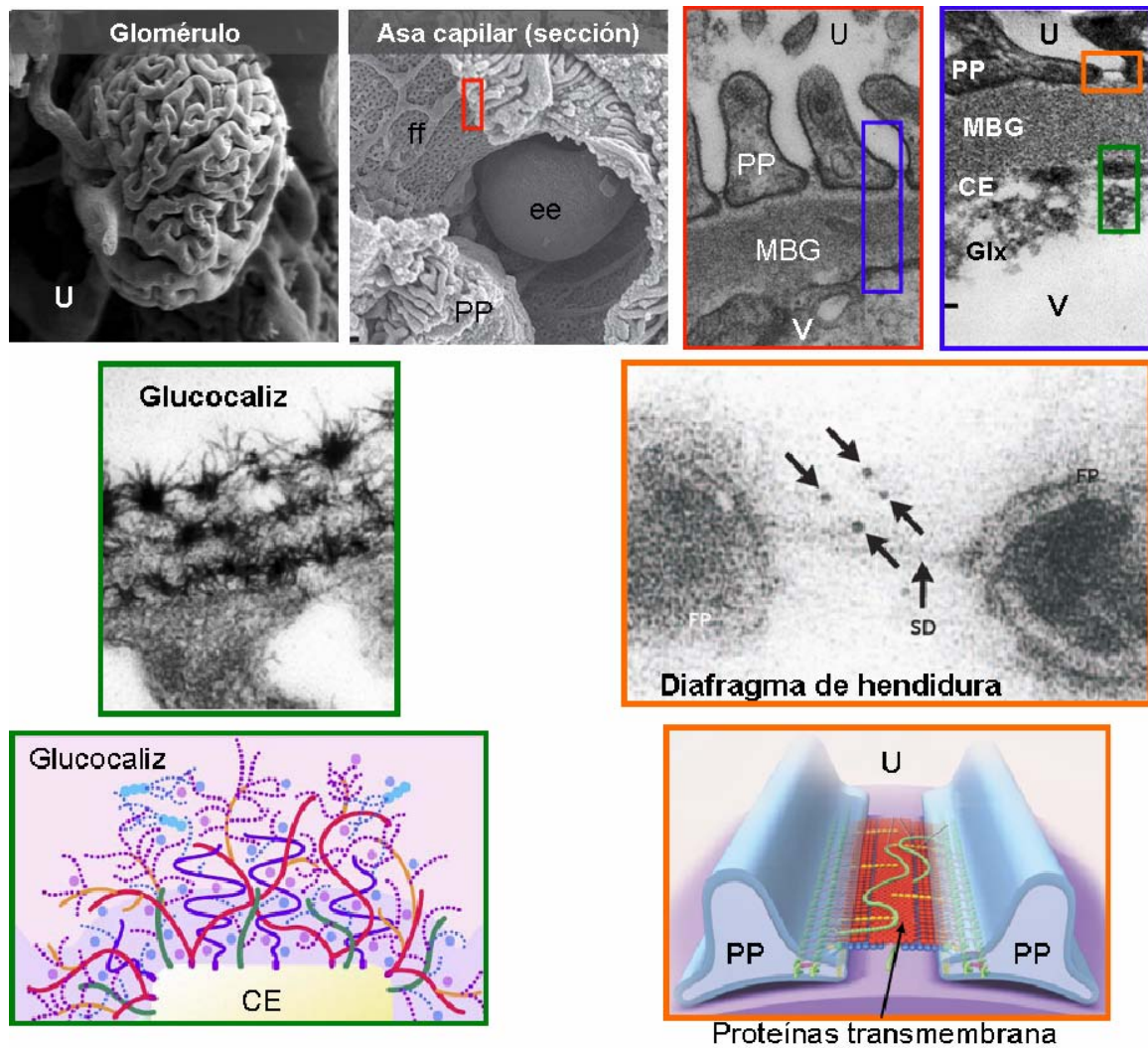


Figura 1.3.Componentes de la barrera de filtración. 1) Arriba, izquierda. Microscopía electrónica por barrido de un ovillo glomerular desprovisto de su cápsula. 2) Arriba, centro. Microscopía electrónica por barrido de la sección transversal de un capilar glomerular que asoma en su interior un eritrocito (ee), el endotelio vascular fenestrado (ff) así como los pedicelos (PP) o proyecciones digitiformes de los podocitos que rodean o “abrazan” al capilar glomerular. 3) Cuadro de borde rojo. Microscopía electrónica. Corte transversal de la barrera de filtración glomerular que muestra los pedicelos (PP), membrana basal glomerular (MBG) así como el espacio vascular (V) y urinario (U). 4) Cuadro azul. Microscopía electrónica a mayor detalle que muestra el espacio urinario (U), pedicelos (PP), los diafragmas de hendidura (recuadro naranja), MBG, células endoteliales (CE) y el glucocáliz (Glx, recuadro verde) así como el espacio vascular (V). 5) En medio izquierda, enmarcado en verde. Microscopía electrónica a mayor detalle del glucocáliz que emerge de las células endoteliales. 6) En medio derecha, enmarcado en naranja. Microscopía electrónica a mayor detalle que muestra los diafragmas de hendidura (SD) que emergen de dos pedicelos (PP) a los que unen. Los “puntos” (flechas)

representan estructuras protéicas del mismo diafragma. 7) Abajo, izquierda enmarcado en verde. Representación esquemática del glucocáliz emergiendo de una célula endotelial (CE). 8) Abajo, derecha enmarcado en naranja. Representación esquemática del diafragma de hendidura que conecta dos pedicelos (PP, en azul). Obsérvese la configuración en “cremallera” de las diferentes proteínas ancladas al citoplasma de los pedicelos. Tomadas de las referencias 41, 43 y 44.

La proteinuria refleja sin duda la alteración o disfunción de la nefrona en cualquiera de sus componentes (barrera de filtración glomerular o túbulo proximal).^{36,37,42,43,46}

1.4.1.B.- Proteinuria en el Trasplante Renal

La prevalencia de proteinuria en pacientes trasplantados varía considerablemente entre distintos reportes, de 7.5 a 45%; las principales diferencias se encuentran en los puntos de corte empleados (> 2-3 g/d, 1 g/d, >0.5 g/d). Para un punto de corte > 0.5g/d, la prevalencia reportada en la literatura oscila entre 13 y 36%, ciertamente mayor que en la población general.^{38,47} Durante el periodo postrasplante temprano, la prevalencia varía del 7.5 al 30% de los casos.^{38,48} Generalmente, tiene su origen en la función residual de los riñones nativos y de acuerdo con la evidencia existente, ésta tiende a desaparecer en el transcurso de 1 a 10 semanas³⁸ de tal forma que aquellos en los que persiste por más de 3 meses con un valor \geq 500 mg/d, su presencia debe atribuirse a daño del injerto renal y que para fines de protocolos como el presente, este sería el tiempo mínimo de seguimiento postrasplante para poder ser incluidos (en nuestro caso es de 6 meses).⁴⁹ Así, la presencia de proteinuria después de 3 meses postrasplante refleja daño estructural del injerto, y se ha asociado a mayor deterioro de la función del injerto renal y reducción de su sobrevida.⁴⁷⁻⁵³ Así, dependiendo del grado de

proteinuria, el riesgo relativo de perder la función del injerto renal a un año va de 2.3 a 3.5 veces más que aquellos sin proteinuria.⁵⁴ Diferentes autores, han reportado datos semejantes.^{50,48,53}

Existe una relación clara entre la magnitud de la proteinuria y todos aquellos factores que condicionan mayor daño en el injerto, como son: donador añoso, donador fallecido de causa cardiovascular (refleja mayor daño endotelial), tiempos de isquemia prolongados (daño por isquemia-reperfusión) y eventos de rechazo previos (procesos aloinmunes), así como, con glomerulopatías *de novo* y recurrencia de la enfermedad original.^{51,53} Gran parte de los factores antes citados condicionan un estado inflamatorio con lesión mediada por complemento del endotelio vascular en los capilares glomerulares y peritubulares. En los glomérulos, la barrera de filtración glomerular pierde su selectividad para proteínas y en los túbulos las vías de recuperación en las células tubulares proximales se ve alterada.^{27,55-60} El estado continuo de lesión-reparación además de la disminución progresiva de los capilares peritubulares culmina en el desarrollo de fibrosis intersticial, atrofia tubular, explicando así porqué el daño crónico del injerto invariablemente se acompaña de proteinuria.^{15,17,19,21,24,27}

I.4.2.- Causas *de DCI* inmunológicas (Dependientes de aloantígenos)

Como se mencionó anteriormente existen también las causas inmunológicas que llevan al DCI, ya sea por daño mediado por la inmunidad celular o por la inmunidad humoral como se verá más adelante. En esta última, es muy importante la existencia previa al trasplante de alosensibilización a través de transfusiones sanguíneas, el embarazo, trasplantes previos. Pero

otros factores de alto riesgo inmunológico son: discordancia de HLA, inmunosupresión deficiente, episodios de rechazo agudo y %PRA elevado (que traduce un alto grado de alosensibilización, es decir, una elevada cantidad de anticuerpos anti-HLA presentes en suero sanguíneo de los pacientes trasplantados).^{15,17,20,24}

1.4.2.A.- Anticuerpos anti-HLA (Barreras inmunológicas)

El término histocompatibilidad tuvo su origen tras observar el éxito de injertos entre gemelos monocigóticos. Este término, designa a grosso modo el grado de semejanza inmunológica entre individuos.⁶¹ Tal semejanza está determinada principalmente por un sistema de antígenos mayores de histocompatibilidad, en nuestro caso se denomina sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA); y corresponde a un grupo de genes altamente polimórficos que codifican para proteínas de superficie en toda célula nucleada de la economía (antígenos HLA Clase I y Clase II), codificadas en la región del complejo principal de histocompatibilidad contenida en el brazo corto del cromosoma 6.⁶²

Los anticuerpos anti-HLA pueden ser generados por cualquier individuo mediante alosensibilización al exponerse a células humanas ya sea por transfusión, embarazos o en el caso del receptor de un trasplante ante la exposición a los antígenos HLA del complejo principal de histocompatibilidad presentes en el injerto del donador y que sean distintos a los que posee el receptor.⁶²

Al concluir la anastomosis de los vasos sanguíneos e iniciar la perfusión del injerto renal, tiene inicio la interacción entre células “T” efectoras del receptor y células presentadoras de

antígenos (APC) residentes en el injerto renal, es decir, del donador (vía directa de presentación de aloantígenos) y APC del receptor (vía indirecta de presentación de aloantígenos). Los antígenos HLA del donador así presentados, son reconocidos como ajenos, despertando una respuesta inmune específica que puede ser de tipo exclusivamente celular (resultando en un rechazo celular puro por células T) o una respuesta con la producción de anticuerpos dirigidos contra el donador (anticuerpos anti-HLA donador específico) que da como resultado un rechazo mediado por anticuerpos o humoral, o la combinación de ambos.^{15,63,64}

Algunos autores consideran que la vía directa de presentación de aloantígenos, es la responsable del rechazo agudo observado durante los primeros meses posteriores al trasplante renal; periodo en el que según evidencia experimental las APC del donador han desaparecido por completo.⁶⁴⁻⁶⁶ y que la vía indirecta de presentación de aloantígenos es la responsable de mantener una respuesta inmune sostenida en contra del injerto renal^{63,64} cuya intensidad se encuentra directamente relacionada con el grado de compatibilidad entre donador y receptor así como del estado de sensibilización previa al trasplante; de tal forma que la presencia de anticuerpos se relaciona directamente con el deterioro progresivo de la función del injerto e indirectamente con la sobrevida del mismo.^{34,67-79}

1.5.-Proteinuria y daño endotelial

En estudios más recientes han demostrado que la proteinuria es un marcador precoz del daño producido en los capilares glomerulares por anticuerpos anti-HLA Clase II, antes de que las

manifestaciones histológicas de la glomerulopatía del trasplante fueran visibles. La presencia de proteinuria, entre todos los pacientes con anticuerpos anti-HLA clase II, particularmente, identifica a un subgrupo de pacientes con alta incidencia de glomerulitis y alto riesgo de desarrollar glomerulopatía del Trasplante en el futuro. Estudios realizados con microscopio electrónico demostraron que el daño en las células endoteliales del capilar glomerular precede a los cambios histológicos que consideramos diagnósticos de la glomerulopatía del trasplante.⁸⁰

Si bien las causas de proteinuria y deterioro de la función en el injerto renal son diversas, las lesiones histopatológicas propias del trasplante por lo general se diferencian claramente de aquellas atribuidas a glomerulopatías primarias y/o secundarias. Esta distinción, se ve facilitada aún más, por el bajo porcentaje de glomerulopatías primarias (recurrentes o de novo) que se presentan posterior al trasplante.^{60,81-85}

Con el objeto de estandarizar la interpretación de las biopsias de injertos renales y con ello unificar la evidencia generada concerniente al trasplante renal, en 1991 se creó la clasificación histopatológica de Banff.⁹⁶⁹⁷ Esta clasificación y sus actualizaciones han mejorado la caracterización de lesiones crónicas asociadas preponderantemente a mecanismos de aloinmunidad cuya huella histopatológica, ubicada en el área cortical, se caracteriza por a) infiltrados linfocitarios “en parches” b) zonas de fibrosis intersticial, c) atrofia tubular, d) glomerulopatía crónica del injerto, e) vasculopatía crónica del injerto y f) laminación de la membrana basal de los capilares peritubulares.^{16,85-87} La inmunofluorescencia constituye un elemento útil para la interpretación de la biopsia renal. La presencia de fragmentos del complemento (V. gr. C4d) depositados a lo largo de la membrana basal glomerular y de los

capilares peritubulares es sin duda, la prueba fehaciente de la intervención de los anticuerpos en el daño agudo y crónico del injerto renal.^{96,97} La frecuencia y magnitud de las alteraciones histológicas observadas dependen directamente del grado de proteinuria al momento de la biopsia renal; de tal forma que en pacientes con proteinuria de 3g/d o más se identifican lesiones en el 60% de los casos, en comparación con el 12% obtenido en pacientes con 1g/d o menos de proteinuria. A su vez, la presencia de lesiones crónicas guarda relación con el deterioro de la función del injerto.^{60, 81-87}

En resumen, el daño inmunológico del injerto es causado por diferentes elementos del sistema inmune del receptor (células "T", monocitos, anticuerpos, factores del complemento, etc.) que al reconocer diferentes antígenos del donador (V gr. HLA) presentes en el injerto renal, ponen en marcha los dos grandes brazos de la inmunidad: celular y humoral. El fundamento teórico para este estudio propone que el daño estructural glomerular inducido por anticuerpos anti-HLA resulta en un incremento de la permeabilidad glomerular con el consecuente incremento de proteinuria glomerular, que a su vez promoverá mayor daño estructural en el injerto con la consecuente pérdida progresiva de la función. Adicionalmente, debido a que el endotelio vascular de los capilares peritubulares expresan antígenos HLA clase I y clase II, el daño inducido a estos capilares por los anticuerpos puede condicionar también alteración en la función tubular, explicando así el incremento en la proteinuria tubular.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El daño endotelial de múltiples etiologías puede condicionar un aumento en la permeabilidad del capilar glomerular con la consecuente aparición de proteinuria, que aunado al daño tubular y su consecuente alteración en la reabsorción de proteínas a ese nivel, explican el incremento en la proteinuria. Dicha proteinuria promoverá mayor daño estructural renal al promover mayor estrés oxidativo e inflamación tisular con la consecuente pérdida progresiva de su función. Debido a que el endotelio vascular de los capilares glomerulares y peritubulares expresan antígenos HLA clase I y clase II, los anticuerpos anti-HLA pueden inducir daño directo a estos capilares ocasionando proteinuria y el daño previamente descrito, de tal manera que en receptores de trasplante renal, la proteinuria, es un factor de riesgo independiente para la pérdida del injerto renal y muerte del paciente con injerto funcional.

Este daño endotelial inducido por los anticuerpos anti-HLA en receptores de trasplante renal puede ocasionar un amplio espectro de enfermedad, pudiendo manifestarse como rechazo agudo mediado por anticuerpos, con rápido deterioro de la función renal y pérdida del injerto si no se da tratamiento, hasta un rechazo humoral subagudo o crónico con elevación muy discreta pero progresiva de la creatinina y proteinuria en diferentes grados, para finalmente ocasionar pérdida del injerto renal. Hasta el momento no existen estudios que demuestren la asociación entre la presencia de anticuerpos anti-HLA y la proteinuria que suele observarse en pacientes trasplantados. Por lo anterior, el presente proyecto pretende contestar la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la correlación entre los niveles de Ac-HLA con la presencia y grado de proteinuria en pacientes adultos receptores de trasplante renal?

III. JUSTIFICACIÓN

El trasplante renal es considerado la mejor opción terapéutica, sin embargo, a pesar de la mejoría en la sobrevida del injerto renal a corto plazo, lograda en el transcurso de las últimas 2 décadas, no ha podido trasladarse a los resultados que se observan a largo plazo. La pérdida de los injertos renales significa reingresar a los pacientes a programas de terapia sustitutiva de la función renal, cuyos costos biológicos y económicos superan de manera significativa los costos de mantener injertos funcionales.

La medición seriada de anticuerpos anti-HLA postrasplante pudiera ayudar a su detección temprana y tratarlos de manera oportuna, sin embargo sus altos costos lo hacen inviable, sobretodo porque pudiera pasar mucho tiempo entre su aparición y la producción de daño al injerto. De tal manera que el uso de subrogados como la proteinuria con menor costo y fácil determinación, pudiera ayudar a determinar el momento en que ya hay daño endotelial y en ese momento medir los anticuerpos para su posible tratamiento. Dado lo anterior y aunado a que nos encontramos en un centro de alta especialidad, donde se refieren a pacientes adultos candidatos a recibir un trasplante renal y que se cuenta con el equipo necesario para realizar las mediciones pertinentes, consideramos factible el realizar este tipo de estudios. Además, en la literatura no hay reportes de la correlación entre estos anticuerpos y la proteinuria lo que lo hace un estudio novedoso.

De resultar positiva la correlación de la intensidad de los anticuerpos anti-HLA y el grado de proteinuria, ayudará a ampliar el conocimiento de su fisiopatología, así como facilitar la detección oportuna de la lesión por anticuerpos, incluso antes de la elevación de creatinina.

IV. HIPÓTESIS

A mayor grado de luminiscencia y número de anticuerpos anti-HLA, habrá mayores niveles de proteinuria, con un coeficiente de correlación de al menos 0.6, en los pacientes adultos receptores de trasplante renal.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la correlación del grado de luminiscencia y número de los anticuerpos anti-HLA con los niveles de proteinuria en pacientes adultos receptores de trasplante renal.

Objetivos específicos:

- 1.- Conocer la frecuencia de pacientes adultos receptores de trasplante renal con anticuerpos anti-HLA.
- 2.- Identificar el número de anticuerpos anti-HLA positivos en cada paciente y la intensidad de luminiscencia de los mismos.
- 3.- Identificar la frecuencia y nivel de proteinuria en pacientes adultos receptores de trasplante renal.
- 4.- Correlacionar el grado de luminiscencia de los anticuerpos anti-HLA con los niveles de proteinuria en pacientes adultos receptores de trasplante renal.
- 5.- Comparar la proteinuria de los pacientes con anticuerpos anti-HLA dirigidos contra el donador *versus* aquellos que son inespecíficos.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

a. Diseño del Estudio:

Estudio clínico transversal y descriptivo.

b. Universo de estudio:

Pacientes adultos receptores de trasplante renal con seguimiento en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

c. Tamaño de muestra:

Ante la falta de información al respecto, no se tienen datos para hacer un cálculo del tamaño de muestra en base a cifras previamente publicadas, sin embargo, se hizo un cálculo basado en cifras clínicamente significativas. Se utilizó una fórmula para correlación simple en un grupo. De acuerdo a lo planteado en la hipótesis, se estableció por el grupo de trabajo que sería clínicamente relevante una correlación de al menos 0.6. De tal manera que para un nivel de significancia de 0.05, con un poder estadístico del 80% y utilizando la fórmula:

$$n = 3 + K / C^2$$

$$K = (Z\alpha + Z\beta)^2 = 6.2$$

$$C = 0.5 \ln (1+r)/(1-r) = 0.693$$

r=Coeficiente de correlación esperado = 0.6

Sustituyendo la fórmula $n = 3 + 6.2 / 0.693^2 = 3 + 6.2 / 0.480 = 3 + 12.9 = 15.9$

Se requieren un mínimo de **16** pacientes para la realización de este estudio.

d. Lugar de Realización:

Se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

e. Periodo de Estudio:

Marzo de 2009 a Febrero de 2011.

f. Criterios de Inclusión:

- Pacientes receptores de trasplante renal de ambos géneros, de 18 a 65 años de edad.
- Que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado aprobado por el comité institucional de investigación biomédica en humanos.
- Receptor de primer trasplante renal.
- Aquellos con 1 año mínimo post-trasplante renal.
- Con injerto funcional, definido para este estudio bajo el criterio de tener tasa de filtración glomerular estimada por fórmula MDRD mayor o igual a 30 ml/min.
- Que contaran con biopsia renal, en la cual se descartaran patologías relacionadas con la producción de proteinuria.

g. Criterios de Exclusión:

- Receptores de Trasplante multiorgánico.
- Antecedente de trasplante de órgano extrarenal.

- Antecedente histológico conocido de patología recidivante en el injerto renal de la glomerulopatía primaria o glomerulopatía de *novo*, distinta a la glomerulopatía del trasplante.

h. Variables:

Dependiente: Nivel de Proteinuria

Independientes: Anticuerpos anti-HLA, tensión arterial elevada, inmunosupresores.

Sociodemograficas: Edad, sexo.

Antecedentes: Creatinina Sérica, transfusiones, embarazos, trasplantes previos.

i. Descripción operacional de las variables:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
Nivel de Proteinuria	Cantidad de proteínas en la orina de 24 hrs. ajustada para creatinuria.	Cuantitativa continua	Relación proteinuria/ creatinuria (mg/g)
Presencia de	Presencia de proteínas en orina.	Cualitativa	SI / NO

Proteinuria			
Número de Anticuerpos anti-HLA positivos	Moléculas proteicas derivadas del CMH, las cuales nos determinan la presencia de anticuerpos anti-HLA en suero sanguíneo.	Cuantitativa continua	Número
Intensidad de luminiscencia de los anticuerpos anti-HLA positivos	Moléculas proteicas derivadas del CMH, las cuales nos determinan la presencia de anticuerpos anti-HLA en suero sanguíneo.	Cuantitativa continua	Unidades de luminiscencia
Presencia de anticuerpos anti-HLA	Anticuerpos anti-HLA detectados en suero.	Cualitativa	SI / NO
Anticuerpos anti-HLA donador específico	Presencia de Ac-HLA con más de 500 unidades dirigidos contra especificidades presentes en el donador	Cualitativa	SI / NO
Tensión Arterial	Presión que ejerce la sangre contra la pared de las arterias.	Cuantitativa continua	mmHg
Inmunosupresores	Fármaco que produce la inmunosupresión del sistema inmunológico. Utilizado para	Nominal	Tacrolimus Micofenolato Sirolimus

	minimizar el rechazo de órganos trasplantados.		Azatioprina Ciclosporina Prednisona
Creatinina Sérica	Producto de desecho del metabolismo normal de los músculos, producida por el cuerpo en una tasa constante. Normalmente filtrada por los riñones y excretada en la orina.	Cuantitativa continua	mg/dl
Transfusiones	Antecedente de haber recibido una transfusión de hemoderivados.	Nominal	SI / NO
Embarazos	Número de embarazos, independientemente de su desenlace	Nominal	SI / NO
Abortos	Antecedente de abortos.	Nominal	SI / NO
Número de Trasplantes	Antecedente de trasplante renal previo.	Cuantitativa discreta	Número de trasplante

Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo.	Cuantitativa discreta	Años
Sexo	Diferencia de entidad definida por los órganos reproductores.	Nominal	Masculino Femenino

j. Procedimientos

Se estudiaron 61 pacientes trasplantados renales, que acudieron a consulta de este instituto. De cada uno de ellos se hizo una revisión exhaustiva del expediente para corroborar criterios de inclusión y exclusión, una vez verificado que cumplieron con cada uno de los criterios, se contactó al paciente, se programó una entrevista con fines informativos acerca del procedimiento. Posterior a la aclaración de dudas se invitó a participar en el protocolo de investigación previa firma del consentimiento informado aceptado por el comité de ética institucional. Se tomaron del expediente la información necesaria y se tomaron las muestras de suero y orina correspondientes, que una vez preparadas se congelaron a menos 70 °C hasta su medición.

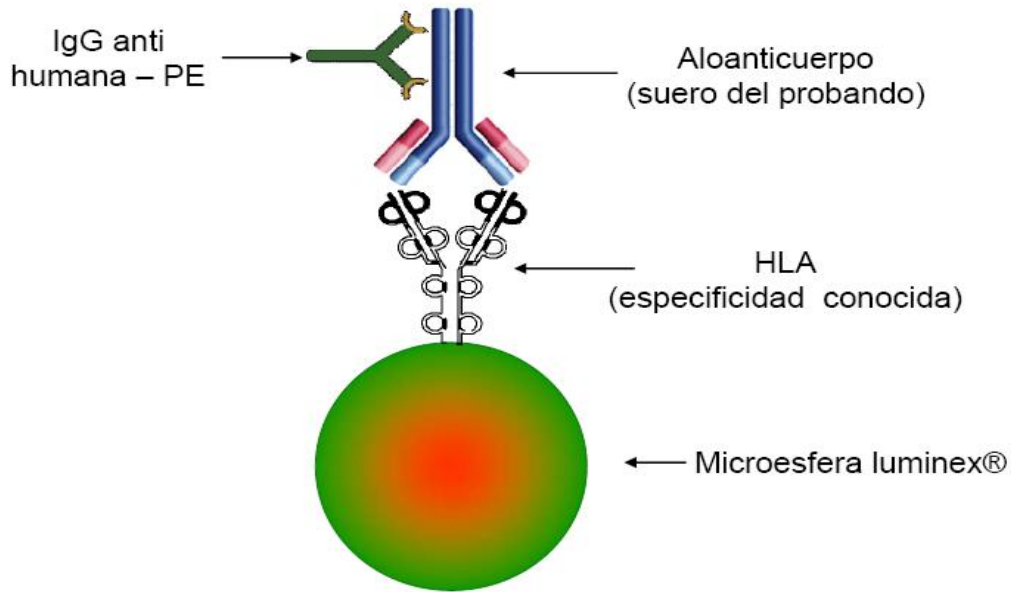
1. Determinación de anticuerpos anti-HLA. Se empleó la tecnología LUMINEX que emplea un equipo analizador marca “LABScan®100 flow analyzer” (LUMINEX xMAP®, Luminex Corporation, Austin, Texas, USA). Esta tecnología emplea cuentas o microesferas hechas de poliestireno. En

la superficie de cada microesfera, se encuentran adheridos los antígenos HLA obtenidos mediante tecnología recombinante utilizando líneas celulares linfoblastoides que producen moléculas de HLA (clase I o II) de distintas especificidades. El suero del paciente se une a dichas especificidades antigénicas y un anticuerpo secundario (de cabra) dirigido contra IgG humana y marcado con un material fluorescente (ficoeritrina) se une a los complejos formados por el anticuerpo unido al antígeno HLA. De esta forma, se puede identificar una especificidad de HLA mediante la intensidad con que fluoresce cada microesfera. La detección de anticuerpos anti-HLA por Luminex puede hacerse por tres métodos distintos, siendo de menos a más especificidad como sigue: el primero o de escrutinio, emplea el reactivo Labscreen Mixed (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) que permite detectar la presencia de anticuerpos en suero discriminando si éstos son dirigidos contra moléculas HLA (clase I o II), sin determinar su especificidad, por lo que su resultado se interpreta como positivo o negativo para clase I, II o ambos. El segundo método o de fenotipo, difiere en que cada perla contiene 6 antígenos clase I o clase II y permite identificar los alelos del HLA contra los que van dirigidos los anticuerpos detectados como si se utilizaran células vivas (de clase I: HLA-A, -B o -C o clase II: HLA-DR, -DQ o -DP). El tercer método y más sensible/específico (fu el utilizado por nosotros para este protocolo), conocido como la prueba de un solo antígeno, se caracteriza porque cada microesfera contiene un solo antígeno HLA; la técnica es como se detalla a continuación: 20 µL de suero del sujeto a examinar se agregó a 5 µL de las microesferas de Labscreen Single Antigen® cubiertas con antígenos HLA clase I (LS1A01, A02 y A03 lote 8) o clase II (LS2A01 lote 4), se incubaron en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente y después lavadas 3 veces con solución búfer. Después se agregó 100 µL del anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con ficoeritrina (anticuerpo secundario) y se incubó por 30 minutos sin exposición a

la luz y a temperatura ambiente. Después del enjuague final (2 lavados con solución búfer), las muestras fueron leídas con el equipo de Luminex LABScan®100 flow analyzer (LUMINEX xMAP®, Luminex Corporation, Austin, Texas, USA). Cada grupo de microesferas incluye microesferas sin recubrimiento que funcionan como control negativo. Las placas para lectura en el equipo Luminex pueden incluir hasta 94 sueros, además de un suero control negativo y otro control positivo.⁹⁰

Interpretación de resultados. Los valores de luminiscencia generados a partir del equipo lector de Luminex (LABScan®100) se analizaron utilizando el software HLA Visual® versión 2.2.0 (One Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA). Los valores de luminiscencia que corresponden a la media truncada para “single antigen” fueron obtenidos desde archivos generados por el analizador de flujo (archivos *.csv) y se ajustaron para los controles negativos usando la formula: [(Luminiscencia de la microesfera # de la muestra X – Luminiscencia de la microesfera sin recubrimiento de la muestra X) – (Luminiscencia de la microesfera # del suero control negativo – Luminiscencia de la microesfera sin recubrimiento del suero control negativo)].

Se consideraron positivas para la presencia de un anticuerpo específico solo aquellas muestras con luminiscencia mayor de 500 para dicha especificidad, después de su normalización con los controles negativos.



Principios de la Tecnología LUMINEX

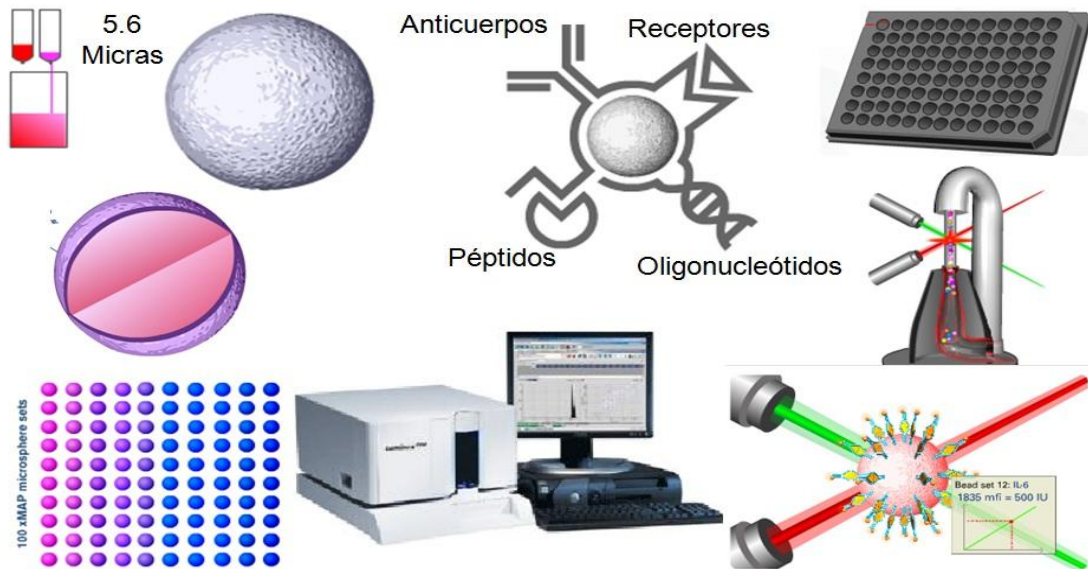


Figura VI.1.- Esquema que muestra las microesferas con pigmento fluorescente en su interior y que tienen unido a su superficie un antígeno conocido, en este caso HLA. Unido a éste antígeno, se encuentra el aloanticuerpo presente en el suero en estudio, al que se une la IgG caprina marcada con ficoeritrina. Los haces de luz LASER inciden sobre la microesfera y la ficoeritrina desencadenando una reacción de fluorescencia que permite identificar la especificidad contra la cual está dirigido el anticuerpo presente en suero.⁸⁸

2. Proteinuria. La determinación de proteínas se realizó por medio de turbidometría y se midió el contenido en orina de 24 hrs. El resultado se normalizó para el contenido de creatinina en la misma muestra, es decir, se utilizó el índice proteinuria/creatinuria.

3. Evaluación de la función renal

La función renal cuantificada como TFG se evaluó por: cálculo mediante la fórmula de cuatro variables derivada del estudio “Modificación de la Dieta en Enfermedad Renal” (MDRD)³⁷ que se muestra abajo:

$$\text{TFG}_e = 186 \times [\text{CrS}]^{-1.154} \times [\text{edad}]^{-0.203} \times [0.742 \text{ si mujer}] \times [1.212 \text{ para raza negra}]$$

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron frecuencias y proporciones para las variables nominales. Las variables numéricas continuas se analizaron mediante la prueba de “Z” de Kolmogorov–Smirnov para conocer su distribución. Los resultados se muestran como medias \pm desviación estándar dado que las variables incluidas tuvieron una distribución normal. Por su distribución normal, para el análisis de la correlación se empleó correlación de Pearson. Consideramos significativa una p menor de 0.05.

VIII. RESULTADOS

Características generales de la población de estudio.

En el estudio se incluyeron 61 pacientes. La media de edad para la población fue de 37.30 ± 12.90 años, con 31 (51.6%) del sexo femenino. En el 59.0% de ellos el injerto se obtuvo de un donador vivo relacionado, a pesar de lo cual, 33 de los pacientes (54.1%) no comparten ningún haplotipo y solo 3 receptores comparten 2 haplotipos con su donador. También se observa que en la mayoría de pacientes (60.7%), la etiología de la IRCT no fue identificada. Hablando de terapia sustitutiva el 80.3% estaba en diálisis al momento del trasplante (el resto se trasplantó prediálisis), observando que el mayor número de pacientes (42.6%) se encontraba en diálisis peritoneal. El grupo sanguíneo con mayor prevalencia fue O positivo, que presentaron 38 pacientes (62.3%). Para el 100% de los pacientes, este fue su primer trasplante. En la [Tabla VIII.1](#) se muestran con más detalle las características de la población.

Tabla VIII.1.- Características basales de la población estudiada.

Variable	N = 61	100 %
Edad años (Media ± DE)	37.30 ± 12.90	
Sexo Femenino	31	50.8
Donador Fallecido	10	16.4
Donador Vivo Relacionado	36	59.0
Donador Vivo No Relacionado	15	24.6
2 Haplotipos iguales	3	4.9
1 Haplotipo igual	25)	41.0
0 Haplotipos iguales	33	54.1
Etiología Desconocida	37	60.7
Lupus	5	8.2
Enfermedad Poliquística	5	8.2
Hemodiálisis	14	23.0
Diálisis Peritoneal	26	42.6
Receptor Grupo O+	38	62.3
Receptor Grupo A+	15	24.6
Primer Trasplante	61	100

DE: Desviación estándar.

Tratamiento de Inducción y de Mantenimiento.

El tratamiento de los pacientes, tanto de inducción como los esquemas de mantenimiento que se manejan en cada uno de ellos, son otra área importante que se debe conocer y mencionar, por la tanto en la **Tabla VIII.2** se muestra como 44 (72.1%) de los pacientes recibió algún tipo de inducción al momento del trasplante. El fármaco de inducción más utilizado fue el bloqueador del receptor de interleucina 2 (Daclizumab), que se utilizó en 27 pacientes (44.3%).

Tabla VIII.2.- Tratamiento de Inducción y de mantenimiento.

	N = 61	100 %
SIN INDUCCION	17	27.9
INDUCCION	44	72.1
Daclizumab	27	44.3
Basiliximab	13	21.3
Timoglobulina	4	6.5
ESQUEMAS DE		
INMUNOSUPRESION		
Tacrolimus/Micofenolato de	39	63.9

Mofetilo/Prednisona		
Ciclosporina/Micofenolato de		
Mofetilo/Prednisona	11	18.0
Azatioprina/Prednisona	3	4.9
Otros	8	13.2

En cuanto a esquemas de tratamiento de mantenimiento, el más utilizado en los 61 pacientes del estudio fue el conformado por Tacrolimus – Micofenolato de Mofetilo - Prednisona, como se muestra en la [Tabla VIII.2](#); el segundo esquema más utilizado fue el de Ciclosporina – Micofenolato de Mofetilo – Prednisona, y finalmente la combinación de azatioprina – prednisona que corresponde a los receptores de trasplantes que compartían 2 haplotipos con su donador.

Desarrollo de anticuerpos.

De los 61 pacientes que se incluyeron en el estudio, 37 de ellos (60.7%), presentaron anticuerpos anti-HLA Clase I y/o Clase II. Los pacientes que presentaron anticuerpos anti-HLA se categorizaron en dos grupos, 15 con Anticuerpos anti-HLA Donador Específico (24.6%) y 22 con Anticuerpos anti-HLA NO Donador Específico (36.1%); el resto de los pacientes no presentaron anticuerpos en contra de ninguna especificidad (n=24, 39.3%).

En la **Figura VIII.1** se muestra el porcentaje de pacientes que desarrollaron anticuerpos anti-HLA. Se agruparon como se describe a continuación: a) si presentaron o no anticuerpos anti-HLA; b) en el caso de aquellos con anticuerpos se muestra la frecuencia de cada una de las especificidades: clase I, clase II y clase I+II; finalmente c) si los anticuerpos anti-HLA pertenecían al grupo de anticuerpos donador específico (DE) o al de anticuerpos NO donador específico (NDE). Se puede observar claramente un mayor porcentaje para aquellos que presentaron especificidades clase I + clase II. También se observa un mayor número de pacientes que presentaron anticuerpos NDE.

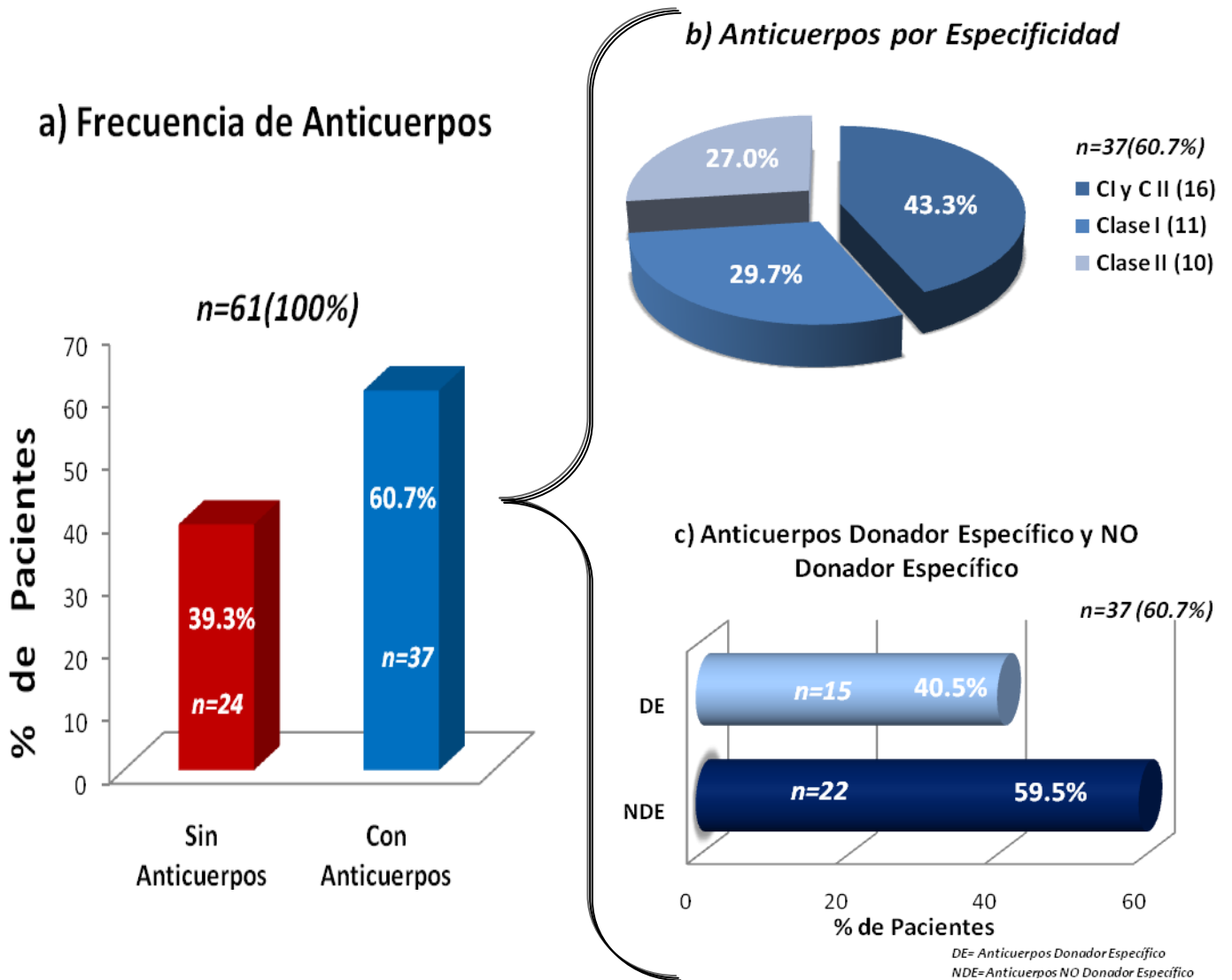


Figura VIII.1.- Frecuencia y distribución de los anticuerpos anti-HLA encontrados en la población estudiada. a) Población con y sin anticuerpos anti-HLA en general; **b)** Distribución por clase a la que están dirigidos los anticuerpos encontrados; y **c)** Proporción de anticuerpos positivos que son donador específico y no donador específico.

En la **Tabla VIII.3** se muestra la prevalencia de anticuerpos anti-HLA para cada especificidad (clase I y clase II). Para clase I el locus más frecuente fue el A y su especificidad A*2402; en cuanto a clase II, el locus más frecuente fue DQ y la especificidad con mayor prevalencia DQB1*0301.

Tabla VIII.3.- Prevalencia de anticuerpos anti-HLA para cada especificidad clase I y clase II.

AchLA Clase I		AchLA Clase II			
Locus A		Locus DR		Locus DQ	
Especificidad	N (%)	Especificidad	N (%)	Especificidad	N (%)
A*2402	2 (3.3)	DRB*0305	1 (1.6)	DQA1*02	3 (4.9)
Locus B		DRB*0403	1 (1.6)	DQB1*0202	1 (1.6)
Especificidad	N (%)			DQB1*0301	4 (6.6)
B*7301	1 (1.6)	DRB1*0404	1 (1.6)	DQB1*0302	2 (3.3)
B*3508	1 (1.6)			DQB1*04	2 (3.3)
B*3501	1 (1.6)			DQB1*0401	1 (1.6)
Locus C				DQB1*05	1 (1.6)
Especificidad	N (%)				
Cw*07	1 (1.6)				
Cw*0401	1 (1.6)				

Factores sensibilizantes

Conocer los antecedentes de exposición a factores sensibilizantes es un apartado importante, puesto que es ampliamente conocida la asociación entre estos y la generación de anticuerpos

anti-HLA. Se analizó si en nuestra población existía alguna asociación entre los factores sensibilizantes y la presencia de anticuerpos anti-HLA. La **Tabla VIII.4** muestra que un número importante de pacientes cuenta con antecedente de sensibilización, de estos el más frecuente fue el de transfusión en 45 pacientes (73.8%) pero sin diferencia entre los grupos mostrados. Cabe señalar que el antecedente de embarazos y abortos fue incluso menor en los pacientes con anticuerpos, sobre todo en el subgrupo con anticuerpos NDE.

Tabla VIII.4.- Antecedente de exposición a factores sensibilizantes.

	TOTAL n=61(100%)	Sin Anticuerpos 24(39.3%)	Con Anticuerpos anti-HLA		p
			DE n=15 (24.6%)	NDE n=22(36.1%)	
Embarazos Previos	20(32.8)	10(41.6)	6(40.0)	4(18.2)	0.024
Abortos Previos	9(14.8)	5(20.8)	3(20.0)	1(4.5)	0.026
Transfusiones	45(73.8)	17(70.8)	11(73.3)	17(77.3)	0.883
Retrasplante	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	--

DE=Donador Específico. NDE=NO Donador Específico

Prevalencia de Rechazos.

Como muestra la **Tabla VIII.5**, sólo el 9.8% de los pacientes tiene antecedente de rechazo; el tratamiento que se utiliza regularmente en caso de que los pacientes presenten rechazo humoral son bolos de Metilprednisolona, Plasmaféresis e Inmunoglobulina Intravenosa. Cuando estamos en presencia se rechazo celular, se utiliza Timoglobulina. Cabe señalar que en

todos los casos, el evento de rechazo se presentó antes de que los pacientes ingresaran al estudio.

Tabla VIII.5.- Prevalencia de Rechazo.

	TOTAL n=61(100%)	Sin Anticuerpos 24(39.3%)	Con Anticuerpos anti-HLA		P
			DE n=15 (24.6%)	NDE n=22(36.1%)	
Pacientes con antecedente de rechazo	6(9.8)	0(0)	2(13.3)	4(18.2)	0.4

DE=Donador Específico; NDE=NO Donador Específico.

Tasa de Filtrado Glomerular

Como se muestra en la [Tabla VIII.6](#), respecto a la TFG y de acuerdo a la clasificación de las guías KDOQI, se observa un predominio del estadio II (Disminución leve de la TFG: 60-89mL/min/1.73m²) con el 44.3% de los pacientes, lo cual es lo esperado para los receptores de trasplante renal. En la [Figura VIII.2](#) se muestra que no existe diferencia significativa entre los grupos con anticuerpos anti-HLA, ya sean DE ó NDE, comparado con el grupo sin anticuerpos.

Tabla VIII.6.- Tasa de Filtrado Glomerular.

Estadio KDOQI (TFG en mL/min/1.73m ²)	TOTAL n=61 (100%)	Sin Anticuerpos 24(39.3%)	Con Anticuerpos anti-HLA		P
			DE n=15 (24.6%)	NDE n=22 (36.1%)	
Función renal normal KDOQI-I (≥ 90)	13(21.3)	5(20.8)	4(26.7)	4(18.2)	0.82
IRC Leve KDOQI-II (60 – 89)	27(44.3)	13(54.2)	7(46.6)	7(31.8)	0.31
IRC Moderada KDOQI-III (30 – 59)	21(34.4)	6(25.0)	4(26.7)	11(50.0)	0.16

IRC=Insuficiencia Renal Crónica. DE=Donador Específico. NDE=NO Donador Específico.

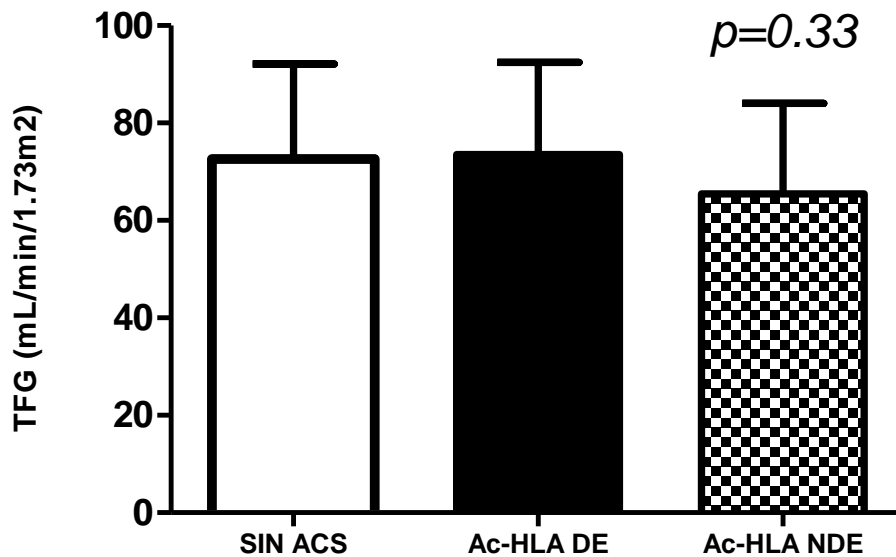


Figura VIII.2.- Tasa de filtrado glomerular (TFG) según presencia y tipo de anticuerpos anti-HLA (Ac-HLA). SIN ACS= sin anticuerpos; DE=donador específico; NDE=no donador específico.

Las barras muestran media ± desviación estándar.

Proteinuria y Albuminuria

Otro dato importante a analizar dentro del estudio fueron el grado de proteinuria y albuminuria. Como se muestra en la [Tabla VIII.7](#), dieciocho receptores de trasplante renal (29.5 %) tenían algún grado de albuminuria, de los cuales sólo 3 pacientes (4.9 %) presentaban proteinuria (albuminuria no nefrótica) en rangos clínicamente significativos ($\geq 300\text{mg}/24\text{hrs}$), al momento de su ingreso al estudio, mientras que el resto tenía microalbuminuria (15 casos, 24.6 %).

Cuando se clasificaron los pacientes con albuminuria según la presencia y tipo de anticuerpos anti-HLA, no hay correlación entre esta y la presencia de anticuerpos anti-HLA, así como tampoco hay correlación entre la albuminuria y los niveles de anticuerpos anti-HLA. La presencia de microalbuminuria tuvo ligero predominio en el grupo que presentó anticuerpos anti-HLA NDE, pero sin significancia estadística y lo cual tampoco muestra correlación alguna con el nivel de anticuerpos.

Tabla VIII.7.- Presencia de anticuerpos anti-HLA y proteinuria.

	TOTAL n=61 (100%)	Sin Anticuerpos n=24(39.3%)	Con Anticuerpos anti-HLA		P
			DE n=15 (24.6%)	NDE n=22 (36.1%)	
Microalbuminuria	15(24.6)	3(12.5)	4(26.7)	8(36.4)	0.17
Albuminuria (No nefrótica)	3(4.9)	1(4.2)	1(6.7)	1(4.5)	0.94
Total con Albuminuria	18 (29.5)	4 (16.7)	5 (33.4)	9 (40.9)	0.19

DE=Donador Específico. NDE=NO Donador Específico.

En la **Figura VIII.3** se muestra la asociación que existe entre el grado de albuminuria y la presencia o no de anticuerpos anti-HLA, tanto DE como NDE; además de la distribución de los pacientes en cada uno de los grupos. La asociación mostrada no es estadísticamente significativa.

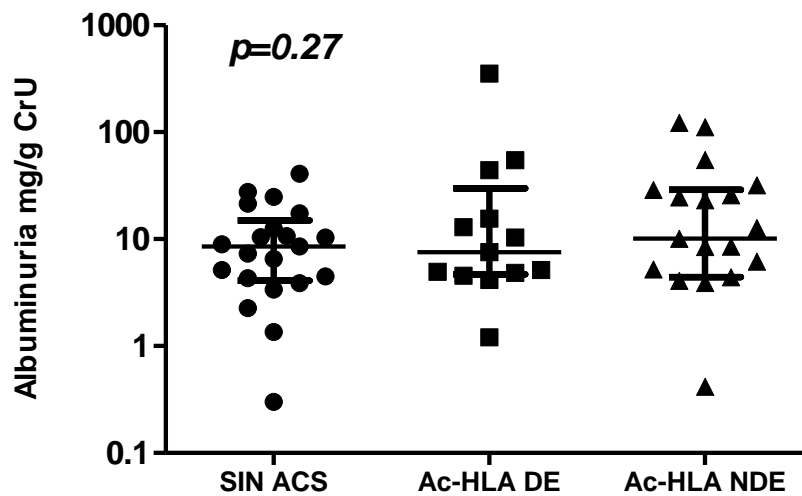


Figura VIII.3.-Nivel de proteinuria por grupo de pacientes: SIN ACS= Pacientes sin presencia de anticuerpos anti-HLA. **Ac-HLA DE=** Pacientes con anticuerpos anti-HLA donador específico. **Ac-HLA NDE=** Pacientes con anticuerpos anti-HLA NO donador específico. Las líneas dentro del área de gráficos muestra la mediana con rango intercuartíl.

En la **Figura VIII.4** se observa la correlación que existe entre el grado de luminiscencia y el grado de proteinuria de los pacientes. Como se puede observar esta correlación no es estadísticamente significativa. Sin embargo podemos observar que los niveles de luminiscencia en algunos casos son bastante elevados.

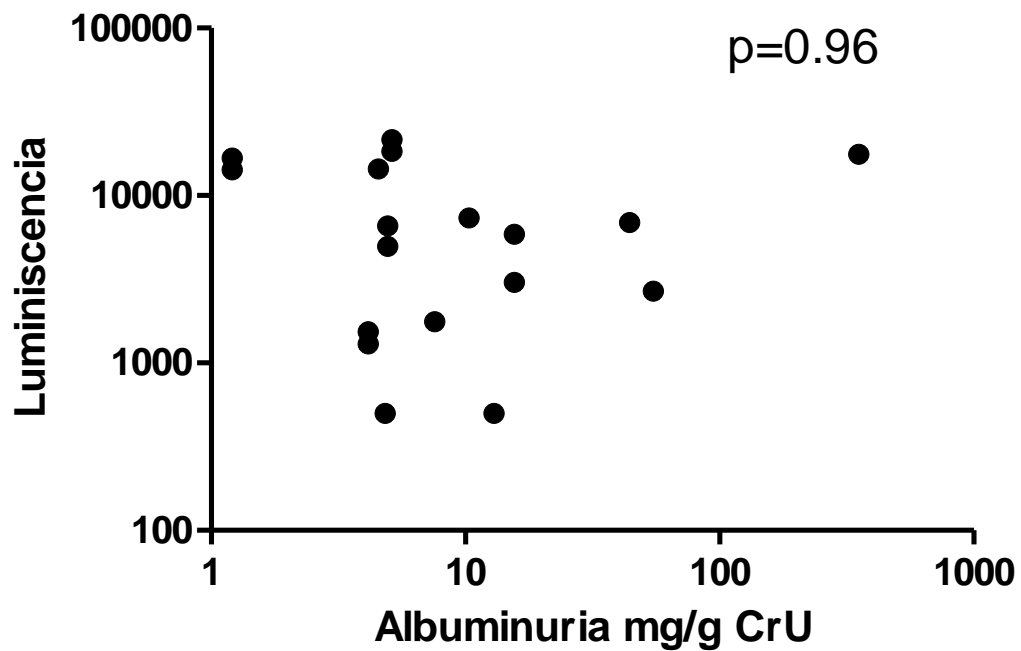


Figura VIII.4.-Correlación de niveles de luminiscencia del anticuerpo anti-HLA dominante y los niveles de albuminuria. Debido a que ambas variables tienen distribución anormal, se usó escala logarítmica.

IX. DISCUSIÓN

La asociación entre anticuerpos anti-HLA, rechazo humoral y falla crónica del injerto renal esta bien establecida en la literatura,^{89,90} sin embargo, la información acerca de la historia natural de la proteinuria y su asociación con anticuerpos anti-HLA, es aún escasa.

Una preocupación vigente de gran parte de las sociedades médicas, independientemente de la especialidad de que se trate, es el seguir buscando biomarcadores menos invasivos, de preferencia que puedan ser obtenidos de líquidos corporales como la orina sin necesidad de una punción, que puedan reducir los costos de diagnóstico y que por ende sean accesibles en cualquier centro.

Para el área de trasplante renal, el daño mediado por anticuerpos se ha convertido en el punto de mayores implicaciones clínicas y pronósticas, dado que un paciente sensibilizado puede retrasar muchos años el encontrar un donador compatible y si lo encuentra, la sobrevida de su injerto será mucho menor que la de un individuo no sensibilizado. Sin embargo, al ser de alto riesgo se podría monitorizar más estrechamente si hubiera un método accesible y económico para este fin.

Por otro lado, el paciente que no tiene anticuerpos preformados pretrasplante, tendrá altas posibilidades de desarrollar anticuerpos en cualquier momento de su seguimiento lo que ocasionará rechazo agudo, subagudo o crónico, con reducción de la sobrevida del injerto. A este respecto, los estudios de Terasaki⁹¹ han mostrado que entre 25 y 30% de los receptores de trasplante renal tendrán anticuerpos detectables si se les toma una muestra después de 6 meses postrasplante. En nuestro Instituto, utilizando el método más sensible (Single Antigen

para Luminex), hemos encontrado que hasta el 70% de los receptores de trasplante renal que eran negativos pretrasplante, desarrollarán anticuerpos durante el primer año postrasplante, lo cual es parecido al 60.7% que obtuvimos en estudio. La diferencia con los estudios de Terasaki se debe a que ellos siempre usan primero una prueba de escrutinio muy económica que de salir positiva obliga a realizar la prueba de “Single antigen”, lo cual reduce su capacidad para detectar muchos casos con cargas menores de anticuerpos y que precisamente son los que están formándolos *de novo*.

Uno de los problemas hasta ahora para los médicos responsables del seguimiento postrasplante de los pacientes, es que no todos los centros tienen las herramientas necesarias para hacer la determinación de anticuerpos y por otro lado, todos los métodos para su detección tienen un elevado costo. Hay que recordar que los anticuerpos se pueden formar en cualquier momento postrasplante por lo que, se ha sugerido incluso que, se deben realizar determinaciones cada semana, el primer mes postrasplante y después cada 1 a 3 meses durante toda la vida útil del injerto, lo cual es verdaderamente prohibitivo para hospitales como el nuestro.

Por si el costo fuera poca limitante, una vez que se detectan los anticuerpos, no se sabe cuanto le tomará a dichos anticuerpos ocasionar el daño endotelial y cual será su expresión clínica (deterioro agudo, subagudo o daño lento pero progresivo y crónico), de tal manera que no ha sido esclarecido si se deben de tratar en cuanto sean detectados o solo hasta que haya evidencia de deterioro de la función del injerto.

Dado este punto y ante el hecho de que los anticuerpos ocasionan principalmente daño endotelial, que en otras entidades se traduce como albuminuria, nos dimos a la tarea de buscar

la asociación entre la presencia de anticuerpos y el desarrollo de albuminuria. Hay que recordar que la medición de albúmina está disponible en prácticamente todos los centros que tienen programas de trasplante, es mucho más económica que la medición de anticuerpos y se mide en orina sin necesidad de punciones.

Para esto, teníamos un problema y es que gran parte de las enfermedades que llevan a IRCT se asocian con albuminuria en mayor o menor grado. Para resolver esto, decidimos reclutar solo pacientes con más de 6 meses postrasplante, tiempo en el que la proteinuria de los nativos ya se eliminó y por ende no podría contaminar nuestros resultados para fines de este estudio. Por otro lado, después de 6 meses siempre habrá probabilidades de que recidive la enfermedad original o que presenten una enfermedad glomerular *de novo* que ocasionaría proteinuria; para evitar estos confusores es que se reviso previamente el resultado de la biopsia del injerto que además de descartar esos confusores, nos ayudó a tomar decisiones para su manejo habitual, como lo hacen los grandes centros que protocolizan biopsias a la semana, al mes, cada 3 meses hasta completar un año y después cada año durante la vida útil del injerto, con la finalidad de orientar el manejo basado en evidencia histopatológica.

Una vez que salvamos estos obstáculos, estamos seguros que la albuminuria detectada es proteinuria *de novo* y que los anticuerpos fueron detectados con la tecnología más sensible disponible hasta el momento.

La frecuencia (60.7%) y distribución de anticuerpos (40.5% donador específico) es semejante a lo que hemos encontrado en estudios previos⁹² de nuestro Instituto, de tal manera que están siendo reproducibles y consistentes. Sin embargo, no hay una asociación clara entre su presencia y la existencia o el grado de albuminuria.

El uso de muestras de orina recolectadas en 24 hrs permitió que Hounnant et al⁹³ identificaran altos niveles de proteinuria en un subgrupo de pacientes con anticuerpos Donador Especifico comparado con NO Donador Específico, sin embargo, no se puede establecer una relación causa-efecto y no descartaron otras patologías como lo hicimos en nuestro estudio y que explicamos previamente.

En estudios recientes se ha demostrado que la proteinuria es un marcador precoz del daño producido en los capilares glomerulares por anticuerpos anti-HLA Clase II, antes de que las manifestaciones histológicas de la glomerulopatía del trasplante fueran visibles. La presencia de proteinuria, entre todos los pacientes con anticuerpos anti-HLA clase II, particularmente, identifica a un subgrupo de pacientes con alta incidencia de glomerulitis y alto riesgo de desarrollar glomerulopatía del Trasplante en el futuro (ambos son datos característicos del daño mediado por anticuerpos). Estudios realizados con microscopio electrónico demostraron que el daño en las células endoteliales del capilar glomerular precede a los cambios histológicos que consideramos diagnósticos de la glomerulopatía del trasplante.⁸⁰

Sin embargo, aun hay muchas preguntas sin resolver:

- ¿Porqué algunos pacientes hacen manifestaciones de rechazo agudo y otros más bien hacen daño crónico y con pocas manifestaciones?
- Aún cuando la albuminuria fuera un marcado razonable, ¿Qué se haría en los casos que tienen proteinuria pretrasplante? ¿En qué momento se debería usar la albuminuria como marcador de daño mediado por anticuerpos?
- ¿Qué hacer si en presencia de albuminuria se detectan Ac-HLA DE *de novo* y la biopsia del injerto no muestra daño por anticuerpos?

- ¿Cuál es el momento óptimo para tratar a estos pacientes?
- ¿Qué tratamiento dar y como seguirlos una vez tratados?

Queda claro que hay más preguntas que respuestas a este tema tan relevante hoy en día en el área de trasplantes y que son necesarios más estudios para resolverlas. Estudios prospectivos y de mayor número de pacientes podrán aclarar si la albuminuria, que es un marcador más fácil de cuantificar y sobre todo más económico pudiera, para fines de tamizaje, relevar la medición de anticuerpos anti-HLA, que es un estudio mucho más caro y de difícil acceso, sobre todo para la mayoría de las instituciones que se dedican al trasplante en nuestro país.

X. CONCLUSIONES

El desarrollo de anticuerpos anti-HLA postrasplante es un problema muy frecuente y con serias repercusiones en la sobrevida del injerto. Sin embargo, las estrategias para su detección no son accesibles a todos los pacientes y las estrategias para su manejo, así como el momento adecuado para realizar intervenciones no ha quedado aún establecido. Si bien en este estudio no hubo una clara asociación entre el desarrollo de anticuerpos anti-HLA y la presencia de proteinuria, no hay duda que son necesarios mejores biomarcadores para el adecuado monitoreo de los pacientes y que nos puedan apuntar hacia el mejor momento para realizar intervenciones para la remoción de dichos anticuerpos, con el fin de mejorar el pronóstico de los receptores de trasplante renal.

XI. ANEXOS

a) Cronograma.

Documentación bibliográfica: Febrero/2009 hasta el final del estudio.

Revisión y aprobación interna del protocolo: Junio-octubre/2009.

Revisión y aprobación externa del protocolo: Noviembre/2009-febrero/2010.

Revisión y aprobación por el comité de ética: Octubre/2009.

Recolección de datos: Desde la aprobación del comité de ética.

Análisis de resultados: Continuo durante el estudio y el final al momento de completar el número actual de pacientes.

Presentación del trabajo terminado: Julio/2011.

b) Aspectos éticos. El protocolo fue sometido y aprobado por el comité de ética Institucional y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada uno de los participantes.

El estudio siguió los lineamientos estipulados en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, concerniente a los principios éticos para la investigación médica en seres humanos, con el compromiso de mantener la exactitud de los datos y resultados del trabajo realizado, tal como lo establece el artículo 18 del documento mencionado.

Se siguieron los preceptos éticos en materia de investigación que señala la Norma Oficial Mexicana (NOM166-SSA1-1997).

El presente trabajo de investigación se realizó con apego al Reglamento de Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Se realizaron acciones que contribuyen al conocimiento de los procesos biológicos, causas de enfermedad, la práctica médica y estructura social (Título Primero, Capítulo Único, Artículo 3°). La investigación se fundamenta en estudios realizados en campo y en laboratorio, fue realizado por profesionales de la salud capacitados y, en este caso, con ciertos riesgos para los pacientes pero que eran sobrepasados por los beneficios. (Título Segundo: De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, Capítulo I, Artículos 13°-14°-17°).

c) *Financiamiento:* El proyecto fue financiado por CONACYT y además se contó con el apoyo de Terasaki Foundation Laboratory (11570 W. Olympic Blvd, Los Angeles, CA.); así como la Unidad de Trasplante Renal y el Laboratorio del Instituto que contaba con recursos necesarios para poder solventar las necesidades de los insumos generados para llevar a cabo el proyecto.

d) *Recursos humanos:* Se contó con recursos humanos altamente calificados en el área clínica con un equipo médico multidisciplinario en el área de trasplante renal así como con el recurso humano de los integrantes del laboratorio.

d) *Recursos materiales:* El laboratorio contaba con toda la infraestructura y reactivos necesarios para realizar el estudio y las mediciones necesarias.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. McClellan WM, Flanders WD. Risk factors for progressive chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 (Suppl 2): S65-70.
2. Gilbertson DT, Liu J, Xue JL, et al. Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3736-41.
3. Burra P, De Bona M, Germani G, et al. The concept of quality of life in organ transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39: 2285-7.
4. Burra P, De Bona M. Quality of life following organ transplantation. *Transpl Int* 2007; 20: 397-409.
5. Callahan MB. Dollars and sense of successful rehabilitation. *Prog Transplant* 2005; 15: 331-7.
6. Sim J. Improving return-to-work strategies in the United States disability programs, with analysis of program practices in Germany and Sweden. *Soc Secur Bull* 1999; 62: 41-50.
7. National Kidney Foundation, K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (Suppl 1): S1-266.
8. Levey AS. Measurement of renal function in chronic renal disease. *Kidney Int* 1990; 38: 167-84.
9. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461-70.
10. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function-measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med* 2006; 354: 2473-83.
11. Poggio ED, Wang X, Greene T, Van Lente F, Hall PM. Performance of the modification of

diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations in the estimation of GFR in health and in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 459-66.

12. Froissart M, Rossert J, Jacquot C, Paillard M, Houillier P. Predictive performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations for estimating renal function. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 763-73.

13. Glasscock RJ. Estimated glomerular filtration rate: time for a performance review? *Kidney Int* 2009; 75: 1001-3.

14. Castro AF, Coresh J. CKD surveillance using laboratory data from the population-based National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am J Kidney Dis* 2009; 53 (Suppl 3): S46-55.

15. Womer KL, Kaplan B. Recent developments in kidney transplantation--a critical assessment. *Am J Transplant* 2009; 9: 1265-71.

16. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7: 518-26.

17. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002; 346: 580-90.

18. Hostetter TH. Chronic transplant rejection. *Kidney Int* 1994; 46: 266-79.

19. Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 167-81.

20. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-33.

21. Matas AJ, Humar A, Gillingham KJ, et al. Five preventable causes of kidney graft loss in

the 1990s: a single-center analysis. *Kidney Int* 2002; 62: 704-14.

22. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351: 2715-29.

23. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 4: 378-83.

24. Jevnikar AM, Mannon RB. Late kidney allograft loss: what we know about it, and what we can do about it. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3 (Suppl 2): S56-67.

25. Serón D, Arns W, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy--clinical guidance for early detection and early intervention strategies. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 2467-73.

26. Matas AJ, Burke JF Jr, DeVault GA Jr, Monaco A, Pirsch JD. Chronic rejection. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4 (Suppl): S23-9.

27. Li C, Yang CW. The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5: 513-9.

28. Cornell ID, Colvin RB. Chronic allograft nephropathy. *Curr opin nephrol hypertens* 2005; 14: 229-234.

29. Opelz G. Collaborative Transplant Study. Investigation of the relationship between maintenance dose of cyclosporine and nephrotoxicity or hypertension. *Transplant Proc* 2001; 33: 3351-4.

30. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int* 1998; 53: 217-22.

31. Mikhalski D, Wissing KM, Ghisdal L, et al. Cold ischemia is a major determinant of acute rejection and renal graft survival in the modern era of immunosuppression. *Transplantation*

2008; 85 (Suppl): S3-9.

32. Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc* 2008; 40: 3279-88.

33. Opelz G. Factors influencing kidney graft survival in Latin America. Collaborative Transplant Study. *Transplant Proc* 1999; 31: 2951-4.

34. Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM, Takemoto S. Fit and match hypothesis for kidney transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 441-5.

35. Tian YF, Liao CH, Chen MJ. Risk factors among donor characteristics which affect graft outcome in paired kidney transplantation. *Transplant Proc* 2008; 40: 2281-4.

36. Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 2008; 88: 451-87.

37. Comper WD, Hilliard LM, Nikolic-Paterson DJ, Russo LM. Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F1589-600.

38. Knoll GA. Proteinuria in kidney transplant recipients: prevalence, prognosis, and evidence-based management. *Am J Kidney Dis* 2009; 54: 1131-44.

39. Schrier Robert W. (editor), Diseases of the Kidney & Urinary Tract, 8th ed, Vol I, Chp 11, 2007, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.

40. Norden AG, Sharratt P, Cutillas PR, Cramer R, Gardner SC, Unwin RJ. Quantitative amino acid and proteomic analysis: very low excretion of polypeptides >750 Da in normal urine. *Kidney Int* 2004; 66: 1994-2003.

41. Haraldsson B, Sörensson J. Why do we not all have proteinuria? An update of our current understanding of the glomerular barrier. *News Physiol Sci* 2004; 19: 7-10.

42. Satchell SC, Tooke JE. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for

the glomerular endothelium? *Diabetologia* 2008; 51: 714-25.

43. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83: 253-307.

44. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 2006; 354: 1387-401.

45. Akhtar M, Al Mana H. Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol* 2004; 11: 304-9.

46. Jarad G, Miner JH. Albuminuria, wherefore art thou? *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 455-7.

47. Barama AA. Mechanisms and management of proteinuria in kidney transplant patients. *Drugs* 2008; 68 (Suppl 1): 33-9.

48. Halimi JM, Laouad I, Buchler M, et al. Early low-grade proteinuria: causes, short term evolution and long-term consequences in renal transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 2281-2288.

49. Myslak M, Amer H, Morales P, et al. Interpreting post-transplant proteinuria in patients with proteinuria pre-transplant. *Am J Transplant* 2006; 6: 1660-5.

50. Sancho Calabuig A, Pallardó Mateu LM, Avila Bernabeu AI, Gavela Martínez E, Beltrán Catalán S, Crespo Albiach JF. Very low-grade proteinuria at 3 months posttransplantation is an earlier marker of graft survival. *Transplant Proc* 2009; 41: 2122-5.

51. Amer H, Fidler ME, Myslak M, et al. Proteinuria after kidney transplantation, relationship to allograft histology and survival. *Am J Transplant* 2007; 7: 2748-56.

52. Halimi JM, Buchler M, Al-Najjar A, et al. Urinary albumin excretion and the risk of graft loss and death in proteinuric and non-proteinuric renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 618-625.

53. Halimi JM, Buchler M, Al-Najjar A, et al. Respective predictive role of urinary albumin

excretion and nonalbumin proteinuria on graft loss and death in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 2775-2781.

54. Fernández-Fresnedo G, Pastor JM, López-Hoyos M, et al. Relationship of donor-specific class-I anti-HLA antibodies detected by ELISA after kidney transplantation on the development of acute rejection and graft survival. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 990-5.

55. Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H2247-

56.

56. Truong LD, Barrios R, Adroque HE, Gaber LW. Acute antibody-mediated rejection of renal transplant: pathogenetic and diagnostic considerations. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1200-8.

57. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB. Persistent rejection of peritubular capillaries and tubules is associated with progressive interstitial fibrosis. *Kidney Int* 2002; 61: 1867-79.

58. Ishii Y, Sawada T, Kubota K, et al. Injury and progressive loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy. *Kidney int* 2005; 67: 321-32.

59. Einecke G, Sis B, Reeve J, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009; 9: 2520-31.

60. Shimizu T, Ishida H, Shirakawa H, et al. Clinicopathological analysis of transplant glomerulopathy cases. *Clin Transplant* 2009; 23(Suppl 20): 39-43.

61. Murray Joseph E, The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1990, Nobel Lecture, December 8, 1990.

62. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343: 702-9.

63. Warrens AN, Lombardi G, Lechler RI. Presentation and recognition of major and minor

histocompatibility antigens. *Transpl Immunol* 1994; 2: 103-7.

64. Danovitch GM. (Editor). Handbook of Kidney Transplantation, Fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. op. cit. 2004.

65. Lechler RI, Batchelor JR. Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *J Exp Med* 1982; 156: 1835-41.

66. Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* 1982; 155: 31-41.

67. Van Besouw NM, Zuijderwijk JM, Vaessen LM, et al. The direct and indirect allogeneic presentation pathway during acute rejection after human cardiac transplantation. *Clin Exp Immunol* 2005; 141: 534-40.

68. Toresan R, Manfro RC, Proença MC, et al. Association between the presence of anti-HLA antibodies with acute rejection and chronic allograft nephropathy in the first year after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2008; 40: 718-9.

69. Rowshani AT, Bemelman FJ, Lardy NM, Ten Berge IJ. Humoral immunity in renal transplantation: clinical significance and therapeutic approach. *Clin Transplant* 2008; 22: 689-99.

70. Mao Q, Terasaki PI, Cai J, et al. Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am J Transplant* 2007; 7: 864-71.

71. Gerbase-DeLima M, Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, Franco M, Medina-Pestana JO. Anti-HLA class II antibodies and chronic allograft nephropathy. *Clin Transpl* 2006: 201-5.

72. Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, Franco M, Medina-Pestana JO, Gerbase-DeLima M. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transplant* 2006; 6: 2316-20.
73. Morales-Buenrostro LE, Buzo-Romero JM, de Leo C, et al. Prevalence of HLA antibodies and its impact on graft function in a group of kidney transplant recipients: a cross-sectional study. *Transplant Proc* 2006; 38: 899-902.
74. Panigrahi A, Siddiqui JA, Rai A, et al. Allosensitization to HLA and MICA is an important measure of renal graft outcome. *Clin Transpl* 2007: 211-7.
75. Panigrahi A, Gupta N, Siddiqui JA, et al. Post transplant development of MICA and anti-HLA antibodies is associated with acute rejection episodes and renal allograft loss. *Hum Immunol* 2007; 68: 362-7.
76. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 2003; 75: 1034-40.
77. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2804-12.
78. Morales-Buenrostro LE, Rodríguez-Romo R, de Leo-Cervantes C, et al. Evidence on the role of HLA and MICA antibodies in renal graft loss. *Gac Med Mex* 2008; 144: 315-22.
79. Lee PC, Zhu L, Terasaki PI, Everly MJ. HLA-specific antibodies developed in the first year posttransplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss. *Transplantation* 2009; 88: 568-74.
80. Wavamunno MD, O'Connell PJ, Vitalone M, et al. Transplant glomerulopathy:

ultrastructural abnormalities occur early in longitudinal analysis of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2007; 7: 2757-68.

81. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753-60.

82. Ivanyi B. A primer on recurrent and de novo glomerulonephritis in renal allografts. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008; 4: 446-57.

83. Yakupoglu U, Baranowska-Daca E, Rosen D, Barrios R, Suki WN, Truong LD. Posttransplant nephrotic syndrome: A comprehensive clinicopathologic study. *Kidney Int* 2004; 65: 2360-70.

84. Vathsala A, Verani R, Schoenberg L, et al. Proteinuria in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation* 1990; 49: 35-41.

85. Aline-Fardin A, Rifle G, Martin L, et al. Recurrent and de novo membranous glomerulopathy after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41: 669-71.

86. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993; 44: 411-22.

87. Cosio FG, Gloor JM, Sethi S, Stegall MD. Transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2008; 8: 492-6.

88. Tait BD, Hudson F, Cantwell L, et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14: 247-54.

89. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: A prospective trial. *Am J Transplant* 2004; 4: 438.
90. Pelletier RP, Hennessy PK, Adams PW, et al. Clinical significance of MHC reactive alloantibodies that develop after kidney or kidney-pancreas transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2: 134.
91. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year Follow-up of a Prospective Trial of HLA and MICA Antibodies on Kidney Graft Survival *Am J Transplant* 2007; 7: 408–415.
92. Morales-Buenrostro LE, Buzo-Romero JM, de Leo C, López M, Ortiz-Arroyo VM, Pérez-Garrido J et al. Prevalence of HLA antibodies and its impact on graft function in a group of kidney transplant recipients: a cross sectional study. *Transplantation Proceedings* 2006; 38: 899-902.
93. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2804.