



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Correlación de Prueba Cruzada Linfocitaria por Anticuerpos  
Monoclonales Anti-IgG y Microlinfocitotoxicidad (leída al  
Microscopio y Citómetro de Flujo) contra la Prueba del Panel  
Reactivo de Anticuerpos (P.R.A).**

**TESIS**

Que presenta:

**Sandra Saavedra Noguez**

Para obtener el título de:

**Química Farmacéutica Bióloga**

Director de tesis  
**Q.F.B Guillermo García Castillo**

Asesor de tesis  
**M. en E. Yolanda Flores Cabrera**

México, D.F., Marzo 2012





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero a Dios por darme tantas bendiciones en la vida, iluminarme y guiarme por un buen camino.

A quienes me dieron la vida, mis padres Víctor y Fátima le agradezco por todo el amor, cariño, apoyo, esfuerzo y fortaleza que me han dado durante todo este tiempo, gracias por ayudarme a cumplir este sueño hasta el final y sobre todo gracias por ser esas maravillosas personas que son en mi vida. Los amo y este trabajo es de ustedes.

A Víctor, Bruno, Betza, Brenda y Fátima les agradezco sus palabras de ánimo y la emoción que han compartido conmigo durante este tiempo los quiero mucho, gracias por ser mi familia y formar parte de mi vida.

Al Químico Guillermo García por darme la oportunidad de trabajar a su lado, compartirme sus conocimientos y por toda la paciencia que me tuvo durante este tiempo.

A la Maestra Yolanda Flores por ser una gran persona, una excelente profesora, por su amistad, enseñanzas y apoyo con este proyecto.

Al Doctor Luis Mora por compartirme sus conocimientos y ayudarme incondicionalmente en la recta final de este proyecto.

A Cinthya, Octavio, Perla, Sandrita, Ricardo Zaida y a todos mis compañeros de noveno semestre por haber formado parte de mi vida durante esta etapa. Algunos compañeros y otros amigos pero siempre los voy a llevar en mi corazón.

A Miriam, Elena, Joaquín e Isra por ser buenos compañeros y amigos en el laboratorio de histocompatibilidad y por tener la bendición de haberlos conocido.

Gracias a todas aquellas personas que colaboraron de una u otra forma conmigo para la elaboración de este proyecto.

**Con cariño, amor y respeto. Sandra**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>5</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
<b>HISTORIA DE LOS TRASPLANTES .....</b>	<b>6</b>
<b>TRASPLANTE .....</b>	<b>8</b>
<b>OBSTÁCULOS FRENTE A LOS TRASPLANTES.....</b>	<b>8</b>
<b>TRASPLANTES SEGÚN EL SITIO DE IMPLANTACIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>INMUNOLOGÍA DE LOS TRASPLANTES.....</b>	<b>9</b>
<b>ANTÍGENOS DE TRASPLANTE O DE HISTOCOMPATIBILIDAD .....</b>	<b>9</b>
<b>GENES Y ANTÍGENOS DE CLASE I Y CLASE II.....</b>	<b>11</b>
CLASE I .....	11
CLASE II .....	11
<b>TIPIFICACION ANTÍGENOS DE TRASPLANTE O DE HISTOCOMPATIBILIDAD .....</b>	<b>12</b>
<b>RECHAZO DEL TRASPLANTE .....</b>	<b>13</b>
<b>LEYES DEL TRASPLANTE .....</b>	<b>14</b>
<b>APARATO URINARIO .....</b>	<b>15</b>
<b>FISIOLOGÍA DE LOS RIÑONES.....</b>	<b>16</b>
<b>NEFRONA.....</b>	<b>18</b>
<b>FUNCIONES DEL RIÑÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>PATOLOGÍAS DEL RIÑÓN.....</b>	<b>19</b>
PATOLOGÍAS COMUNES .....	20
PRINCIPALES SÍNDROMES RENALES.....	20
<b>OPCIONES DE TRATAMIENTO PARA FALLO RENAL .....</b>	<b>20</b>
<b>TRASPLANTE RENAL .....</b>	<b>21</b>
<b>CAUSAS PARA REALIZAR EL TRASPLANTE .....</b>	<b>21</b>

---

<b>ESTUDIO PRETRASPLANTE .....</b>	<b>21</b>
<b>SELECCIÓN DEL RECEPTOR Y DEL DONADOR .....</b>	<b>22</b>
TRASPLANTE RENAL DE DONADOR VIVO .....	22
TRASPLANTE RENAL DE DONADOR FALLECIDO .....	23
<b>COMPLICACIONES .....</b>	<b>24</b>
<b>PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD .....</b>	<b>25</b>
ANTÍGENOS DEL SISTEMA ABO DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS .....	25
PRUEBAS CRUZADAS LINFOCITARIAS MÉTODO DE LINFOCITOTOXICIDAD .....	26
PRUEBAS CRUZADAS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	27
DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI HLA (PRA).....	27
<b>CITOMETRÍA DE FLUJO .....</b>	<b>28</b>
FUNDAMENTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO .....	28
CONCEPTOS ESENCIALES DE FLUORESCENCIA .....	29
UTILIDAD .....	29
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>31</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>31</b>
<b>DISEÑO METODOLÓGICO.....</b>	<b>31</b>
ESTUDIO.....	31
POBLACIÓN .....	31
<b>CRITERIOS DE SELECCIÓN .....</b>	<b>32</b>
<b>INCLUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
EXCLUSIÓN .....	32
ELIMINACIÓN .....	32
<b>MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.....</b>	<b>32</b>
EQUIPO .....	32
MATERIAL .....	32
REACTIVOS .....	33
<b>MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
TOMA DE MUESTRA .....	34
DESFIBRINACIÓN .....	34

---

PRUEBA CRUZADA (SEPARACIÓN DE CÉLULAS).....	34
MICROLINFOCITOTOXICIDAD (PARA LEER EN EL MICROSCOPIO) .....	35
CITOTOXICIDAD (PARA LEER EN EL CITÓMETRO DE FLUJO) .....	36
IGG.....	36
PRA.....	37
MANEJO CITÓMETRO DE FLUJO .....	37
<b>DIAGRAMA DE FLUJO .....</b>	<b>38</b>
<b>DISEÑO ESTADÍSTICO .....</b>	<b>38</b>
<b>RESULTADOS Y SU DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>50</b>

## RESUMEN

En la actualidad el trasplante renal es una de las terapias de elección para aquellas personas en las que se ve afectada la función de ambos riñones, este tipo de terapias requieren de exhaustivos estudios para evaluar la capacidad tanto del donante como del receptor; una de las identificaciones más importantes que debe realizarse es la determinación de compatibilidad entre esta pareja ya que si no existe, es muy posible que el trasplante resulte en una pérdida temprana del injerto debido a la presencia de Antígenos Leucocitarios Humanos presentes en casi todas las células nucleadas del organismo. En la presente Tesis Experimental se realizó una correlación entre tres diferentes pruebas cruzadas linfocitarias y el Panel Reactivo de Anticuerpos para ver cuál de estas es más sensible y parecida al estándar de oro, esto fue posible gracias a la utilización de muestras extraídas de pacientes atendidos en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre en el área de histocompatibilidad. Cabe mencionar que estas pruebas son de suma importancia para detectar anticuerpos Anti-HLA los causantes de producir el rechazo de órganos. Con los resultados obtenidos fue posible demostrar cuál de estas técnicas tiene mayor relación con el estándar de oro a demás de beneficiar al laboratorio de histocompatibilidad de dicho hospital al disminuir el número de técnicas empleadas para este tipo de detecciones.

## INTRODUCCION

El trasplante renal es una de las terapias clínicas de elección para aquellas personas que padecen de Insuficiencia Renal Crónica Terminal; no obstante en los primeros intentos de tomar esta opción como terapia, el fracaso era inevitable ya que no se consideraba la cuestión inmunológica, siendo el principal problema la pérdida temprana del órgano por el rechazo del injerto. En la actualidad se requiere de un laboratorio que se encargue de la identificación de anticuerpos preformados anti-HLA causantes de inducir el rechazo del órgano. Algunos de los métodos para la identificación de dichos anticuerpos son la prueba cruzada linfocitaria (PCL) donde se determina la compatibilidad que exhibe la pareja donador-receptor y el panel reactivo de anticuerpos (PRA) el cual determina la sensibilización del receptor, estas técnicas son utilizadas en el Laboratorio de Histocompatibilidad del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, en aquellos pacientes que están en lista de espera de trasplante renal; sin embargo el elevado costo y el tiempo empleado al realizar toda la serie de pruebas, representan un problema cuando estas determinaciones tienen que obtenerse en un corto periodo de tiempo, es por ello que se ha considerado hacer una correlación entre los métodos de PCL realizada por Microlinfocitotoxicidad (leída al microscopio y citómetro de flujo) y Anticuerpos Monoclonales anti-IgG contra la prueba PRA, para saber cuál de estas PCL es más sensible o parecida al estándar de oro, para esta investigación se han utilizando pacientes atendidos en los servicios de Histocompatibilidad de dicho Hospital y los resultados serán de gran utilidad para el laboratorio ya que permitirán la fácil identificación de personas altamente sensibilizadas, menos rechazos de órganos, así como la reducción de costos al solo utilizar las técnicas más efectivas.

## MARCO TEÓRICO

### HISTORIA DE LOS TRASPLANTES

La historia científica de los trasplantes empieza en el siglo XIX con muy diversos experimentos sobre implantes de tejidos y quizá, el punto de inflexión se puede situar a principios del siglo XX cuando los cirujanos franceses Jaboulay y Carrol desarrollan una técnica de sutura quirúrgica vascular que pondrá los cimientos para que los trasplantes de órganos sean hoy en día una realidad. Se inician inmediatamente después los primeros experimentos de autotrasplante y heterotrasplante renal en animales y posteriormente de animales a humanos hasta llegar al que se considera el primer homotrasplante renal, que realizó el cirujano ruso Voronoy en 1933 cuando trasplanta el riñón de un hombre fallecido por una encefalitis a una mujer de 26 años en coma urémico, pero este trasplante nunca funcionó. Inmediatamente después de la segunda guerra mundial se comunica la realización, en Boston, de un homotrasplante a una paciente en fracaso renal agudo, que es extraído tras haber funcionado 48 horas. Posteriormente la paciente recuperó su propia función renal.<sup>1</sup>

En la primera parte de la década de los 50's se realizan numerosos intentos de trasplante procedente de donante muerto y donante vivo, tanto en Francia como en los Estados Unidos, con mayor o menor grado de función inicial, pero en ningún caso con función a medio y largo plazo. El verdadero éxito llegó en 1954 en Boston donde el equipo integrado por Moore, Merrill, Murray y Harrison consigue en la noche de Navidad realizar el primer trasplante que funcionó a largo plazo entre los hermanos Herrick gemelos idénticos. Este trasplante que permitió a Richard sobrevivir a una glomerulonefritis terminal por nueve años, fue el principio de una de las grandes aventuras del siglo XX, el trasplante de órganos entre miembros de la misma especie. Sólo cinco años después este mismo grupo ya con la experiencia de haber trasplantado a siete pares de gemelos idénticos, realizó un trasplante entre hermanos gemelos no idénticos empleando la radiación corporal total en el receptor. Con este órgano el receptor sobrevivió por 20 años; rompiendo por primera vez con éxito la barrera inmunológica.<sup>2</sup>

En un principio los homotrasplantes fueron realizados de donantes fallecidos por muy diversas causas, incluso en 1950 llegaron a utilizarse en Francia los órganos de presos ejecutados. Posteriormente y tras el éxito de los primeros isotrasplantes y homotrasplantes de donante vivo, esta práctica fue totalmente abandonada dada su nula tasa de viabilidad.<sup>1</sup>

Entre 1963 y 1965 se realizan algunos trasplantes con órganos extraídos de donantes en quienes había cesado la actividad cerebral o encefálica. En 1965 un neurocirujano sueco, Frykholm, remite un proyecto al gobierno en el que define el concepto de “muerte cerebral”, Suecia, sin embargo, no aprobó una regulación legal de la muerte cerebral hasta 20 años después. En 1968, la Escuela de Medicina de Harvard propone los primeros criterios para determinar la muerte cerebral, se abre entonces un periodo en el que la mayoría de los trasplantes se harán con órganos obtenidos de donantes de este tipo, y en el que la mayoría de los países irán adoptando diferentes formas de regulación legal de esta práctica médica.<sup>1</sup>

Es a partir de 1970 cuando se produce el verdadero despegue de estas terapéuticas, se inician programas de trasplante no renal, se consolida el trasplante renal y se producen los grandes avances en el tratamiento inmunosupresor, las técnicas de preservación y el desarrollo de técnicas quirúrgicas, coincidiendo en el tiempo con grandes avances en la lucha contra las enfermedades infecciosas o la hipertensión arterial, que también han contribuido al desarrollo e incremento de la supervivencia de los trasplantes de órganos.<sup>2</sup>

## TRASPLANTE

Un trasplante o injerto se puede definir como la implantación de un tejido o de un órgano de un individuo en otro o en el mismo: otras formas de trasplante son las transfusiones sanguíneas y, en cierta forma, el embarazo.<sup>3,4</sup>

### OBSTÁCULOS FRENTE A LOS TRASPLANTES

Los obstáculos frente a los trasplantes se deben fundamentalmente a la disparidad genética entre el donante y el receptor: los injertos se pueden dividir en autoinjertos, isoinjertos y aloinjertos o xenoinjertos. Los autoinjertos desde una parte del cuerpo a otra no suponen la implantación de tejidos ajenos por lo que no dan lugar a rechazos. De la misma manera, los isoinjertos entre individuos isogénicos (genéticamente idénticos), como los gemelos monocigóticos (idénticos), no expresan antígenos que resulten extraños para el receptor, por lo que tampoco dan lugar a reacciones de rechazo. Los trasplantes más frecuentes en la práctica clínica son los aloinjertos, en los que un individuo dona un órgano a otro individuo genéticamente diferente. En este caso el injerto es aloinjerto (es decir, entre miembros de la misma especie que presentan diferentes variantes alélicas de algunos genes). Las células de los aloinjertos expresan aloantígenos que son reconocidos como ajenos por el receptor.<sup>3, 5</sup>

Los xenoinjertos que se llevan a cabo suelen ser rechazados rápidamente, ya sea por anticuerpos IgM naturales del receptor o por una reacción inmediata por células.<sup>3, 4, 5</sup>

## **TRASPLANTES SEGÚN EL SITIO DE IMPLANTACIÓN**

En cuanto al sitio de implantación, los trasplantes que se colocan en su sitio natural se denominan ortotópicos (por ejemplo, los trasplantes, de piel o de corazón). Cuando los trasplantes se implantan en sitios diferentes a los de su posición original, se denominan heterotópicos; por ejemplo, es común que los trasplantes de riñón se hagan, no en la cavidad ventrolumbar, sino en la cavidad iliaca, aprovechando los grandes vasos sanguíneos de esa región.<sup>3, 4, 5</sup>

## **INMUNOLOGÍA DE LOS TRASPLANTES**

La inmunología de los trasplantes es importante por muchas razones, ya que sirve tanto para comprender mejor los procesos inmunitarios como para el desarrollo de técnicas clínicas de ejecución de trasplantes.<sup>6</sup>

En la práctica clínica los órganos son trasplantados con objeto de corregir un déficit funcional a no ser que el donante y el receptor sean genéticamente idénticos, los antígenos HLA inducirán una respuesta inmunitaria de rechazo, tanto en la presentación de antígenos, como en el reconocimiento de lo propio y lo extraño. Es este reconocimiento el que puede llevar a determinar el éxito o fracaso de un trasplante es por ello que los trasplantes ponen en funcionamiento toda la gama de mecanismos inmunitarios celulares y humorales, tanto específicos como inespecíficos, por tanto, la inmunología de los trasplantes abarca prácticamente todos los aspectos del sistema inmunitario.<sup>6, 22</sup>

## **ANTÍGENOS DE TRASPLANTE O DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

Los leucocitos y todas las células nucleadas expresan sobre su superficie gran cantidad de moléculas, unas características de la especie, otras características del individuo. Las diferencias antigénicas entre individuos de la misma especie se restringen a las diferencias en los antígenos celulares propios de cada individuo (aloantígenos).

La totalidad de diferencias antigénicas celulares puede influir en el rechazo de un alotrasplante (al estimular la respuesta inmunitaria del receptor), es sólo un grupo limitado de antígenos celulares el principal responsable de esta respuesta de rechazo, estos antígenos se conocen con el nombre de antígenos de histocompatibilidad. En todas las especies la síntesis y expresión de los antígenos de histocompatibilidad se encuentran bajo el control de un grupo de genes localizados en una región cromosómica, particular para cada especie, denominada complejo mayor de histocompatibilidad o complejo principal de histocompatibilidad. Usualmente nos referimos a este grupo de genes como MHC (*major histocompatibility complex*). En el humano, el MHC se encuentra localizado en el par cromosómico 6, este también recibe un nombre según la especie animal de que se trate; en el humano este sistema se llama HLA (*Human leucocyte antigens*). El MHC está constituido por varios genes, cada uno expresado en doble dosis: uno por cada cromosoma del par correspondiente (es decir, se trata de genes alélicos). Cada gene se encuentra en un locus polimórfico, esto es, el locus puede estar ocupado por uno o varios genes posibles, cada uno responsable de la síntesis de un antígeno diferente, correspondiente al mismo locus.<sup>3, 5, 6</sup>

En el MHC se descubrió que dentro de esta región se encontraban también otros genes sin relación funcional con los antígenos del trasplante, así existen cuando menos cuatro familias de antígenos codificados por genes situados en la región MHC: los antígenos de clase I, clase II clase III y los de clase IV. Dos de estas familias de antígenos MHC (antígenos de clase I y antígenos de clase II) corresponden a los antígenos principales o “mayores” de histocompatibilidad.<sup>3,5</sup>

Fuera de MHC hay también otros antígenos que pueden funcionar como antígenos de trasplante, estos antígenos, sin embargo, son poco inmunogénicos y se encuentran repartidos en varios cromosomas, por su baja potencia se describen como antígenos menores de histocompatibilidad. Las moléculas de clase I y clase II participan en episodios de comunicación entre células, incluyendo la presentación de antígenos y también funcionan como potentes antígenos de trasplante.<sup>3, 5</sup>

## GENES Y ANTÍGENOS DE CLASE I Y CLASE II

### Clase I

Los antígenos HLA de clase I están constituidos por una proteína de 44-47 kD (cadena  $\alpha$ ) y un polipéptido de 12 a 16 aminoácidos (cadena  $\beta$  o  $\beta_2$ -microglobulina, la cadena alfa es codificada por genes HLA de clase I localizados en el cromosoma 6, en tanto que la cadena beta es codificada por genes localizados en el cromosoma 15, la cadena Alfa tiene 3 dominios, los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  que se unen a los péptidos inmunogénicos en las APC (células presentadoras de antígenos), el dominio  $\alpha_3$  estructuralmente relacionado con los dominios de las inmunoglobulinas, la región transmembranal, y la región intracitoplasmática.<sup>3, 5, 7, 8, 23</sup>

Se han descrito varios genes de clase I en la región HLA donde se incluyen los genes HLA clásicos (HLA-A, B y C) y los no clásicos (HLA-E, F y G) cuyas funciones son esencialmente similares a los primeros.<sup>3, 5, 7, 8, 23</sup>

### Clase II

Los genes de clase II codifican para las cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$ . Se incluyen aquí los genes DPA, DPB, DQA, DQB, DRA, DRB y los menos conocidos DMA, DMB, DOA, Y DOB. La designación de su locus en el cromosoma 6 consiste de tres letras; las primeras (d) indicación de la clase (clase II), la segunda (M, O, P, Q, o R) la familia y la tercera (A o B) la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  respectivamente. La asociación de una cadena alfa con una beta da origen a un antígeno HLA de clase II.<sup>3, 5, 7, 8, 23</sup>

Cada una de las cadenas polipeptídicas alfa y beta de clase II tiene 4 dominios; el dominio que interacciona con los péptidos inmunogénicos ( $\alpha_1$  o  $\beta_1$ ), el dominio relacionado con las inmunoglobulinas ( $\alpha_2$  o  $\beta_2$ ), el dominio transmembranal y la región citoplasmática que conecta a las moléculas con otras moléculas intracelulares.<sup>3, 5, 7, 8, 23</sup>

## TIPIFICACION ANTÍGENOS DE TRASPLANTE O DE HISTOCOMPATIBILIDAD

La tipificación HLA es un análisis complejo que permite identificar y comparar receptores y donadores en el sistema HLA, también nos permite establecer qué posibilidades tiene una persona de socorrer a otra, con base en la donación de un órgano. Los requerimientos de una compatibilidad prácticamente total entre donante y receptor en el caso de trasplante, han provocado que la resolución con la cual se tipifica el HLA vaya siendo cada vez mayor.<sup>20, 21</sup>

Las técnicas de tipificación han evolucionado desde la baja resolución hasta la alta resolución y de la serología a técnicas basadas en caracterización en el nivel ADN.<sup>20, 21</sup>

Los métodos basados en serología corresponden generalmente a metodologías de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento, estas técnicas son métodos para encontrar una identidad en el nivel de HLA en un grupo familiar. Sin embargo la serología no distingue diferencias potencialmente funcionales que son las encargadas de provocar el rechazo de órganos, debemos recordar que el MCH es un conjunto de moléculas transmitidas de padres a hijos en una combinación que es peculiar para cada hijo. Los genes de sistema HLA se transmiten siempre en bloque. Cada bloque se denomina haplotipo. El padre aporta un haplotipo y la madre otro, dando origen al genotipo HLA o perfil genético del nuevo ser.<sup>20, 21</sup>

Debido a que en una familia hay dos haplotipos paternos y dos haplotipos maternos para la región de HLA, la progenie sólo puede heredar cuatro posibles combinaciones de haplotipos.<sup>19, 20, 21</sup>

Dependiendo del azar. Existen 50% de posibilidades que dos hermanos compartan un solo haplotipo, 25% de posibilidades de que no compartan ninguno y 25% de que coincidan en ambos haplotipos, cualquiera de las combinaciones posibles indica que ese ser proviene de los mismos padres; Pero sólo ciertas coincidencias en la combinación heredada hacen que un hermano sea compatible con otro dentro del sistema HLA, según el tipo de trasplante se necesitara diferente grado de coincidencia.<sup>19, 20, 21</sup>

Las técnicas basadas en la caracterización del HLA en el nivel de genoma, se divide en tres grandes grupos: sondas de oligonucleótidos secuencia-específicos, cebadores secuencia-específicos y secuenciación genética.<sup>19, 20, 21</sup>

**RESOLUCIÓN BAJA (PCR-SSP Sequence Specific Primer):** Esta metodología solamente es útil para tipificar a un donador y a un receptor que están altamente emparentados (por ejemplo padre e hijo).<sup>21</sup>

**RESOLUCIÓN MEDIA (PCR-SSOP Sequence-Specific Oligonucleotide Probes):** Esta tecnología se puede elegir cuando se van a analizar muchos individuos simultáneamente, como en los programas de trasplante de médula ósea, para hacer un primer tamizaje en busca de donadores no relacionados.<sup>21</sup>

**RESOLUCIÓN ALTA (PCR-Secuenciación):** Esta metodología debe utilizarse cuando se ha elegido a un donador no emparentado para verificar la compatibilidad entre él y el receptor.<sup>21</sup>

## RECHAZO DEL TRASPLANTE

El rechazo de órganos trasplantados tiene las características que definen a una respuesta inmune de memoria o de especificidad; cuando se realiza por primera vez un alotrasplante se desarrolla una respuesta del sistema inmunitario del huésped frente a antígenos de histocompatibilidad del donante; 7-8 días más tarde los linfocitos de los ganglios linfáticos que drenan la zona en que se encuentra el trasplante aumentan de tamaño y se dividen y otro tipo de linfocitos se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos dirigidos específicamente contra el trasplante. Simultáneamente, el órgano trasplantado es invadido por cantidades masivas de linfocitos y macrófagos, las inmunoglobulinas se depositan en la túnica de los vasos pequeños y las plaquetas se adhieren y forman trombos en la luz de los vasos. Esta serie de acontecimientos es llamado rechazo primario termina produciendo un infarto del injerto que desencadena su necrosis.<sup>3</sup>

Si al mismo receptor se le realiza un segundo trasplante con un órgano del mismo donante, el patrón de acontecimientos varía drásticamente, pues el rechazo, llamado secundario, se completa en 2-3 días. Esta respuesta

acelerada al segundo trasplante, indica que el receptor quedó sensibilizado por el primer trasplante, es decir, que la respuesta a los antígenos de trasplante se realiza de forma compatible con el fenómeno de la memoria inmunológica. Sin embargo, si al mismo receptor se le trasplanta un órgano procedente de un donante no relacionado con los donantes anteriores, se produce un rechazo primario, lo que indica que la memoria inmunológica es específica para los antígenos del primer trasplante.<sup>3</sup>

El rechazo acelerado y específico de un trasplante en un receptor virgen se logra por interferencia de células linfoides sensibilizadas contra los antígenos del trasplante.<sup>3</sup>

Después del rechazo primario de un trasplante, se detectan anticuerpos y un aumento en el número de linfocitos T con especificidad hacia los antígenos del trasplante.<sup>3</sup>

Cuando se hace un trasplante en un receptor que ya posee elevados niveles de anticuerpos contra el trasplante, este se rechaza de manera hiperaguda sin llegar a vascularizarse (injerto blanco) y en el rechazo participan simplemente mecanismos de hipersensibilidad humoral (anticuerpos complemento y leucocitos polimorfonucleares).<sup>3</sup>

## LEYES DEL TRASPLANTE

**El rechazo es debido a las respuestas del huésped frente al injerto;** El hecho que determina que un aloinjerto sea rechazado es que este último posea cualquier antígeno del que carezca el receptor.<sup>5</sup>

Las reacciones del injerto contra el huésped se producen cuando los linfocitos del donante responden frente a los tejidos del receptor; La posibilidad de desarrollo de la enfermedad de injerto contra el huésped (EICH), debido a la presencia de células T inmuno-competentes procedentes del donante en un receptor alogénico.<sup>5</sup>

## APARATO URINARIO

El aparato urinario normal está compuesto por dos riñones, dos uréteres, una vejiga y una uretra, este conjunto de órganos se encarga de mantener el balance de fluidos y electrolitos, mediante la excreción de agua y varios productos de desecho; Un cierto número de sustancias son conservadas en el organismo por su reabsorción en el riñón, otras son excretadas como y el producto final, la orina, es liberada hacia el sistema .<sup>8,9</sup>

### ANATOMIA DEL APARATO URINARIO

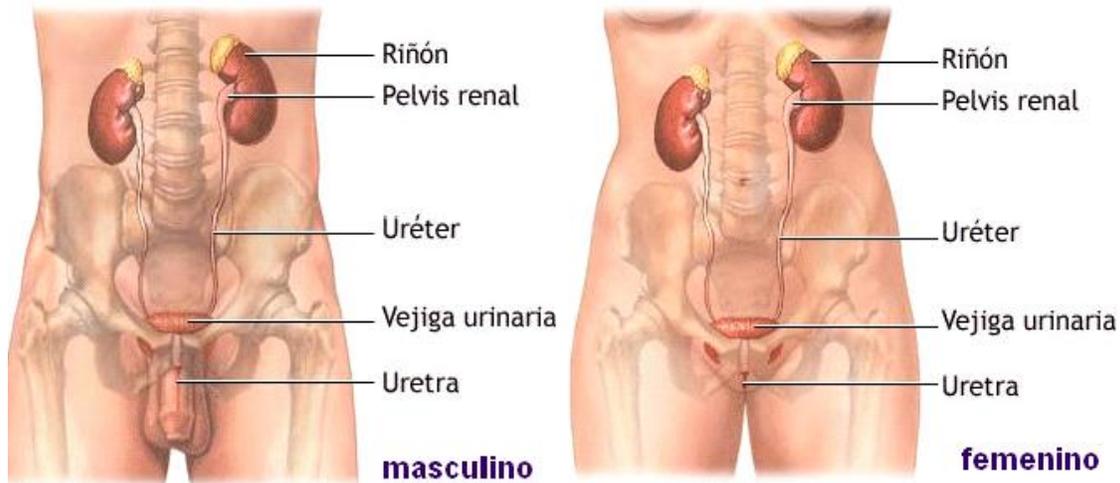


Ilustración 1. Anatomía del sistema urinario masculino (derecha) y el sistema urinario femenino (izquierda) que muestran los riñones, los uréteres, la vejiga, y la uretra.<sup>29</sup>

No hay más que una diferencia entre el Aparato Urinario femenino y masculino: la uretra masculina es algo más larga y es, al mismo tiempo, una vía urinaria y una vía genital. En cambio, la uretra femenina es un conducto exclusivamente urinario, siendo independiente de los conductos genitales.

## FISIOLOGÍA DE LOS RIÑONES

Los riñones son órganos glandulares, a los que les incumbe la importante función de producir la orina, situados en ambos lados de la columna vertebral, se encuentran en el exterior de la cavidad peritoneal, ocupando la región posterior del abdomen, a la altura de las dos últimas vertebrales dorsales y de las tres primeras lumbares. Los riñones nunca son iguales, siendo por lo general el izquierdo más voluminoso, la diferencia de nivel suele ser de 2 cm, cada riñón del ser humano adulto normal pesa unos 150 gramos y tiene un tamaño aproximado de un puño cerrado estos tienen forma de judía o frijol, y presentan un borde externo convexo y un borde interno cóncavo. Este último ostenta un hueco denominado hilio, por donde entran y salen los vasos sanguíneos. Sobre cada riñón se encuentra una glándula suprarrenal, que no interviene para nada en la formación de la orina <sup>6, 9, 10</sup>

### ESTRUCTURA EXTERNA DEL RIÑÓN

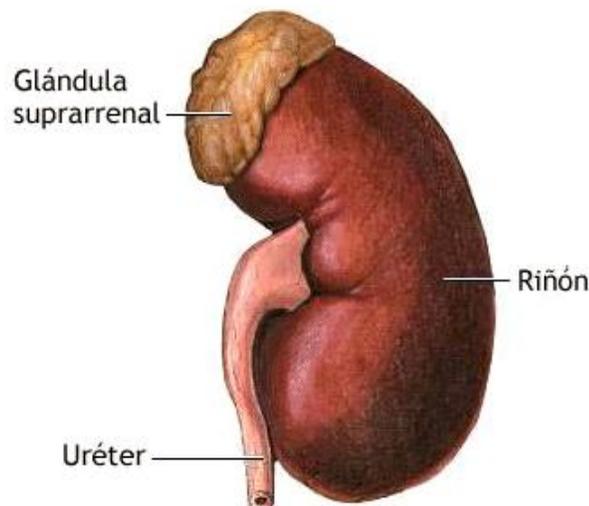


Ilustración 2. Estructura externa del riñón que muestra Glándula suprarrenal, Riñón y Uréter <sup>29</sup>

La cara media de cada riñón se encuentra la región del hilio, por la que pasan la arteria y vena renales, en el lado anterior se localiza la vena renal que recoge la sangre del riñón, y en la parte posterior, la arteria renal que lleva la sangre hacia los riñones, los linfáticos, la inervación y el uréter que transporta la orina desde el riñón hasta la vejiga donde se almacenan hasta que se vacía.<sup>4,6</sup>

### ESTRUCTURA INTERNA DEL RIÑÓN

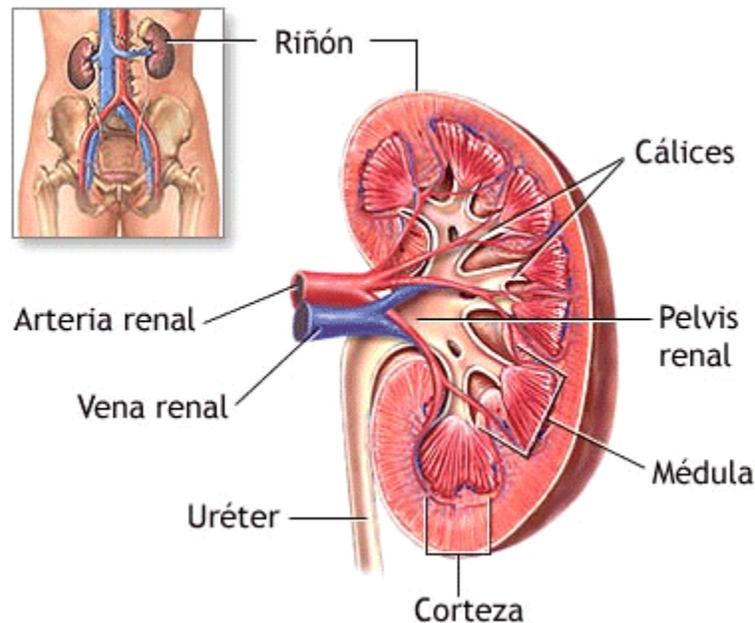


Ilustración 3. Estructura interna del riñón que muestra la ubicación de la Vena y Arteria, Corteza, Médula, Pelvis Renal y Cálices. <sup>29</sup>

El riñón es constituido por una corteza externa y la región interna denominada médula, esta se divide en múltiples masas de tejido en forma de cono llamadas pirámides renales. La base de cada pirámide se origina en el borde entre la corteza y la medula y termina en la papila, que se proyecta en el espacio de la pelvis renal, una continuación en forma de abanico es la porción superior del uréter. El borde externo de la pelvis se divide en bolsas abiertas, llamadas cálices mayores que se extienden hacia abajo y se dividen en cálices menores, que recogen la orina de los túbulos de casa papila. Las paredes de los cálices la pelvis y el uréter contienen los elementos contráctiles que empujan la orina hacia la vejiga, donde se almacenan hasta que se vacía en la micción.<sup>4,6</sup>

## NEFRONA

La unidad estructural y funcional del riñón es la nefrona, compuesta por un corpúsculo renal, que contiene glomérulos, agregaciones u ovillos de capilares, rodeados por una capa delgada de revestimiento endotelial, denominada cápsula de Bowman y situada en el extremo ciego de los túbulos renales.<sup>9,10</sup>

La nefrona, produce esencialmente un filtrado prácticamente libre de proteínas a nivel del glomérulo. Este filtrado contiene numerosos iones y moléculas pequeñas, que son reabsorbidas a distintos niveles de los túbulos para formar la orina definitiva, que desembocan en las papilas renales. El riñón humano contiene alrededor de 1 millón de nefronas.<sup>9,10</sup>

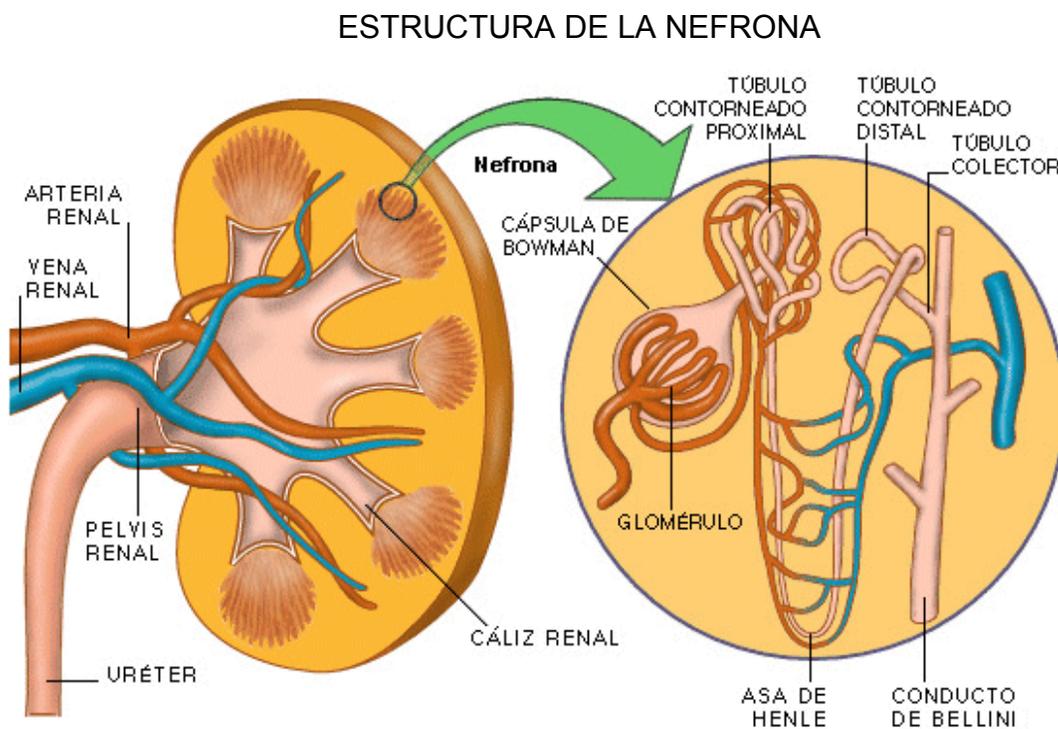


Ilustración 4. Estructura de la Nefrona que muestra cada uno de sus componentes.<sup>29</sup>

## **FUNCIONES DEL RIÑÓN**

- Regulación equilibrio hidroelectrolítico: Homeostasis.
- Regulación Osmolalidad.
- Regulación equilibrio ácido- base.
- Excreción productos metabólicos y sustancias de desecho.
- Regulación de la presión arterial.
- Regulación Eritropoyesis.
- Regulación Vitamina D.

## **PATOLOGÍAS DEL RIÑÓN**

El fallo renal puede resultar por varias razones, aunque hay cuatro componentes importantes que al dañarse generan este daño .<sup>11</sup>

- Los glomérulos que puede desembocar en esclerosis del glomérulo y a esto se le conoce como glomerulonefritis .<sup>11</sup>
- Los túbulos y el intersticio que juntos se consideran un solo elemento, las enfermedades de los túbulos se les conoce como nefrosis y las intersticiales que casi siempre tienen causas inflamatorias son nefritis intersticiales, si es bacteriana se conoce como pielonefritis.<sup>11</sup>
- El otro factor que se lesiona es el componente vascular, el sitio más importante es la arteriola aferente, que se fibrosa y hay isquemia la que empeora en esclerosis de las arterias, esto es la nefroarterioesclerosis. Toda enfermedad que termina en daño del riñón con atrofia de los túbulos y esclerosis de los vasos se conoce como riñón terminal. <sup>11</sup>

## Patologías Comunes

Nefropatía sintomática, Riñón Poliquístico del Adulto, Glomérulonefritis post-estreptocócica, Síndrome de Goodpasture, Mecanismos Inmunitarios de Lesión Glomerular.<sup>11</sup>

## Principales Síndromes Renales

Síndrome Nefrótico Agudo, Síndrome Nefrótico, Proteinuria o Hematuria asintomática, Insuficiencia renal aguda, Insuficiencia renal crónica, Infección de vías urinarias, Nefrolitiasis.<sup>11</sup>

## OPCIONES DE TRATAMIENTO PARA FALLO RENAL

Las opciones de tratamiento para el fallo renal pueden ser:

La **hemodiálisis**, que limpia y filtra la sangre usando una máquina para que temporalmente elimine los desechos dañinos, la sal y el agua extra del cuerpo. La hemodiálisis ayuda a controlar la presión en la sangre y ayuda a mantener el balance apropiado en el cuerpo de las sustancias químicas tales como el potasio, sodio, calcio y bicarbonato.<sup>11</sup>

La **diálisis peritoneal**, que es otro procedimiento que remueve el agua extra, desechos y químicas del cuerpo, usa las paredes del abdomen para filtrar la sangre; a esta pared se le llama membrana peritoneal y actúa como riñón artificial.<sup>11</sup>

## **TRASPLANTE RENAL**

El trasplante renal es el trasplante de un riñón sano en un paciente con problemas renales, en la actualidad la terapia de elección para la mayoría de las causas de insuficiencia renal en la que está indicado, mejora la calidad de vida al prescindir de la dependencia de la diálisis y de las dietas rigurosas, aumenta la supervivencia de los pacientes y es el tratamiento más económico cuando se compara con la diálisis. Es un procedimiento rutinario y su aplicabilidad viene limitada por la disponibilidad de riñones en relación con la demanda creciente de pacientes que lo precisan. Este desequilibrio entre pacientes en lista de espera de trasplante renal (TR) y la disponibilidad de riñones de cadáver se agranda cada año; la opción de TR de un donante vivo es una excelente alternativa pues permite una cirugía reglada.<sup>12, 13</sup>

## **CAUSAS PARA REALIZAR EL TRASPLANTE**

El trasplante renal está indicado en las enfermedades que evolucionan a Insuficiencia Renal Crónica Terminal (IRCT) siendo las principales causas la glomerulonefritis crónica y la nefropatía diabética; otras causas menos frecuentes son la pielonefritis crónica, nefropatías hereditarias, metabolopatías distintas a la diabetes mellitus, uropatía obstructiva, nefropatía toxica, etc. Dos factores importantes para tener en cuenta a la hora de aceptar los pacientes para inclusión en lista de espera de TR son la edad y las enfermedades asociadas, fundamentalmente cardiovascular, hepática, pulmonar o del sistema nervioso central.<sup>13, 14</sup>

## **ESTUDIO PRETRASPLANTE**

La evaluación inicial consiste en una historia clínica completa y una exploración física junto con datos complementarios (analíticos y pruebas de imagen), la valoración urológica y vascular e información extensa del paciente. Es conveniente realizar un estudio inicial para todos los pacientes y completarlo con estudios opcionales, según los criterios de cada centro y características de cada

paciente (historia y antecedentes, edad, sexo, tipo de nefropatía, hallazgos exploratorios, presencia o sospecha de patología urológica o vascular).<sup>13,14</sup>

La información del paciente debe ser exhaustiva en cuanto al riesgo quirúrgico y complicaciones, necesidad de la inmunosupresión de por vida, riesgos de infecciones y neoplasias que conlleva, información de la posibilidad de regresar a diálisis por diversas causas fundamentalmente rechazo crónico.<sup>13,14</sup>

## **SELECCIÓN DEL RECEPTOR Y DEL DONADOR**

Una vez comprobada en la evaluación que el candidato es apto para el trasplante es conveniente valorar si existe en el entorno familiar opciones reales para el TR de un donante vivo sobre todo si el paciente es joven. Se trata de una excelente opción terapéutica para el tratamiento de la IRCT. Su utilización se justificara por la escasez de órganos de cadáver en relación con la demanda, el escaso riesgo para el donante y los mejores resultados de supervivencia del paciente y del injerto; A demás permite efectuarlo de forma protocolizada o tras una corta estancia en diálisis lo que reduce de forma significativa la mortalidad asociada a la diálisis y mejora aspectos de carácter.<sup>13, 14</sup>

### **Trasplante renal de donador vivo**

Esto ocurre cuando una persona viva dona uno de sus riñones, la persona viva podría ser relacionada o no relacionada, y en ese caso se llama trasplante de donante vivo.<sup>14</sup>

Un pariente consanguíneo es uno de los padres, un hermano(a) o un hijo(a), un pariente no consanguíneo se conoce como trasplante de donante vivo que no es pariente, en este caso, podría tratarse de un amigo, de un familiar que no sea pariente consanguíneo (como el cónyuge, hijastros, hijos o padres adoptivos).<sup>14</sup>

El empleo de donantes vivos difiere mucho de un país a otro; en la actualidad hay un incremento de la donación de donadores vivos para reducir las listas de espera, es preciso cumplir una serie de requisitos legales. Si hay más de un posible donador vivo se valorarían las características del donante (edad, riesgo, diferencia de edad y de masa corporal entre donante y receptor y grado de

compatibilidad ABO y HLA). El donante será sometido a un protocolo de estudio o evaluación riguroso y por etapas empezando con los exámenes generales y la prueba cruzada linfocitaria (PCL), dejando para más adelante las exploraciones más sofisticadas. Los resultados de supervivencia son en general excelentes y superiores a los diez años en un 17 a 20% a los procedentes de donador cadavérico.<sup>13</sup>

### **Trasplante renal de donador fallecido**

Si el receptor no dispone de la opción de un posible donante vivo será incluido en la lista de espera de donador fallecido. Se trata de un riñón extraído de una persona que sufrió muerte cerebral; la familia de esa persona hace la donación del riñón.<sup>14</sup>

Los riñones de un donante fallecido son un preciado recurso en todo el país, un sistema para donación de riñones que funciona a nivel nacional equilibra dos cosas: las necesidades de los pacientes que han esperado mucho tiempo por un riñón, y cumplir con el objetivo de trasplantar el riñón preciso para el paciente. La selección se realiza habitualmente atendiendo al grado de compatibilidad ABO y PCL. También se valoraran otros aspectos como edad, diferencia de edad o de índice de masa corporal entre donante y receptor, tiempo en lista de espera de trasplante, grado de sensibilización, si se trata de un primer trasplante renal o de un segundo o un tercero.<sup>14</sup>

En general, la espera para un donante de riñón fallecido es mayor que la espera para un riñón donado por una persona viva.<sup>13</sup>

## COMPLICACIONES

El TR requiere un seguimiento cuidadoso inicialmente, durante el seguimiento pueden surgir diversas complicaciones quirúrgicas o medicas algunas precoces y otras tardías.<sup>13</sup>

Después de algunas semanas del trasplante debe realizarse una biopsia para descartar cualquier tipo de rechazo, esta es la principal complicación tras el TR y se puede clasificar en:

**Rechazo hiperagudo:** Ocurre en las 48 hs tras la vascularización del injerto y obliga su extirpación. Se caracteriza por trombosis intravascular iniciada por los anticuerpos citotóxicos preformados dirigidos contra antígenos endoteliales del donante. Con la prueba cruzada pretrasplante que se realiza actualmente la incidencia ha disminuido hasta ser 0.1-1%, el rechazo agudo acelerado es muy parecido al hiperagudo, pero aparece en la primera semana postrasplante, obligando igualmente a realizar la trasplantectomía.<sup>5, 13, 15, 16</sup>

**Rechazo agudo:** A pesar de las nuevas terapias inmunosupresoras el rechazo agudo (RA) sigue siendo una causa frecuente de pérdida del injerto en el primer año postrasplante con una incidencia de 15-25%. Es además el principal factor predictivo del desarrollo de rechazo crónico. Se define como un deterioro agudo de la función renal con cambios patológicos específicos en el injerto.<sup>5, 13, 16</sup>

Ocurre generalmente en los tres primeros meses del TR pero puede aparecer posteriormente (RA tardío). En los pacientes tratados con inhibidores de la calcineurina las manifestaciones clínicas (fiebre, molestias en la zona del injerto, oliguria y malestar general) son menos evidentes, existiendo a veces sólo un aumento de creatinina sérica.<sup>13</sup>

**Nefropatía crónica del injerto (NCI) o rechazo crónico o glomerulopatía del trasplante:** es una entidad caracterizada clínicamente por hipertensión arterial, proteinuria y deterioro progresivo de la función renal, e histológicamente por daño túbulo-intersticial, vascular y glomerular, durante el primer año de evolución aparecen lesiones túbulo intersticiales, posteriormente se desarrollan lesiones vasculares (hialinosis arteriola con estrechamiento de la luz vascular y desdoblamiento y laminación de la membrana basal de los capilares peritubulares), glomerulares, y mayor daño túbulo-intersticial.<sup>13,16</sup>

## **PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

La importancia del laboratorio de histocompatibilidad en los programas de trasplantes es llevar a cabo pruebas para determinar el grado de compatibilidad o carencia de esta entre el receptor y sus posibles donadores, con la finalidad de optimizar la supervivencia del injerto y minimizar posibles reacciones inmunológicas. Para determinar compatibilidad antigénica es necesario: <sup>17</sup>

- Determinar el grupo sanguíneo ABO.
- Tipificar los antígenos HLA clase I – clase II.
- Realizar pruebas cruzadas linfocitarias.
- Realizar el monitoreo y detección de anticuerpos anti-HLA mediante un panel de linfocitos o antígenos HLA purificados.

### **Antígenos del sistema ABO de los grupos sanguíneos**

Los grupos sanguíneos son una forma de clasificar la sangre, por ciertas características que posee, estas dependen de los antígenos que los glóbulos rojos presentan en su superficie. <sup>13, 17</sup>

Las dos clasificaciones más importantes para describir los grupos sanguíneos en humanos son los antígenos y el factor RH. Las transfusiones de sangre entre grupos incompatibles pueden provocar una reacción inmunológica que pueden desembocar en hemólisis, anemia, fallo renal, shock (shocke) o muerte. <sup>13, 17</sup>

Karl Landsteiner definió este sistema que permite distinguir a cuatro grupos de sangre en la población humana (A, B, O y AB), dada la forma en que ellos se heredan, una persona puede tener uno de ellos o los dos simultáneamente. <sup>4, 13</sup>

Estos antígenos son potentes en los trasplantes de órganos y tejidos, debido a que los seres humanos presentan de manera natural anticuerpos (Ac) contra los antígenos del sistema mencionado. Su importancia estriba en que están presentes en los endotelios vasculares de diversos órganos. <sup>13, 17</sup>

Si se trasplanta un órgano a un individuo ABO incompatible, los Ac naturales Anti A y/o Anti B del receptor producen una lesión tisular en el órgano trasplantado, lo que conduce al rechazo. En consecuencia, el grupo sanguíneo del receptor y el donador debe ser establecido antes de realizar cualquier trasplante del mismo modo que se investiga antes de cualquier transfusión sanguínea.<sup>4, 13, 17</sup>

### **Pruebas cruzadas linfocitarias método de Linfocitotoxicidad**

Basada en la técnica de citotoxicidad dependiente de complemento, hace reaccionar el suero del receptor con los linfocitos del donante en presencia de complemento. La positividad de la reacción se visualiza por medio de un colorante vital, detecta anticuerpos de Clase IgG1, IgG3 e IgM, se puede realizar a partir de linfocitos totales aislados de sangre periférica o linfocitos de ganglio linfático o bazo. La reacción se cuantifica según el porcentaje de células muertas, por lo que la viabilidad celular en la muestra de partida es fundamental. Se puede realizar un tratamiento con DTT (que destruye la IgM) para diferenciar anticuerpos linfocitotóxicos de tipo IgM de los IgG.<sup>17, 18</sup>

Los resultados se expresan en magnitud de reacción, dependiendo del porcentaje de lisis celular, como se observa en el siguiente cuadro.<sup>17</sup>

Cuadro 1. Puntuación Células muertas Interpretación.

<b>% DE CÉLULAS MUERTAS</b>	<b>CALIFICACIÓN</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
0-10	1	Negativo
11-20	2	Negativo dudoso
21-50	4	Positivo débil
51-80	6	Positivo
81-100	8	Positivo fuerte
0	Ilegible	

En los casos de una prueba cruzada positiva es importante descartar la presencia de auto anticuerpos no HLA, los cuales son irrelevantes para trasplantar y se traducen como resultados falsos positivos, estos anticuerpos son de tipo IgM y reaccionan a baja temperatura. Este estudio generalmente constituye una prueba de rutina en el informe de laboratorio de histocompatibilidad.<sup>16, 17, 18</sup>

### **Pruebas cruzadas con anticuerpos monoclonales**

Este método consiste en una reacción antígeno-anticuerpo sobre la superficie celular visualizada mediante la utilización de una anti-inmunoglobulina humana (generalmente un Fab2-anti-IgG) marcada con un fluorocromo detectable por citometría de flujo. Para identificar los subtipos de linfocitos con los que reacciona el suero, éstos se identifican con anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo distinto del de la anti-IgG. Habitualmente se utiliza anti-CD3 para identificar los linfocitos T y anti-CD19 o anti-CD20 para identificar los linfocitos B. Las células T (sin activar) expresan sólo HLA-I, mientras que las células B expresan HLA-I + HLA-II. Los anticuerpos anti-HLA-I reaccionaran con las células T y B. Los anticuerpos anti-HLA-II sólo reconocerán los linfocitos B.<sup>17, 18, 22</sup>

Las células deben tener una buena viabilidad ya que de otra manera no son reconocidas por el citómetro como linfocitos.<sup>17, 18</sup>

### **Detección de anticuerpos Anti HLA (PRA)**

Esta prueba permite conocer la especificidad de los anticuerpos formados y esta información nos correlaciona con precisión si existe o no incompatibilidad del receptor con el potencial donador en estudio y la posibilidad de desarrollar algún tipo de rechazo. A sí mismo, es una herramienta útil para la selección de donadores en pacientes altamente sensibilizado. En términos generales, mientras mayor es el porcentaje de PRA más sensibilizado se encuentra el paciente y son menores las posibilidades de tener una prueba cruzada negativa con el potencial donador.<sup>17,18</sup>

## CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo (CF) es una metodología analítica desarrollada en la segunda mitad del siglo pasado, cuyas aplicaciones biomédicas han ido creciendo en forma exponencial hasta convertirla en una de las herramientas más poderosas del laboratorio contemporáneo.<sup>20</sup>

Este es un método analítico por el que se mide la emisión de múltiples fluorescencias y la dispersión de luz (“light scatter”) de células o partículas microscópicas, alineadas secuencialmente mediante una corriente líquida laminar, cuando son presentadas de una en una y a gran velocidad (hasta miles de células/segundo) frente a un haz de luz láser de longitud de onda adecuada.<sup>20, 26, 27</sup>

### Fundamentos de la citometría de flujo

Los instrumentos de CF se dividen en tres compartimentos funcionales: hidráulico, óptico, y electrónico. El primero consiste en un sistema complejo de fluidos con diferentes presiones que obliga a las células a pasar, en un arreglo constante y secuencial, a través de un pequeño orificio hacia un punto espacial conocido como “de intersección”. En este, las células son iluminadas por una fuente de luz muy intensa, habitualmente rayos laser, y sus diversas reacciones son detectadas por un sistema complejo de lentes, filtros y espejos que conducen las señales luminosas hacia fotodiodos y fotomultiplicadores. Estas señales son digitalizadas y colectadas por un ordenador electrónico que integra la información recibida de cada una de las células en su paso por el punto de intersección. Los instrumentos pueden analizar, así, desde unas centenas hasta varios millones de células en unos cuantos segundos.<sup>20, 26, 27</sup>

## Conceptos esenciales de Fluorescencia

- **Fluorocromo:** Molécula capaz de absorber fotones y emitir fotones de menor energía (mayor longitud de onda).
- **Fluoróforo:** Parte del fluorocromo responsable de la emisión de fluorescencia.
- **Marcador fluorescente o sonda fluorescente:** Fluorocromo diseñado para unirse a una región específica de una muestra biológica o responder a un determinado estímulo.
- **Longitud de onda de excitación:** Longitud de onda a la que un fluorocromo puede absorber fotones.
- **Longitud de onda de emisión:** Longitud de onda a la que un fluorocromo emite fotones de fluorescencia.
- **Desplazamiento de Stokes:** Separación entre las longitudes de onda de absorción y de emisión en un fluorocromo.
- **Rendimiento cuántico:** cociente entre el número de fotones de fluorescencia emitidos y el número de fotones absorbidos.

## Utilidad

- **En hematología:** contaje celular, fórmula leucocitaria, contaje reticulocitario, análisis de médula ósea.
- **En farmacología:** estudios de cinética celular.
- **En inmunología:** subpoblaciones T, tipaje tisular, estimulación linfocitaria.
- **En oncología:** diagnóstico, pronóstico y monitoreo de tratamiento.
- **En microbiología:** diagnóstico bacteriano y vírico, sensibilidad de antibióticos.
- **En genética:** cariotipo, diagnóstico de portador, diagnóstico prenatal.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En el trasplante renal es importante la identificación de anticuerpos preformados anti-HLA que son capaces de desarrollar un rechazo hiperagudo. La metodología para identificar estos anticuerpos es la prueba cruzada linfocitaria que ha sido utilizada, en otros laboratorios. Tres formas de realizar estas pruebas es por citotoxicidad leída en (microscopio y citómetro de flujo) y con anticuerpos monoclonales anti-IgG que al compararlos con la prueba PRA (panel reactivo de anticuerpos), capaz de identificar anticuerpos específicos anti-HLA se confirmara cuál de estas metodologías es la más sensible. Sin embargo la comparación de estos métodos no se ha realizado en pacientes en espera de trasplante renal; es por ello que en este proyecto se compararan estas técnicas en pacientes y donadores de trasplante renal atendidos en el laboratorio de histocompatibilidad del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE. Los resultados serán de gran utilidad para el laboratorio ya que permitirán menos rechazos y mayor supervivencia de los órganos así como en cuestión de costo/ benefició.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la correlación que hay entre los métodos de Anticuerpos Monoclonales y Microlinfocitotoxicidad (leída al microscopio y citómetro de flujo), con la prueba confirmatoria (PRA) en la determinación de compatibilidad anti-HLA de pacientes en espera de trasplante renal.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Conocer el manejo, fundamento, funcionamiento e interpretación del citómetro de flujo.
- Determinar la sensibilidad de cada uno de los métodos para realizar pruebas cruzadas utilizadas en pacientes en espera de trasplante renal.
- Determinar el porcentaje de inmunización de anticuerpos anti-HLA mediante la prueba PRA en pacientes en espera de trasplante renal.
- Determinar la relación de las pruebas cruzadas con la prueba PRA al ser utilizada con pacientes en lista de espera.

## **HIPÓTESIS**

Las pruebas de microlinfocitotoxicidad leída en el microscopio y citómetro de flujo así como la determinación de anticuerpos Anti-HLA tendrán una correlación arriba del 70% con la prueba confirmatoria (PRA) para la determinación de compatibilidad de anticuerpos anti-HLA en pacientes en espera de trasplante renal.

## **DISEÑO METODOLÓGICO**

### **Estudio**

- Trasversal prospectivo.

### **Población**

- Pacientes en espera de trasplante renal atendidos en los servicios de Histocompatibilidad del CMN 20 de Noviembre.

## CRITERIOS DE SELECCIÓN

### Inclusión

- Pacientes adultos de cualquier sexo en espera de trasplante renal, que tengan alternativa de donantes vivos o donador fallecido.

### Exclusión

- Pacientes con enfermedad autoinmune o alergia.

### Eliminación

- Con incompatibilidad ABO.
- Muestras de pacientes que no presenten las cantidades ideales para proceso.

## MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

### Equipo

- Microscopio. Germany Standard 25. Serie 016616.
- Balanza Científica. OHAUS. Serie AA26899.
- Contador de células. Economy Conter.
- Centrifuga Marathon 21K/R. Fischer Scientific. Serie 10602001772.
- Centrifuga. CWS cool working system. Serie 1060200172.
- Agitador Vortex. BARNSTEAD/THERMOYNE. Modelo M37615.
- Citometro de flujo. BD FACScalibur. Serie E5614.
- CPU. BD FACScalibur. Modelo M5183.

### Material

- Pipeta semiautomática 50-200 µL. Jencons Sealpette. Serie EL68506.
  - Pipeta semiautomática 100-1000 µL. Finnpipttte. Serie H80248.
  - Pipeta semiautomática 0.5-10 µL. Thermo Scientific. Serie DH95013.
  - Pipeta semiautomática 2-20 µL. Labssystem. Serie H97595.
  - Pipeta semiautomática 10-100 µL. Thermo Scientific. Serie U58041.
-

- Cámara de Neubauer Tiete Depth Profondeur 0.100 mm. SUPERIOR MARIENFELD.
- Placas de Terasaki.
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de 18x150.
- Perlas de vidrio medianas.
- Tubos de vidrio de 13x100.
- Pipetas Pasteur de punta larga y corta.
- Tubos FALCOM con tapa de 12x75 mm y 5 mL.
- Tubos Ependorf. Continental Lab Products.

### **Reactivos**

- Aceite mineral. Jit Baker.
- Buffer Red Blood Cell Lysis.
- PBS. Dulbeco.
- Murina Monoclonal Anti-A. Novaclone.
- Murina Monoclonal Anti-B. Novaclone.
- Murina Monoclonal Anti-A-B. Novaclone.
- IgM + IgG Monoclonal Anti-D. Novaclone.
- CD3 PerCP. BD Biosciences.
- CD19 PE. BD Biosciences.
- BD Via-Prob Cell Viability Solution. BD Biosciences Pharmigen.
- Rabbit Anti Human IgG. Dako Cytomation.
- Colorant eosin. Terasaki Stain Fix Reagent.
- Rabbit Complement HLA-ABC. PEL FREEZ.
- Ficoll-Paque Plus, density 1.077± 0.001 g/mL. GE Healthacare.
- Flow PRA I Screening Beads. ONE LAMBDA INC.
- Flow PRA II Screening Beads. ONE LAMBDA INC.
- PRA Wasc Buffer (10x). ONE LAMBDA INC.
- Anti-Human IgG. FITC.

## **MÉTODOS**

### **Toma de muestra**

1. Se localizó la vena y ligó.
2. Se limpio rrigurosamente la piel hacia arriba siguiendo el sentido del retorno de la vena con una torunda.
3. Se pinchó para la obtención de la sangre.
4. Se obtuvieron 3 tubos vacutainer con tapón rojo en el caso de donadores, en el caso de receptores se obtuvieron estos tres y uno con tapón amarillo.
5. Inmediatamente se vació cada uno de los tubos de tapa roja a otros de vidrio con tapón de rosca de 18 x 150 que contenían perlas de cristal para desfibrinar.

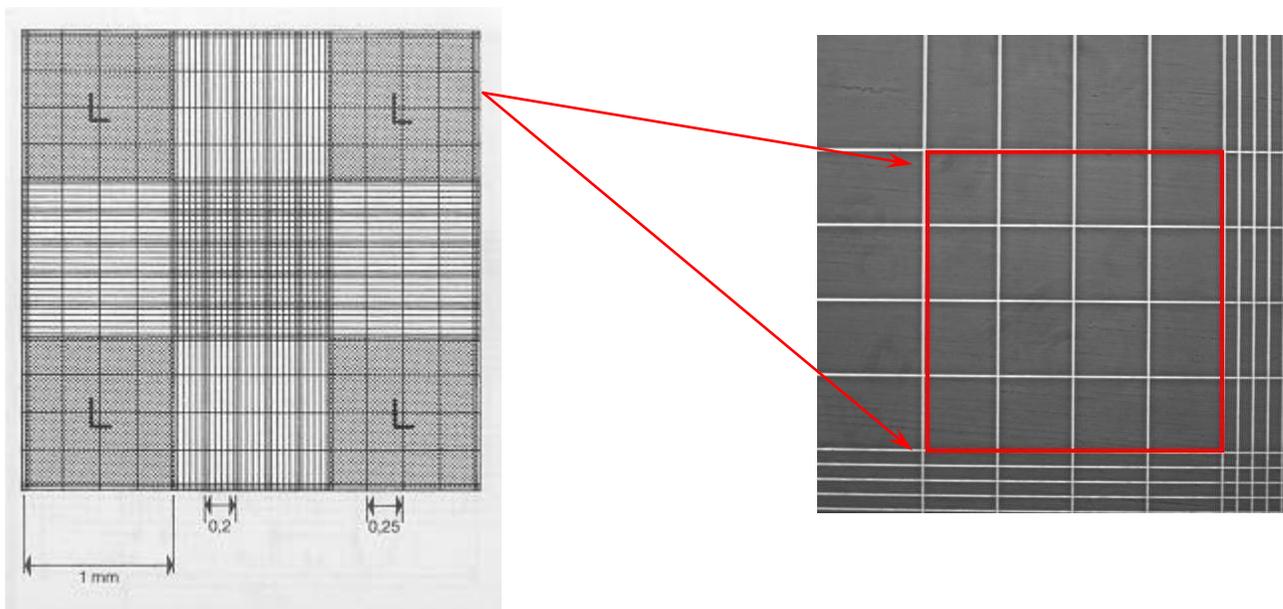
### **Desfibrinación**

1. Se agitaron lentamente los tubos con tapón de rosca y perlas que contienen la sangre en dirección de arriba hacia abajo esperando la formación del coaguló.
2. Una vez formado el coaguló se agitó con mayor fuerza para evitar la coagulación completa de la muestra.
3. Terminado el proceso se adicionaron de 2 a 3 mL de PBS a cada tubo.

### **Prueba Cruzada (separación de células)**

1. Se utilizaron tres tubos de 13x100 por cada muestra. Se rotuló cada tubo.
  2. Se Colocaron 2 mL de Ficoll en cada tubo de 13x100.
  3. Con una pipeta Pasteur se añadió la muestra en los tubos con Ficoll llenando por las paredes teniendo cuidado de no romper el gradiente de densidad. (Tapar los tubos).
  4. Se centrifugó a 1400 rpm durante 20 min.
-

5. Separando el anillo de glóbulos blancos con una pipeta Pasteur y colocando en un nuevo tubo.
6. Después se adicionó PBS hasta  $\frac{3}{4}$  partes del tubo y se Centrifugó a 1800 rpm durante 5 min.
7. Posteriormente se decantó con cuidado para no perder el botón de células, se lavó con 3 mL de PBS y se centrifugó a 1800 rpm durante 5 min.
8. Finalmente se decantó y adicionó 1.0 mL de PBS frío y se contó en la cámara Neubauer para ajustar a 4 millones de células por mL con PBS.



### **Microlinfocitotoxicidad (para leer en el microscopio)**

1. Se marcaron correctamente las filas y columnas de la placa para identificar las muestras.
2. Después se prepararon las placas de Terasaki. Llenando cada uno de los pozos con 5  $\mu$ L de aceite mineral.
3. Se tomaron 2  $\mu$ L de la suspensión de células del donador en tres pozos y 2  $\mu$ L de suero del receptor sobre el mismo pozo que se colocaron las células.
4. Se agitaron suavemente en el vortex e Incubaron a T ambiente durante 30 min.

5. Luego se colocaron sobre la mezcla de los pozos preparados 5  $\mu$ L de complemento.
6. Se agitaron en el vortex e incubaron a Temperatura ambiente durante 50 min.
7. Posteriormente se Colocaron 5  $\mu$ L de colorante eosina y se dejaron reposar a Temperatura ambiente durante 10 min.
8. Finalmente se leyeron en el microscopio invertido para evaluar la viabilidad de las células.

### **Citotoxicidad (para leer en el citómetro de flujo)**

1. Se tomaron 30  $\mu$ L de la suspensión de células del donador y adicionaron 30  $\mu$ L de suero del receptor mezclando suavemente con la pipeta y dejando reposar a Temperatura ambiente durante 30 minutos.
2. Posteriormente se Agregaron 60  $\mu$ L de complemento mezclando suavemente con la pipeta, se dejaron reposar a Temperatura ambiente 50 min.
3. Después se agregaron 500  $\mu$ L de colorante BD Via- Probe (preparado con 500  $\mu$ L PBS y 5  $\mu$ L de colorante por cada tubo).
4. Finalmente se dejó reposar durante 15 min, después se leyó en el citómetro de flujo.

### **IgG**

1. Se tomaron 200  $\mu$ L de la suspensión de células del donador y adicionaron 200  $\mu$ L de suero del receptor mezclando suavemente con la pipeta e incubando a Temperatura ambiente durante 30 minutos.
  2. Después se lavaron con 3 mL de PBS y centrifugaron a 1800 rpm por 5 min. Realizando este procedimiento tres veces.
  3. Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ L IgG preparada (50  $\mu$ L de PBS y 1  $\mu$ L de IgG), se dejó reposar a Temperatura ambiente por 30 min en oscuridad.
  4. Posteriormente se agregaron 5  $\mu$ L CD3 y 5  $\mu$ L CD19 a cada tubo. Se dejaron reposar a Temperatura ambiente durante 15 min en la oscuridad y se lavó con 3 ml PBS, centrifugando a 1800 rpm durante 5 min.
-

5. Finalmente se agregaron 500  $\mu$ L de PBS y leyeron en el citómetro de flujo.

## **PRA**

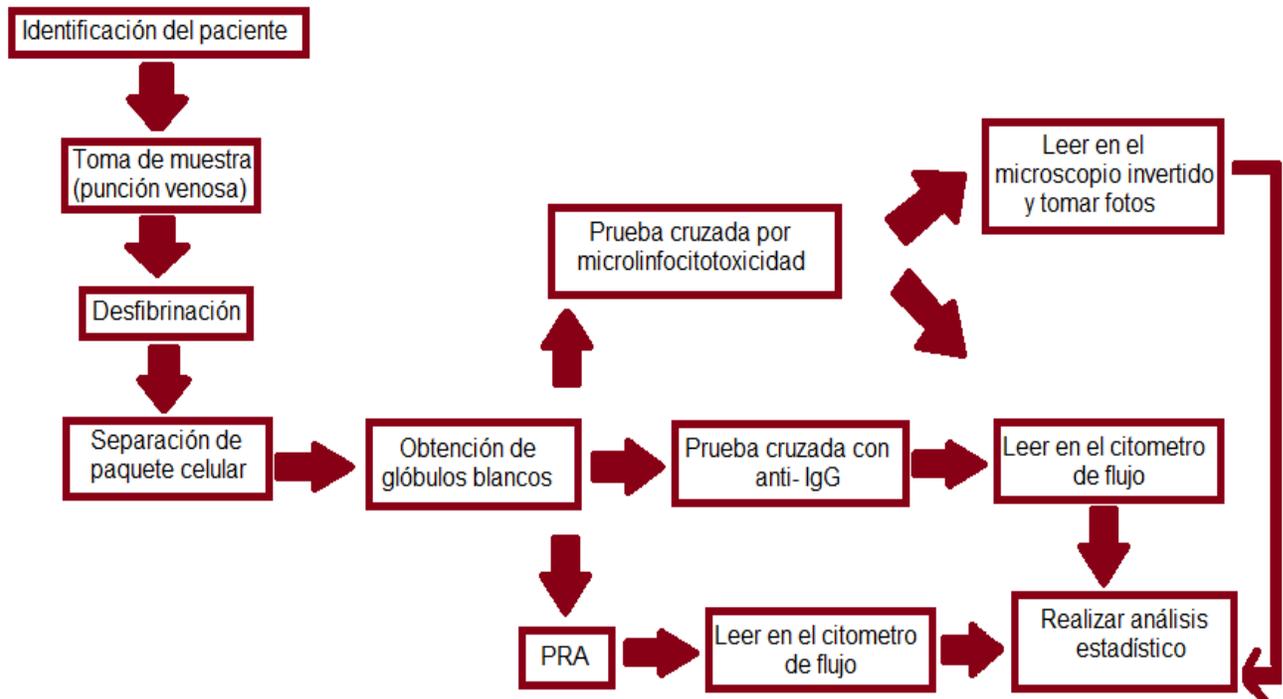
1. En un tubo ependorf se colocaron 20 mL del suero del receptor.
2. Posteriormente se agregaron suavemente 5  $\mu$ L de perlas Clase I y 5  $\mu$ L de perlas Clase II.
3. Se dejaron reposar a T ambiente 20 minutos en la oscuridad.
4. Después se agregó 1mL solución de lavado buffer (concentración 10x) y se centrifugó a 1400 rpm durante 5 min. Posteriormente se decantó cuidadosamente. Realizando este lavado tres veces.
5. Luego se agregaron 60  $\mu$ L de IgG preparada (60  $\mu$ L de solución de lavado y 1  $\mu$ L de IgG), e incubaron a T ambiente durante 30 minutos en la oscuridad.
6. Después se lavó con 1 mL de solución de lavado. Realizando este procedimiento 2 veces
7. Finalmente se adicionaron 500  $\mu$ L de solución de lavado y se leyó en el citómetro de flujo.

## **Manejo Citómetro de flujo**

1. Se encendió el regulador posteriormente citómetro de flujo y computadora en este orden. 10 minutos antes de utilizarlo.
2. Se abrió el programa CELL Quest y la planilla de PCL o PRA según el que se utilizó.
3. Luego se abrió la pestaña de adquirir y se seleccionó conectar citómetro, contadores y descripción de parámetros.
4. Una vez realizada la conexión se comienza a leer.
5. Se colocaron los tubos con muestra sobre el capilar de succión y se leyeron en el citómetro de flujo.
6. Al término de la corrida se analizaran los resultados.

## DIAGRAMA DE FLUJO

### MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACION DE COMPATIBILIDAD ANTI-HLA



## DISEÑO ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows. El análisis de correlación se realizó con correlación de Pearson y Spearman de acuerdo al tipo de variable. Consideramos la significancia estadística con  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS Y SU DISCUSIÓN

Las muestras tomadas a 27 pacientes con posibilidades de trasplante renal se analizaron por cuatro diferentes métodos

Para la prueba cruzada por microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento leída en microscopio invertido se analizaron 27 muestras de las cuales la número 3 y 7 resultaron positivas.

La positividad de la reacción se visualizó con ayuda de un colorante vital (eosina) que es capaz de penetrar a través de la membrana que ha sido lisada por activación del complemento. Las células muertas visualizadas han perdido forma y se observan de mayor tamaño además de no refringir luz, como se observa en la figura 1.



**Figura 1. PCL dependiente de complemento positiva leída al microscopio invertido.**

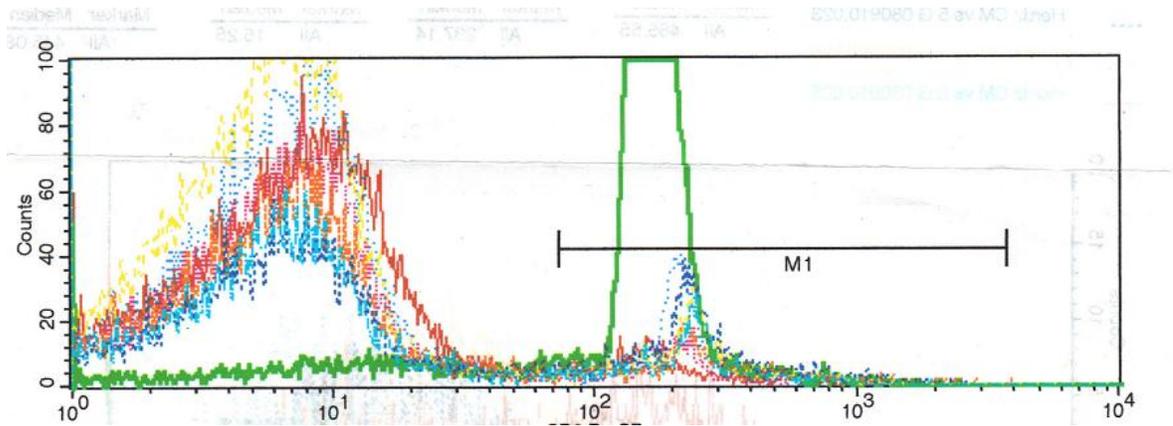
En una prueba cruzada por microlinfocitotoxicidad negativa, las células conservan su tamaño, refringen la luz, y el colorante no ingresa al citoplasma. Esto se debe a la ausencia de anticuerpos fijadores de complemento que se hallan unido a los antígenos de la superficie de la célula por lo que no se puede llevar a cabo una reacción antígeno-anticuerpo y por consiguiente la activación de complemento, encargado de lisar la célula.



**Figura 2. PCL dependiente de complemento negativa leída en el microscopio invertido**

En la prueba cruzada por microlinfocitotoxicidad o linfocitotoxicidad dependiente de complemento leída en citómetro de flujo (CF) se analizaron las mismas 27 muestras de las cuales las número 3, 7, 8, 9, 12, 17, 19, 23 y 27 resultaron positivas. La técnica es similar a la de microlinfocitotoxicidad la diferencia entre ellas es la utilización del colorante vital (BD Via-Probe) que es detectado por el citómetro de flujo a una fluorescencia de 650 nm de longitud. En la gráfica 1 se observa el número de células vivas y muertas de la prueba de linfocitotoxicidad dependiente de complemento leída en el citómetro de flujo; la cual muestra el número de células e intensidad de fluorescencia.

---



**Gráfica 1. Resultados emitidos por el citómetro de flujo en la PCL dependiente de complemento.**

COLOR DE LA LINEA DE MUESTRA	MUESTRA	% DE CÉLULAS MUERTAS
-----	Control positivo	90.43
-----	Control negativo	5.11
-----	Suero de ARM vs células de donador 1	5.17
-----	Suero de ARM vs células de donador 2	9.48
-----	Suero de HCM vs células de donador 1	0.77
-----	Suero de HCM vs células de donador 2	19.85
-----	Suero de HCM vs células de donador 3	6.31
-----	Suero de HCM vs células de donador 4	11.18

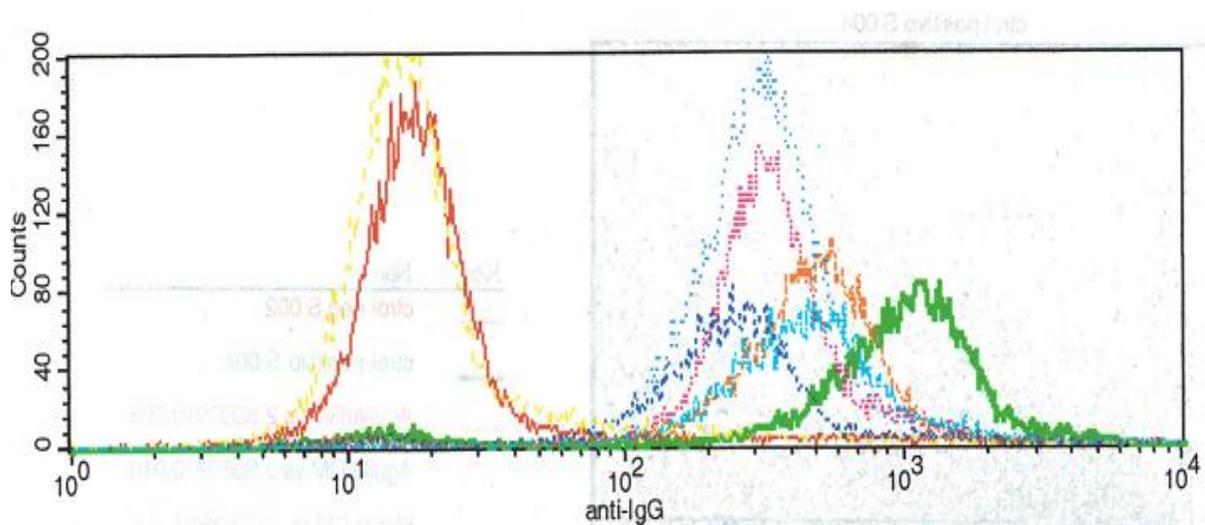
**Cuadro 2 .Resultados emitidos por el Citómetro de Flujo en porcentaje de células muertas**

---

Para la prueba cruzada linfocitaria por anticuerpos monoclonales se analizaron 27 muestras, en esta técnica todas resultaron positivas.

Esta prueba como las anteriores detecta una reacción antígeno-anticuerpo en los subtipos de linfocitos que han reaccionado, mediante fluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales marcados con moléculas fluorescentes, en este caso la anti-IgG marcada con el fluorocromo FICT (isotiocianato de fluoresceína) detectable en una longitud de onda de 514 nm es la encargada de fijarse al anticuerpo IgG unido a la célula. Para distinción de linaje celular el anti-CD3 marcado PerCP (Proteína Clorofila Peridinina) detectable en una longitud de onda 675 nm que ayuda a identificar los linfocitos T; para identificar los linfocitos B se utiliza el anti-CD19 marcado con el fluorocromo PE (ficoeritrina) detectable en una longitud de 578 nm, en las siguientes gráficas se pueden observar los resultados emitidos por el citómetro de flujo en una escala logarítmica ubicando en el eje de las x el número de células y el eje de las y la intensidad de fluorescencia.

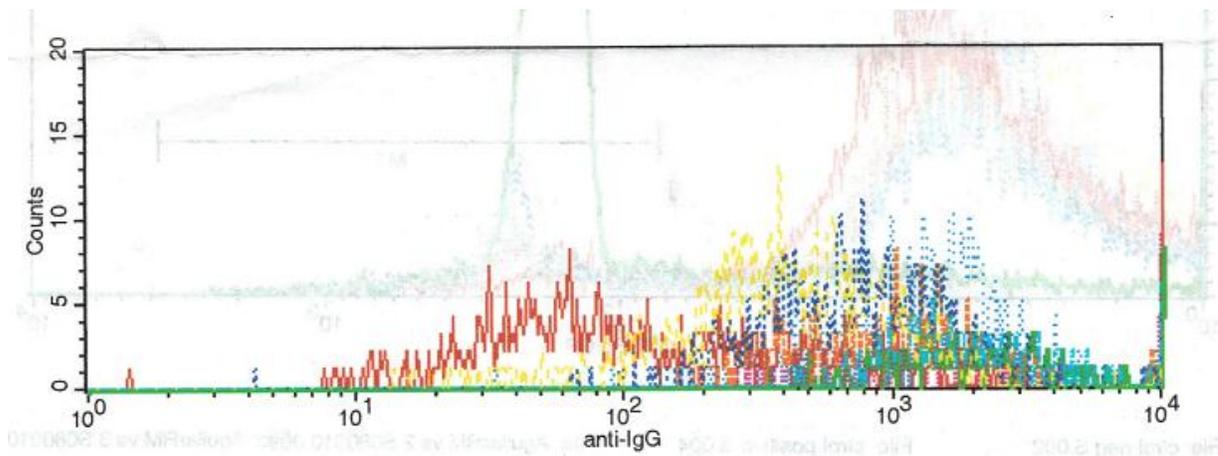
**Grafica 2. Resultados emitidos por el Citómetro de Flujo en las PCL por anticuerpos monoclonales marcados con anti-CD3**



**Cuadro 3. Medias de Fluorescencias emitidas por el Citómetro de flujo en la PCL por anticuerpos monoclonales marcados con anti-CD3.**

COLOR DE LA LINEA DE MUESTRA	MUESTRA	MEDIA DE FLUORESCENCIA
-----	Control positivo	991.05
-----	Control negativo	17.62
-----	Suero de ARM vs células de donador 1	321.97
-----	Suero de ARM vs células de donador 2	305.05
-----	Suero de HCM vs células de donador 1	465.55
-----	Suero de HCM vs células de donador 2	237.14
-----	Suero de HCM vs células de donador 3	16.25
-----	Suero de HCM vs células de donador 4	445.08

**Gráfica 3. Resultados emitidos por el Citómetro de Flujo en la PCL por anticuerpos monoclonales marcados con anti-CD19.**



---

**Cuadro 4. Medias de Fluorescencia emitidas por el Citómetro de Flujo de las PCL por anticuerpos monoclonales marcados con anti-CD19.**

COLOR DE LA LINEA DE MUESTRA	MUESTRA	MEDIA DE FLUORESCENCIA
-----	Control positivo	1851.73
-----	Control negativo	85.05
-----	Suero de ARM vs células de donador 1	1333.52
-----	Suero de ARM vs células de donador 2	1459.02
-----	Suero de HCM vs células de donador 1	1036.56
-----	Suero de HCM vs células de donador 2	729.93
-----	Suero de HCM vs células de donador 3	388.95
-----	Suero de HCM vs células de donador 4	1730.94

---

Para el panel reactivo de anticuerpos (PRA) se analizaron los sueros de candidatos a recibir trasplante, todos estos resultaron positivos.

En esta prueba se utilizan perlas que emiten fluorescencia y se encuentran recubiertas con distintos antígenos purificados HLA clase I y clase II comunes y otros antígenos HLA poco frecuentes. El porcentaje de PRA se representa por el porcentaje de perlas que reaccionan positivamente con el suero, esta prueba puede detectar simultáneamente los anticuerpos HLA clase I y clase II. Las perlas reaccionan específicamente con los anticuerpos HLA de cada clase por lo que no se provoca una reacción cruzada con los anticuerpos. Los procedimientos de estudio son iguales en las pruebas para las perlas de HLA clase I y clase II además se pueden distinguir por sus propiedades de fluorescencia diferenciadas cuando se analizan en el citómetro de flujo.

---

**Cuadro 5. Resultados obtenidos de cada una de las pruebas realizadas a las 27 muestras de estudio.**

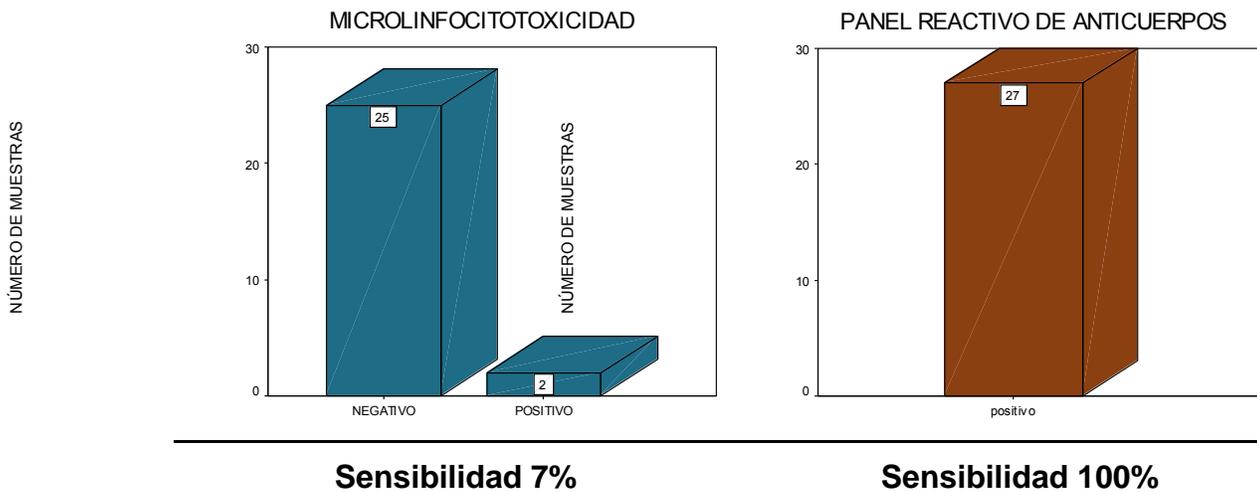
MUESTRAS	MICROLINFOCITOTOXICIDAD	LINFOCITOTOXICIDAD	ANTICUERPOS MONOCLONALES	PRA
1	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
2	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
3	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
4	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
5	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
6	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
7	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
8	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
9	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
10	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
11	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
12	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
13	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
14	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
15	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
16	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
17	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
18	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
19	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
20	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
21	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
22	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
23	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
24	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
25	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
26	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
27	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

Para la evaluación de positividad y negatividad en las pruebas de microlinfocitotoxicidad y linfocitotoxicidad, se utilizó el método de Terasaki.

La evaluación de la positividad y negatividad de la PCL por anticuerpos monoclonales y el PRA se han considerado valores establecidos en el laboratorio de histocompatibilidad del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.

En las siguientes gráficas se puede observar la relación existente en el número de muestras positivas entre las técnicas de microlinfocitotoxicidad y el estándar de oro PRA.

En la prueba de microlinfocitotoxicidad 25 muestras resultaron negativas mientras que sólo 2 de las 27 analizadas fueron positivas. Al realizar la técnica de Spearman no se encontró correlación existente entre estas técnicas.

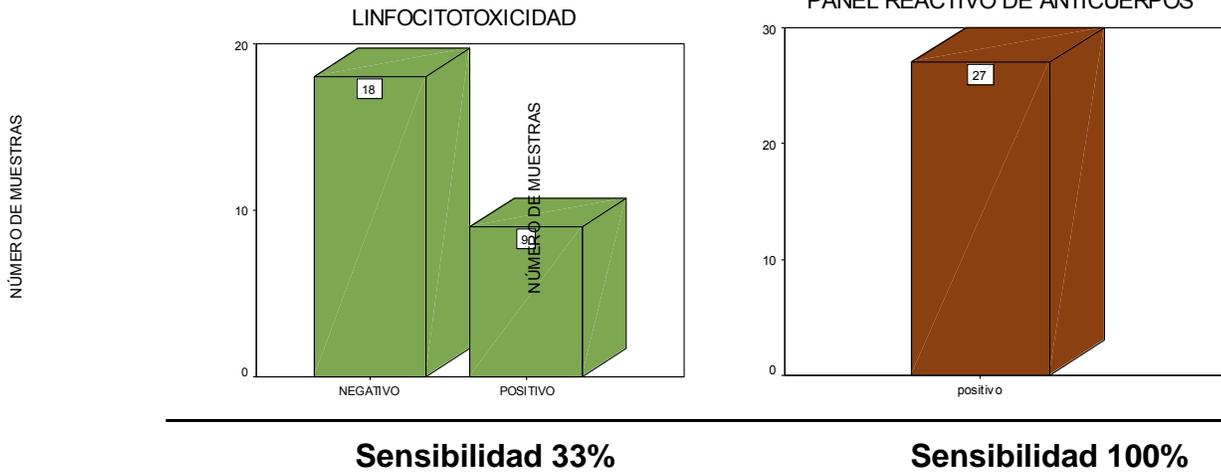


#### **Gráfica 4 y 5. Comparación entre la técnica de Microlinfocitotoxicidad y Panel Reactivo de Anticuerpos.**

Para la técnica de Linfocitotoxicidad se obtuvo una sensibilidad del 33% menor a la presentada por el Panel Reactivo de Anticuerpos que es del 100%. En el análisis estadístico aplicado a las 27 muestras de estudio, no se encontró correlación entre las técnicas.

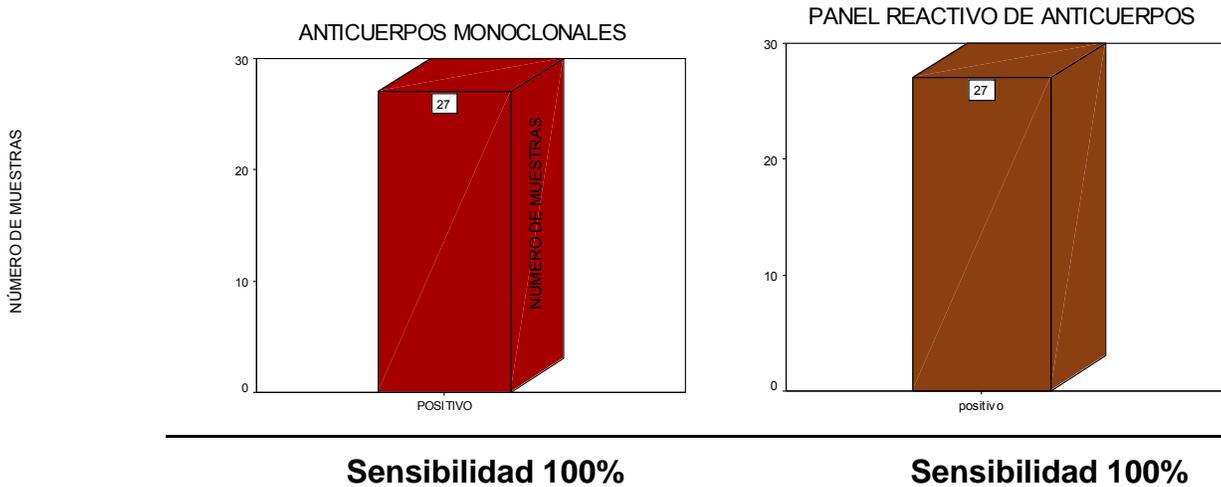
En las gráficas 5 y 6 se puede observar que para Linfocitotoxicidad sólo 9 de las 27 muestras de estudio fueron positivas en comparación con al PRA donde todas resultaron positivas.

CORRELACIÓN DE LA PRUEBA CRUZADA LINFOCITARIA POR ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IgG Y MICROLINFOCITOTOXICIDAD (LEÍDA AL MICROSCOPIO Y CITÓMETRO DE FLUJO) CONTRA LA PRUEBA DEL PANEL REACTIVO DE ANTICUERPOS (P.R.A)



**Gráfica 5 y 6. Comparación entre la técnica de Linfocitotoxicidad y Panel Reactivo de Anticuerpos.**

La relación entre la prueba de Anticuerpos Monoclonales con la técnica PRA es del 100%, ya que para ambas técnicas todas las muestras analizadas resultaron positivas por tanto la sensibilidad obtenida entre ellas es idéntica, esto lo podemos visualizar en las gráficas 5 y 7.



**Gráfica 5 y 7. Comparación entre la técnica de Anticuerpos Monoclonales y Panel Reactivo de Anticuerpos.**

La determinación de anticuerpos anti-HLA realizada por las distintas técnicas en comparación con el estandar de oro PRA indicó que no existe correlación entre las técnicas de Microlinfocitotoxicidad ( leida al microscopio y citometro de flujo) con el Panel Reactivo de Anticuerpos, sin embargo hay correlacion entre la técnica de anticuepos monoclonales y el PRA.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede establecer que la técnica más sencible es la de Anticuerpos Monoclonales que tuvo una sencibilidad clínica del 100%; con base en la metodología descrita por Pita Fernandez S. y Pertegas D.S <sup>28</sup>, además de tener elevada correlacion con el estandar de oro, ya que de las 27 muestras analizadas todas fueron positivas para ambas técnicas, esto se debe a que los métodos de Citometría de Flujo pueden medir la emisión de múltiples fluorescencias y la dispersión de luz de células o partículas microscópicas mediante una corriente líquida laminar cuando son presentadas de una en una y a gran velocidad frente a un haz de luz láser de longitud de onda adecuada, además de detectar la presencia de anticuerpos anti-HLA mediante el uso de anticuerpos frente a inmunoglobulinas humanas conjugados a fluorocromos. La menor sensibilidad presentada en las técnicas de Microlinfocitotoxicidad es porque estas miden a todos los anticuerpos citotóxicos para la célula mediante la activación del complemento, hay que recordar que en el suero de las personas se pueden encontrar anticuerpos no HLA, anticuerpos HLA no activadores de complemento o anticuerpos de clase IgM o IgA, estos son los principales factores que hacen la discrepancias de sensibilidad entre estas técnicas, Sin embargo con la técnica de anticuerpos monoclonales y la ayuda del citómetro de flujo se detectan dos características al mismo tiempo, las inmunoglobulinas IgG y la diferenciación del linaje celular de los linfocitos extraídos de sangre periférica, el gran parecido entre esta prueba y el estándar de oro es que ambos detectan solo las inmunoglobulinas de clase IgG la diferencia es que el PRA utiliza perlas que emiten fluorescencia y se encuentran recubiertas con distintos antígenos purificados HLA clase I y clase II comunes y otros antígenos HLA poco frecuentes.

## CONCLUSIÓN

La realización de las diferentes técnicas para la detección de anticuerpos anti-HLA indica que sólo una de ellas tiene correlación del 100 % en comparación con la prueba estándar PRA, según los resultados obtenidos se sugiere sustituir las técnicas de microlinfocitotoxicidad dependientes de complemento por la técnica de anticuerpos monoclonales ya que esta no sólo ayuda a la detección de pacientes sensibilizados contra antígenos de histocompatibilidad sino que también beneficiara al laboratorio para disminuir sus costos al realizar sólo una de estas técnicas y el estándar de oro.

La utilización del citómetro de flujo permite conocer con precisión y con alta sensibilidad si un receptor posee anticuerpos IgG contra cada uno de los antígenos del sistema HLA.

La determinación del porcentaje de inmunidad de anti-HLA permite obtener un resultado seguro de la compatibilidad existente entre la pareja de donante-receptor.

## REFERENCIAS

1. Miranda B, Matesanz R, Fernández- Represa J.A. Historia del trasplante renal en España. Clínicas Urológicas de la Complutense. Madrid. 1999; 7: 15-17.
2. Peña José C. Historia del trasplante renal en el INCMNSZ. Revista de Investigación Clínica. México 2005; 57(2): 120-123.
3. Rojas Espinosa O. Inmunología de memoria. 2ªed. Panamericana; 2001.
4. Guyton Arthur. Tratado de fisiología médica. 10ªed. McGraw-Hill/ Interamericana; 2001.
5. Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología. 5ª ed. España. Harcourt; 2000.
6. Kierszenbaum Abraham L. Histología y biología celular: introducción a la anatomía patológica. 2ª ed. España. Elsevier; 2008.
7. Stites D.P, Abbal I, Terr M.D. Inmunologia basica y clínica. 7ª ed. Manual moderno. 1993.
8. Bach J.F, Lesevre P. Inmunologia. Masson. Barcelona. 1993.
9. Bautista C, Anatomía y fisiología del riñón y de las vías urinarias. C.H.M.DR.A.A.M. Conferencia Enero 2009; Citado Julio 2010. Avalado por <http://www.aspame.net>
10. Tiskow Gregorio. Clases Fisiología renal Humana. Universidad de California, Los Ángeles Departamento de ciencias funcionales. Citado Agosto 2010. Avalado por [www.ucla.edu/ve/dmedicin/.../fisiologia/FISIOLOGIARENAL.pdf](http://www.ucla.edu/ve/dmedicin/.../fisiologia/FISIOLOGIARENAL.pdf)
11. Andrade H.Y, de la Paz R, Massippi S. Anatomia y fisiología y patología renal, Tratado de enfermería cuidados críticos pediátricos y neonatales, Actualizado 2007 diciembre. Citado Agosto 2010. Abalado por [www.eccpn.aibarra.org/temario/.../capitulo139.htm](http://www.eccpn.aibarra.org/temario/.../capitulo139.htm)
12. Lesavre P. Inmunologia y serología. 2ª ed. Ediciones científicas la prensa mexicana. Philadelphia. 1987.
13. Martín P, Errasti P, Trasplante renal. An Sist. Sanit. Navar. 2006; 29(2): 79-91.
14. Bloom R, Cardella C, Conti D, Germain M, Goral M, Mc Cauley J, et al. Recibir un riñón nuevo. Sociedad americana de Trasplantes. 2008: 2-7
15. Sancho A, Gavela E, Crespo J.F, Górriz J.L, Ávila A, Núñez A, et al. Trasplante renal en presencia de una prueba cruzada positiva. Nefrología. Valencia. 2006; 26 (2): 261-265.

16. López-Hoyos M, Fernández Fresnedo G, Pastor J.M, Arias M. Anticuerpos anti-HLA postrasplante. Un nuevo método de monitorización. *Nefrología. Santander.* 2004; 25(4); 62-66
17. De Leo Cervantes C. Pruebas de Histocompatibilidad en el Programa de trasplantes. *Revista de Investigación Clínica.* 2005; 57(2): 142-146.
18. Encarnacion M, Fernández A, Franco E, Gonzales Ma. F, Núñez A. Comparación de métodos de estudio de anticuerpos anti-HLA y pruebas cruzadas en el trasplante renal. *Actualizaciones en trasplante renal. Sevilla* 2004; 128-131.
19. González Escribano M.F, Rodríguez R, Garcia-Lozano J.R, Nuñez Roldan A. Control de calidad de la linfocitotoxicidad. *Inmunología* 1998; 17: 33-35.
20. Ruiz Arguelles A. La citometría de flujo en la medicina de trasplante. *Medicina Universitaria. Puebla.* 2001; 3(12): 153-155.
21. Noris G.G, Santana T.C, La importancia de la tipificación de los Antígenos de Histocompatibilidad (HLA) para el trasplante de órganos). Mexico. *Blog Biología Molecular Diagnostica.* 2009. Citado septiembre 2010. Abalado por <http://www.bimodi.com/blog/la-importancia-de-la-tipificacion-de-los-antigenos-de-histocompatibilidad-hla-para-el-trasplante-de-organos/>
22. Arrieta B. Esteban, Salazar S. Lizbeth, Tipificación molecular de los antígenos leucocitarios humanos, Estado del arte y perspectivas para los trasplantes de células madre en Costa Rica. *Acta Médica. Costa Rica.* 2010; 52(1): 8-15.
23. Vega R. Gloria, Complejo mayor de histocompatibilidad. *Rev. Fac. Med. UNAM. Mexico.* 2009; 52(2): 86-89.
24. Rodríguez M. I, Giraldo C. M, Velásquez Laura, Álvarez C.M, García L. F., Frecuencias alelicas, genotípicas y haplotípicas HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 en donantes fallecidos, *Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud. Colombia.* 2007; 27: 537-547.
25. Sistema HLA y Compatibilidad HLA, Banco Nacional de Órganos y Tejidos. Uruguay. 2004; Citado en septiembre 2010 Disponible en <http://www.bnot.hc.edu.uy>
26. Rahman Misha, Introduction to flow cytometry, AbC serotec a division of morphosys; Citado en Agosto 2011 Disponible en [www.ab-direct.com](http://www.ab-direct.com)
27. Sanz Jorge M, Fundamentos y aplicaciones analíticas y separadas de la inmunofluorescencia y la citometría de flujo, Universidad de Alcalá; Citado en Agosto del 2011 disponible en [www.inmunologiauah.com](http://www.inmunologiauah.com).

28. Fernández Pita S., Diaz Pertegas S, Pruebas Diagnosticas: Sensibilidad y especificidad. Unidad de epidemiología Clínica. Complejo Hospitalario Universitario España. 2003; 10: 120-124.
29. Cuerpo Humano Aparato Excretor Ilustración de anatomía del aparato urinario, Estructura interna y externa, Estructura de la nefrona del riñón ; 12 Dic 2011, Disponible:  
[www.juntadeandalucia.es/averroes/~29701428/salud/exceter.htm](http://www.juntadeandalucia.es/averroes/~29701428/salud/exceter.htm)