



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**TIPIFICACIÓN DE LAS MOLÉCULAS HLA-DP PARA ESTABLECER SU
IMPORTANCIA CLÍNICA EN EL DESARROLLO DE ANTICUERPOS
ANTI-DP EN PACIENTES EN PROTOCOLO DE TRASPLANTE RENAL
DE LA UMAE HE CMN SXXI DE 2010 A 2015**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARIO ALBERTO GÓMEZ MARTÍNEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.,

2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARTINEZ ALVAREZ JULIO CESAR

VOCAL: PEREZ MONTESINOS GIBRAN

SECRETARIO: CAMACHO SANDOVAL ROSA

1er. SUPLENTE: FLORES MEJIA LUIS ANGEL

2° SUPLENTE: CASTRO ESCAMILLA OCTAVIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE HLA, UBICADO EN EL BANCO CENTRAL DE SANGRE DEL CENTRO
MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.**

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ

SUSTENTANTE:

MARIO ALBERTO GOMEZ MARTINEZ

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO LA AUTORIZACIÓN DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS) EN EL LABORATORIO DE HLA DEL BANCO CENTRAL DE SANGRE CMN SXXI CON NÚMERO DE REGISTRO ANTE EL SISTEMA DE REGISTRO ELECTRÓNICO EN LÍNEA DE LA COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD (SIRELCIS)

R-2016-3601-18

ÍNDICE GENERAL

❖ Abreviaturas	7
❖ Índice de Figuras	9
❖ Índice de Cuadros	10
❖ Índice de Gráficos	12
❖ Resumen	13
❖ Marco Teórico	15
➤ Generalidades del sistema HLA	15
▪ Antígenos HLA CI	
▪ Antígenos HLA CII	
➤ Nomenclatura del sistema HLA	21
➤ Inmunidad en el rechazo al trasplante de órgano sólido	27
▪ Reacciones mediadas por anticuerpos	
▪ Rechazo hiperagudo	
▪ Rechazo agudo	
▪ Rechazo crónico	
➤ Clasificación Banff del rechazo al injerto renal	33
➤ Generalidades del órgano sólido riñón	36
▪ Órgano sólido riñón	
➤ Fisiopatología del riñón	38
▪ Enfermedad renal crónica (ERC)	

▪	Clasificación de la ERC	
▪	Terapéutica en la ERC	
▪	Trasplante renal	
➤	ERC y el trasplante renal en México	45
➤	Evaluaciones Pre-trasplante	50
▪	Tipificación HLA	
▪	PCR-SSO	
▪	PCR-SSP	
▪	Nomenclatura del sistema HLA	
➤	Pruebas cruzadas y determinación de anticuerpos	55
▪	Ensayo de microlinfocitotoxicidad CDC	
▪	Ensayo por ELISA	
▪	Ensayo por citometría de flujo	
▪	Ensayo por Luminex®	
▪	Screening	
▪	Determinación del %PRA	
▪	Single Antigen	
❖	Justificación	64
❖	Objetivo	66
❖	Hipótesis del trabajo	66
❖	Materiales y Métodos	66

❖ Análisis Estadístico	68
❖ Resultados	71
❖ Discusión	82
❖ Conclusiones	92
❖ Perspectivas del estudio	93
❖ Anexo 1 (Técnicas utilizadas)	95
❖ Referencias Bibliográficas	100

ABREVIATURAS

ADE	Anticuerpo Donador Específico
ADH	Hormona Antidiurética
AMR	Rechazo Mediado por Anticuerpos
ANP	Péptido Natriurético Atrial
CD	Cluster de Diferenciación
CENATRA	Centro Nacional de Trasplantes
CF	Citometría de Flujo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Diálisis Peritoneal
DPCA	Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria
ECV	Enfermedad Cardio Vascular
ERC	Enfermedad Renal Crónica
ERCT	Enfermedad Renal Crónica Terminal
FMR	Fundación Mexicana del Riñón
HD	Hemodiálisis
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
IgG	Inmunoglobulina G
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IRC	Insuficiencia Renal Crónica

ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
RSCA	Análisis Conformacional Mediado por Referencia Fija
SBT	Tipificación basada en secuenciación
SNT	Subsistema Nacional de Trasplantes
SRA- aldosterona	Sistema Renina-Angiotensina-aldosterona
SSO	Secuencia específica de oligonucleótidos
SSP	Secuencia Específica de iniciadores
TCR	Receptor Células T
TFG	Tasa de Filtración Glomerular
TR	Trasplante Renal
TRR	Terapia de Reemplazo Renal

ÍNDICE DE FIGURAS

➤ FIGURA 1.- ORGANIZACIÓN GENÉTICA DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) EN EL CROMOSOMA 6.	15
➤ FIGURA 2.- PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA EN MOLÉCULAS MHC I Y MHC II.	17
➤ FIGURA 3.- ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I Y II EN COMPARACIÓN CON OTROS MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS.	19
➤ FIGURA 4.- NOMENCLATURA ACTUAL SISTEMA HLA.	23
➤ FIGURA 5.- MECANISMO DEL RECHAZO AL INJERTO EN TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO.	30
➤ FIGURA 6.- PARTES ANATÓMICAS DEL RIÑÓN.	37
➤ FIGURA 7.- ESQUEMA DE DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.	43
➤ FIGURA 8.- ALGORITMO DE MANEJO TR PROPUESTO POR EL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN.	61
➤ FIGURA 9.- ESQUEMA PROPUESTO DEL PAPEL DE LA EXPRESIÓN HLA-DPB1 EN EL RECONOCIMIENTO DE LA CÉLULA EN LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED.	94

ÍNDICE DE CUADROS

➤ CUADRO 1.- TABLAS DE LA AGRUPACIÓN G HLA-DP.	25
➤ CUADRO 2.- TABLAS DE LA AGRUPACIÓN P HLA-DP.	26
➤ CUADRO 3.- CLASIFICACIÓN BANFF CON BASE EN LAS CARACTERÍSTICAS PRESENTADAS EN LA BIOPSIA DEL INJERTO RENAL.	33
➤ CUADRO 4.- FACTORES DE RIESGO PARA DESARROLLO DE ERC: DE SUSCEPTIBILIDAD, INICIO Y PROGRESIÓN.	39
➤ CUADRO 5.- CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA DE ACUERDO A LA TFG Y AL DAÑO RENAL.	42
➤ CUADRO 6.- COMPATIBILIDAD DE GRUPO SANGUÍNEO ABO.	51
➤ CUADRO 7.- POLIMORFISMO DE ALGUNOS GENES DEL SISTEMA HLA PARA JUNIO/2016.	52
➤ CUADRO 8.- ESTUDIO MOLECULAR EN LA TIPIFICACIÓN DEL SISTEMA HLA.	53
➤ CUADRO 9.- CARACTERÍSTICAS DE PRUEBAS CRUZADAS Y DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS POR DIFERENTES TÉCNICAS.	56
➤ CUADRO 10.- VARIABLES DEPENDIENTES PROPUESTAS.	68
➤ CUADRO 11.- VARIABLES INDEPENDIENTES PROPUESTAS.	69
➤ CUADRO 12.- ESPECIFICIDADES DE LOS ANTICUERPOS HLA-DP DE LOS PACIENTES QUE PRESENTARON RECHAZO AGUDO DEL INJERTO DE TIPO HUMORAL.	75
➤ CUADRO 13.- RESULTADOS DE LAS TIPIFICACIONES DE LOS 15 BINOMIOS QUE PRESENTARON PÉRDIDA TEMPRANA DEL INJERTO.	77
➤ CUADRO 14.- RESULTADOS DEL CONSENSO DEL CONTROL DE CALIDAD EXTERNO.	78
➤ CUADRO 15.- RESULTADOS REPORTADOS POR EL LABORATORIO DE HLA BCS CMN SXXI CON LA TÉCNICA SSO-	78

LUM-OL.	
➤ CUADRO 16.- MFIS REPORTADAS DE LOS ADE HLA-DP.	78
➤ CUADRO 17.- RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN DE LOS 15 BINOMIOS CON RECHAZO, SIN INCLUIR EL RESULTADO DE LA TIPIFICACIÓN DEL ANTÍGENO HLA-DP.	79
➤ CUADRO 18.- NÚMERO DE ANTÍGENOS DEL SISTEMA HLA QUE COMPARTEN LOS BINOMIOS CON RECHAZO AGUDO Y/O PÉRDIDA TEMPRANA DEL INJERTO.	80
➤ CUADRO 19.- RESULTADOS DE LA COMPATIBILIDAD DE LOS BINOMIOS QUE PRESENTARON RECHAZO, EXPRESADOS EN PORCENTAJE CON RESPECTO AL TOTAL N=11.	81

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1.- TRASPLANTE RENAL HISTÓRICO POR AÑO **46**
- GRÁFICO 2.- TRASPLANTE RENAL HISTÓRICO POR AÑO Y TIPO DE DONANTE **47**
- GRÁFICO 3.- TRASPLANTE RENAL POR ENTIDAD FEDERATIVO DURANTE EL PRIMER TRIMESTRE DEL AÑO 2016 **48**
- GRÁFICO 4.- TRASPLANTE RENAL POR TIPO DE INSTITUCIÓN DURANTE EL PRIMER TRIMESTRE DEL AÑO 2016 **49**
- GRÁFICO 5.- HISTÓRICO DE PACIENTES CON AC ANTI HLA-DP QUE CUMPLIERON REQUISITOS INICIALES PARA EL INGRESO AL PROTOCOLO DEL AÑO 2010 AL 2015 **72**
- GRÁFICO 6.- EVENTOS DE ALOINMUNIZACIÓN EN PACIENTE QUE PRESENTARON ANTICUERPOS ANTI DP. **73**
- GRÁFICO 7.- FRECUENCIA EN PORCENTAJE DE LAS ESPECIFICIDADES DE LOS ANTICUERPOS ANTI HLA-DP EN LA MUESTRA, N=100 **74**
- GRÁFICO 8.- PACIENTES QUE PRESENTARON PÉRDIDA TEMPRANA DEL INJERTO AGRUPADOS CON BASE EN SUS EVENTOS DE ALOINMUNIZACIÓN. **76**

RESUMEN

La insuficiencia renal crónica (IRC) es un proceso fisiopatológico multifactorial de carácter progresivo e irreversible que en la mayoría de los casos evoluciona hacia estadios terminales, en que el paciente requiere terapia de reemplazo renal (TRR).

La etiología en pacientes adultos sobresale la hipertensión arterial y la diabetes mellitus, mientras que en pacientes pediátricos se caracterizan por cursar con: glomerulonefritis, enfermedad renal evolutiva, causas congénitas hereditarias y adquiridas.

El tratamiento para dicha enfermedad se puede clasificar en:

- Tratamiento preventivo, el cual agrupa a la diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) y hemodiálisis.

- Tratamiento definitivo, el cual conlleva el trasplante renal.

En el trasplante renal, la tipificación de los antígenos HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos) en donante y receptor es obligatoria, dada la relación incuestionable entre su compatibilidad y la sobrevida del injerto, ya que a largo plazo la supervivencia del injerto (riñón) disminuye cuanto mayor es el número de incompatibilidades HLA.

Las etapas clínicas del rechazo que se pueden presentar en un paciente que no acepte el órgano son las siguientes:

- Rechazo hiperagudo: Ocurre dentro de los primeros minutos u horas de trasplante y es consecuencia de la rápida destrucción de la vascularización del tejido, es mediado por respuesta humoral.

- Rechazo agudo: Estas reacciones ocurren en un tiempo promedio de 6 meses después del trasplante y puede ser de tipo humoral o celular

Tras el trasplante renal, la aparición de anticuerpos anti-HLA específicos contra alguno de los antígenos del donante (Anticuerpos Donador Específico, ADE) es uno de los criterios, junto con los datos histológicos de la biopsia renal, para el

diagnóstico del rechazo mediado por anticuerpos o rechazo humoral, por lo que deben ser buscados específicamente en los pacientes en los que se sospeche dicho diagnóstico.

Los resultados iniciales observados en la sobrevida del injerto (riñón) realizando únicamente la tipificación de las moléculas más inmunogénicas llevaron a la exclusión del antígeno HLA-DP de la mayoría de los algoritmos de compatibilidad para el trasplante de riñón.

Los primeros estudios sugerían que las incompatibilidades en HLA-DP no afectaban de manera adversa la sobrevida del injerto, excepto probablemente en trasplantes y en pacientes altamente sensibilizados. Existe la evidencia de que los anticuerpos en contra HLA-DP pueden ser patogénicos.

De manera interesante las parejas donador –receptor con una compatibilidad en HLA-A, B, C, DR, DQ pueden desarrollar una incompatibilidad en HLA-DP, de esta manera se vuelve importante analizar el comportamiento de este antígeno en la población atendida para promover su tipificación en el esquema de trasplante renal.

La presente investigación se enfocó en un estudio retrospectivo en el que se recopilaron y analizaron datos obtenidos de pacientes que presentaron rechazo al trasplante renal, con el fin de establecer la implicación de anticuerpos anti HLA-DP donador específico en el rechazo o pérdida del injerto, detectados por la prueba del antígeno único, abarcando un periodo desde 2010 hasta 2015.

MARCO TEÓRICO.

GENERALIDADES DEL SISTEMA HLA

El sistema HLA, ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 humano, se encuentra dividido físicamente en tres regiones denominadas de Clase I, Clase II y Clase III.

Los loci correspondientes a la región de Clase I, contienen a los genes codificantes para las cadenas pesadas de moléculas clásicas del sistema HLA (HLA-A, -B,-C) y moléculas no clásicas (HLA-E,-F,G) además de moléculas como MICA y MICB, encargadas en la presentación de antígenos en todas las células nucleadas no profesionales llevando a cabo el proceso de inmunovigilancia.

La región de clase II contienen genes codificantes para las cadenas α y β de los cinco tipos de moléculas expresadas de clase II (HLA-DR,-DP,-DQ, -DM, -DO), así como proteínas involucradas en la generación de péptidos (LMP2 y LMP7) y proteínas de transporte de péptidos al retículo endoplásmico (TAP1, TAP2) para la creación de los complejos proteicos con moléculas del sistema HLA clase I.¹

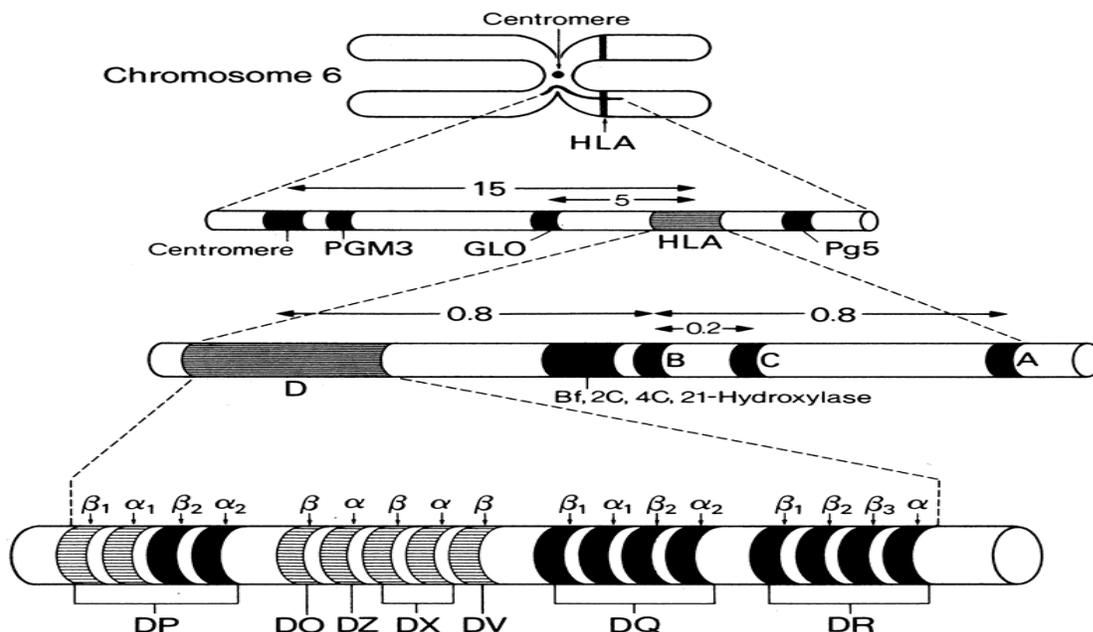


Figura 1. Organización genética del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el cromosoma 6. Muestra los loci relativos al sistema HLA.

Tomado de <http://80.36.73.149/almacen/medicina/ofthalmologia/enciclopedias/duane/pages/v8/v8c038.html>

La relevancia práctica del HLA se basa principalmente en aquellos loci cuyos productos génicos son proteínas heterodiméricas que se expresan en la superficie celular y juegan un papel crítico en el reconocimiento y en la respuesta inmune. Las estructuras de las proteínas de clase I y II están relacionadas, aunque tienen distintos componentes como se mencionan a continuación.

Antígenos HLA de Clase I

Las moléculas del HLA clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) son expresadas en prácticamente todas las células nucleadas, estas a menudo son referidas como antígenos clásicos del trasplante. Estos antígenos presentes en la superficie de la célula, son reconocidos por las células T y son los principales antígenos reconocidos por el receptor durante el rechazo al injerto en el trasplante. En la citotoxicidad mediada por células, la cual es la correlación experimental el rechazo al injerto, los antígenos de clase I son las moléculas blanco reconocidas por linfocitos T CD8²

El papel natural de las moléculas de clase I es la presentación antigénica de péptidos endógenos y péptidos virales de células infectadas (Fig 2). Cuando los linfocitos T son expuestos al antígeno viral que está expresado en la superficie de la célula infectada, reconocen el epítipo viral solamente cuando está asociado con una molécula de clase I. Los linfocitos son activados por una respuesta a un antígeno viral y son delimitados para matar solo a las células blanco que llevan el mismo antígeno asociado a la misma molécula de clase I presentada en la original, la célula infectada sensibilizada.³

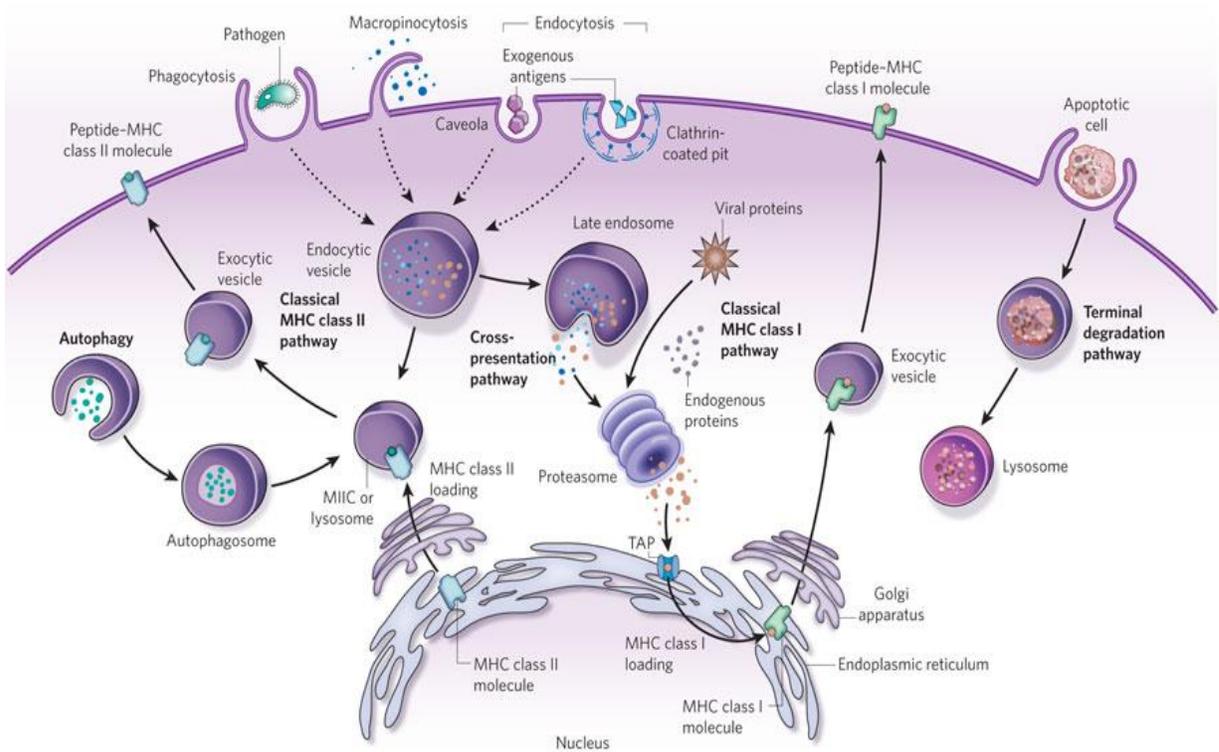


Figura 2. Procesamiento y presentación antigénica en moléculas MHC I y MHC II. Tomada de: <http://www.nature.com/nature/journal/v462/n7272/images/nature08604-f2.2.jpg>

En cuanto a las características de la estructura bioquímica de las moléculas de clase I sabemos que éstas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Incluidas en ésta familia se encuentran los anticuerpos, el receptor de células T (TCR), clusters de diferenciación (CD), las glicoproteínas asociadas de clase I, $\beta 2$ microglobulina, factores de crecimiento, y muchas otras moléculas de la superficie celular.

Las moléculas de clase I son heterodiméricas en la superficie celular (Fig. 3), consiste en una cadena pesada alfa glicoprotéica polimórfica, asociada de manera no covalente a una proteína no polimórfica llamada $\beta 2$ -microglobulina (la cual es codificada en el cromosoma 15).

Las moléculas de clase I están ancladas en la membrana celular en la capa bilipídica usando la cadena pesada para circular. Los péptidos unidos a las moléculas de Clase I son generalmente cortas, usualmente octámeros o

nonámeros. Estos son unidos por los extremos, con interacciones entre la molécula del MHC y el amino y carboxilo terminal del péptido. Las interacciones más importantes de la molécula del MHC son aquellas con las cadenas laterales del segundo amino ácido del péptido (referido como P2) y el amino ácido terminal.⁴

El gen codificante para las moléculas del HLA Clase I consiste en 7 exones. El segundo, tercero y cuarto exón corresponden al primer, segundo y tercer dominio de la cadena alfa, respectivamente.

Antígenos HLA Clase II

Las moléculas de Clase II a diferencia de las Clase I, son usualmente expresadas solo en células presentadoras de antígeno profesionales.

Estas moléculas están diseñadas para la captura y presentación de péptidos derivados de antígenos exógenos creados en el compartimiento endosomal de las células presentadoras de antígeno (Fig. 2).

La región del HLA Clase II codifica para tres principales glicoproteínas: HLA-DP, -DQ y -DR, cada una de las glicoproteínas de Clase II son heterodímero con una cadena alfa y una cadena beta asociadas no covalentemente (Fig3). Cada una de estas cadenas consiste en tres regiones, incluyendo una región extracelular hidrofílica, una región transmembranal hidrofóbica, y una región intracelular hidrofílica similar a la de otros miembros de la familia de las inmunoglobulinas.

La porción intracelular de la cadena alfa puede ser fosforilada para la transducción de señal. La región extracelular de la cadena alfa contiene dos dominios cada uno de los cuales tiene un sitio de unión para oligosacáridos, y el dominio alfa 2 tiene un puente disulfuro intracatenario.

La región extracelular de la cadena beta también contiene dos dominios, el primero una oligosacáridos y ambos dominios contienen puentes disulfuro intracatenarios. El segundo dominio extracelular de ambas cadenas alfa y beta

localizado más cerca de la membrana celular, muestra una homología significativa con los dominios de la región constante de las inmunoglobulinas.

Para hacer mención a los antígenos de clase II tenemos que HLA-DP, -DQ y DR son expresados en las células, también existen HLA-DO que está muy relacionada a las moléculas clásicas de Clase II pero muestra un polimorfismo muy limitado, y HLA- DMA y DMB están lejanamente relacionados y tienen relativamente poco polimorfismo.⁵

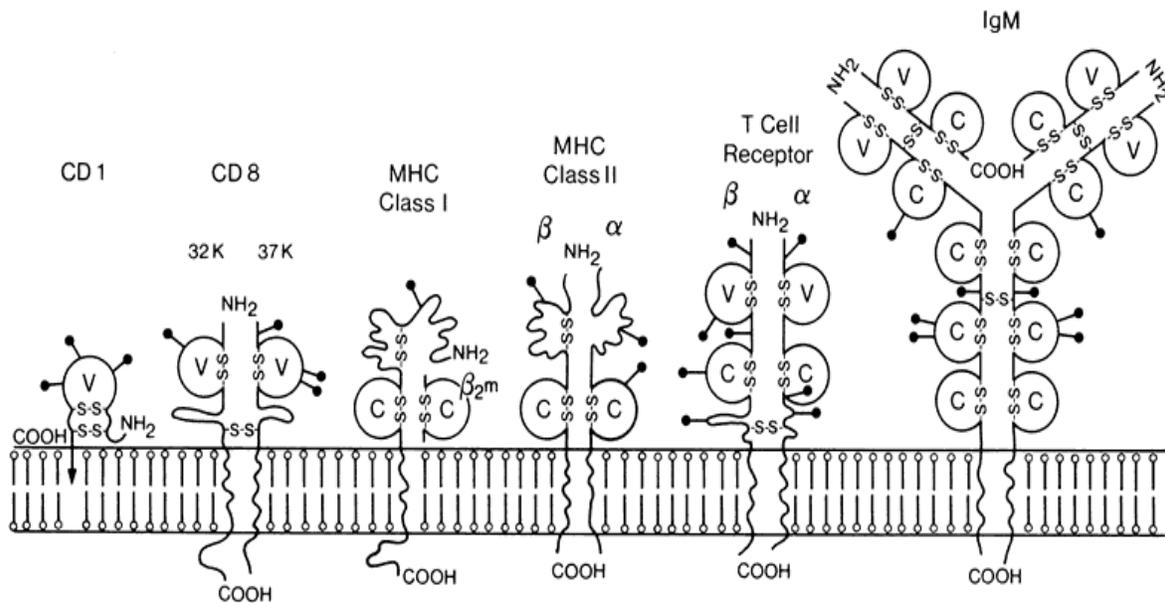


Figura 3. Estructura molecular de los antígenos de histocompatibilidad de Clase I y II en comparación con otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Puente disulfuro (s-s), región variable (V), región constante (C).

Tomada de: <http://80.36.73.149/almacen/medicina/ofthalmologia/enciclopedias/duane/pages/v8/v8c038.html>

El antígeno HLA-DP, como se mencionó, pertenece al grupo clase II del sistema HLA. Esta molécula es un heterodímero que consiste en una cadena α y una cadena β . El gen de la cadena alfa perteneciente a la molécula HLA-DP está codificada por 5 exones. El exón uno es codificante para el péptido líder, el exón dos y tres codifican para los dominios extracelular, el exón cuatro es codificable para el dominio transmembranal el residuo terminal citoplasmático.⁶

En cuanto a las características del gen, el de la cadena beta contiene seis exones con los mismos productos codificables que la cadena alfa para los cuatro primeros

exones a excepción de que el dominio terminal citoplasmático está codificado por el exón 5 para la cadena beta.

Ambas cadenas alfa y beta se anclan a la membrana de células presentadoras de antígeno, jugando un papel importante en el sistema inmune para la presentación de péptidos derivados de proteínas extracelulares.

Las moléculas HLA-DP, como las demás moléculas de clase II, están involucradas en la presentación de péptidos procesados de proteínas extracelulares endocitadas por células presentadoras de antígenos. Dichas proteínas son procesadas en los lisosomas para obtener el péptido y acoplarlo dentro de dicha vesícula, a la molécula clase II previamente formada en el retículo endoplásmico.⁷

Los linfocitos T CD4⁺ llevan a cabo el reconocimiento de un complejo formado por moléculas de clase II y los antígenos peptídicos, los loci del Sistema HLA de clase II mayormente descrito en éste reconocimiento son DR y DQ, para los cuales se han identificado y reportado cientos de epítopes de Células T. En cambio los epítopes del antígeno HLA- DP se han descrito muy poco debido a que la expresión de esta molécula en la superficie celular es 10 veces menor que las moléculas DR y DQ, lo que dificulta su extracción, purificación y caracterización.

Sin embargo en la literatura se ha indicado que HLA-DP codifica para moléculas completamente funcionales involucradas en la respuesta inmune de diversos contextos como cáncer, enfermedades infecciosas, respuesta en trasplante de órgano sólido, entre otros.

Son tan funcionales que tan solo en un episodio de rechazo al injerto estos antígenos HLA-DP son expresados en células de sangre periférica y células endoteliales principalmente, siendo los alelos DPB1*0401 y DPB1*0402 considerados los más frecuentes con una presencia en un tercio de la población en general.⁸

Nomenclatura del sistema HLA ^(9, 10)

En cuanto a la tipificación del sistema HLA un aspecto de suma importancia es la nomenclatura, pues esto conlleva la forma en la que se reportan los resultados obtenidos en las tipificaciones.

En la actualidad hay en uso dos formas de nomenclatura HLA: Serológica: establecida en 1975 y modificada en 1984, se basa en las especificidades de los productos de los genes HLA definidos por técnicas inmunológicas, serológicas o celulares. Y encontramos la nomenclatura molecular basada en los alelos definidos por secuenciación.

Las técnicas serológicas y celulares son técnicas inmunológicas que detectan determinantes de los productos genéticos del HLA se definen grupos de alelos más que alelos individuales.

En la nomenclatura molecular cada alelo tiene un número correspondiente único, el tamaño de la designación alélica depende mucho de la secuencia del alelo. Todos los alelos reciben por lo menos un nombre de cuatro dígitos.

En 2010, se aprobó un nuevo sistema de nomenclatura. Este introdujo dos puntos ':' como separadores entre pares de dígitos. HLA-A*02010102L, por tanto, se convirtió en HLA-A*02:01:01:02 L. Los pares de dígitos separados por dos puntos son conocidos como campos. Los dígitos primeros y segundo de la antigua nomenclatura forman el primer campo de la nueva nomenclatura. El dígito tercero y cuarto de la antigua nomenclatura forman el segundo campo de la nueva nomenclatura. Para ayudar a reducir la confusión en la adopción de la nueva nomenclatura, se mantuvo el '0' en alelos 1-9 de cada grupo de alelo.

La introducción de los dos puntos significa que cada campo ya no está limitado a 99 dígitos sino que se puede expandir infinitamente. Una vez HLA-A*03:99 sea identificado, el alelo A3 siguiente podría llamarse HLA-A*03:100.

Con la introducción de (:) dos puntos y con la eliminación de la restricción artificial de 99 dígitos, HLA-A*92 y B*95 fueron renombrados A*02 y B*15 respectivamente

y sus alelos asociados fueron re-mapeados. El A*9201 se convirtió en A*02:101. El A*9202 en A*02:102 etc. HLA-B*9501 se convirtió en B*15:101. HLA-B*9502 se convirtió en B*15:102 etc. HLA-A*02:100 y B*15:100 no fueron utilizados para ayudar a hacer más fácil la reasignación. Sin embargo, otros tipos HLA que excedían los 99 alelos utilizarán alelo 100.

También se renombraron los alelos de DPB1, por lo que DPB1*0102 se convirtió en DPB1*100:01; DPB1*0203 en DPB1*101:01; DPB1*0302 en DPB1*102:01; y otros.

Los dígitos antes del punto y coma describen el tipo, que a menudo corresponde con el antígeno serológico realizado por un alotipo.

La siguiente serie de dígitos se utiliza para enumerar los subtipos, los números se asignan en el orden en que se han determinado las secuencias de ADN. Los alelos cuyos números difieren en los dos conjuntos de dígitos deben diferir en una o más sustituciones de nucleótidos que cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

Los alelos que se diferencian sólo por sustituciones de nucleótidos sinónimas (también llamados sustituciones silenciosas o no codificantes) dentro de la secuencia de codificación se distinguen por el uso de la tercera serie de dígitos.

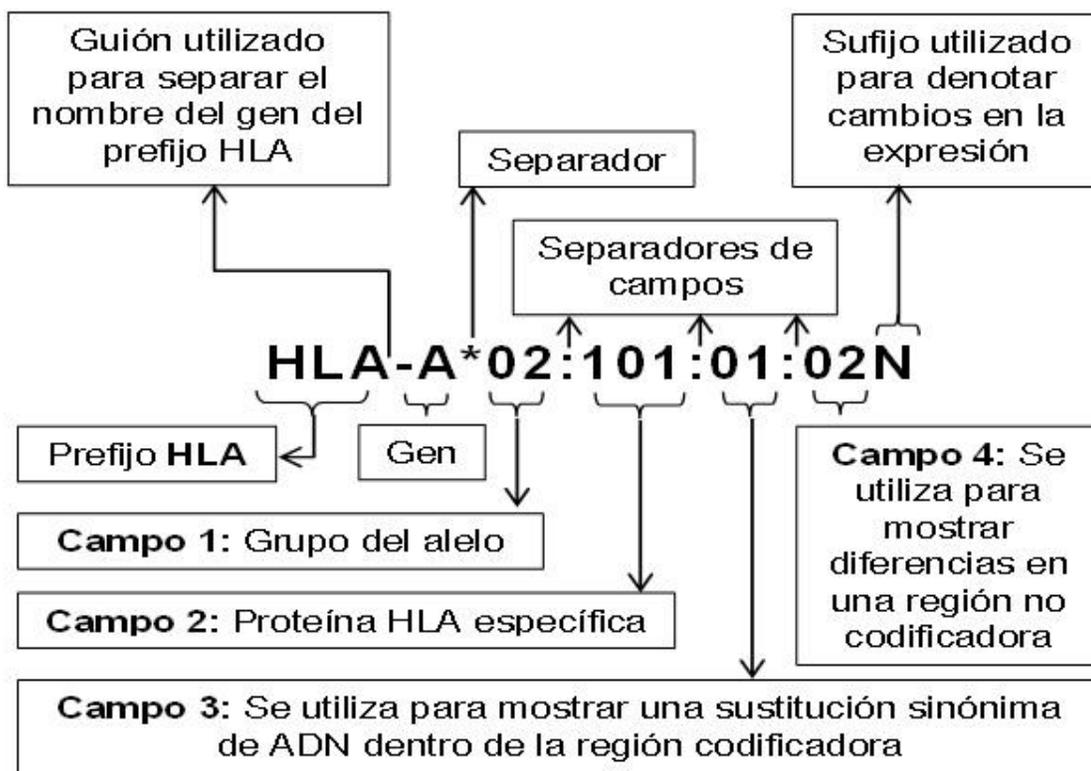
Los alelos que sólo difieren en la secuencia de polimorfismos en los intrones, o en las regiones no traducidas 5' o 3' que flanquean los exones e intrones, se distinguen por el uso del cuarto conjunto de dígitos.

Además del número de alelo único, hay sufijos opcionales adicionales que pueden añadirse a un alelo para indicar su estado de expresión. Los alelos que han demostrado no ser expresados - 'N ULL' - alelos se les ha dado el sufijo 'N'. Los alelos que se han demostrado que se expresa alternativamente pueden tener el sufijo 'L', 'S', 'C', 'A' o 'Q'.

El sufijo 'L' se utiliza para indicar un alelo que se ha demostrado que tienen baja (Low) expresión en la superficie celular' en comparación con los niveles

normales. La 'S' sufijo se utiliza para denotar un alelo especificando una proteína que se expresa como una molécula soluble excretada, pero no está presente en la superficie celular. El 'C' sufijo "se asigna a los alelos que producen proteínas que están presentes en el citoplasma y no en la superficie celular. Un sufijo A indica una expresión aberrante donde hay alguna duda en cuanto a si una proteína se expresa en realidad. Q sufijo se utiliza cuando la expresión de un alelo es cuestionable, dado que la mutación en el alelo visto se ha demostrado que afectan a los niveles de expresión normales en otros alelos.

Figura 4.- Nomenclatura actual sistema HLA



Tomado de: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/viewFile/125/99/1102>

A su vez para el reporte de cadenas de alelo ambiguas, se introdujeron los códigos P y G.

Código G

Alelos HLA que tienen secuencias de nucleótidos idénticas a través de los exones que codifican los dominios de unión al péptido (exón 2 y 3 de HLA de clase I y el exón 2 para los alelos HLA clase II), serán designados por una caja superior G que sigue a los primeros tres campos del alelo con la designación numérica más baja en el grupo. La designación de grupo contendrá un mínimo de 6 dígitos.

Código P

Aplica a todas las secuencias de HLA que tienen los mismos dominios de unión al antígeno. Este análisis se realiza en la secuencia de la proteína, y para los alelos HLA de clase I, la identidad en los dominios de unión a antígeno se basa en las secuencias de proteínas idénticas como codificado por los exones 2 y 3. En los alelos HLA de clase II se basa en secuencias proteicas idénticas codificadas por el exón 2. Entonces los alelos HLA que tienen secuencias de nucleótidos que codifican la misma secuencia de proteína para los dominios de unión al péptido serán designados por una caja superior P que sigue a la designación del segundo campo del alelo de número más bajo en el grupo. La designación de grupo contendrá un mínimo de cuatro dígitos.

De esta manera alelos como HLA-DP que contiene un gran polimorfismo en el exón dos de la cadena HLA-DPB1, son más frecuentes de reportar en grupo G o P dependiendo de las limitaciones de la técnica usada para su tipificación.

Con la información proporcionada por la Asociación Mundial del Donante de Médula Ósea (WMDA) se puede obtener una tabla como la siguiente para apoyo en la tipificación de antígenos HLA, en específico HLA-DP

**Cuadro 1. Tablas de la agrupación G HLA-DP usadas en el Lab. HLA BCS
CMNSXXI**

HLA DP "G" Group

DPA1*01:03:01G	01:03:01:01/01:03:01:02/01:03:01:03/01:03:01:04/01:03:01:05/01:03:05
DPA1*02:02:02G	02:02:02/02:06
DPA1*01:03:01G	01:03:01:01/01:03:01:02/01:03:01:03/01:03:01:04/01:03:01:05/01:03:06
DPA1*02:02:02G	02:02:02/02:07
DPA1*01:03:01G	01:03:01:01/01:03:01:02/01:03:01:03/01:03:01:04/01:03:01:05/01:03:07
DPA1*02:02:02G	02:02:02/02:08
DPA1*01:03:01G	01:03:01:01/01:03:01:02/01:03:01:03/01:03:01:04/01:03:01:05/01:03:08
DPA1*02:02:02G	02:02:02/02:09
DPA1*01:03:01G	01:03:01:01/01:03:01:02/01:03:01:03/01:03:01:04/01:03:01:05/01:03:09
DPA1*02:02:02G	02:02:02/02:10
DPA1*01:03:01G	01:03:01:01/01:03:01:02/01:03:01:03/01:03:01:04/01:03:01:05/01:03:10
DPA1*02:02:02G	02:02:02/02:11
DPA1*01:03:01G	01:03:01:01/01:03:01:02/01:03:01:03/01:03:01:04/01:03:01:05/01:03:11
DPA1*02:02:02G	02:02:02/02:12
DPA1*01:03:01G	01:03:01:01/01:03:01:02/01:03:01:03/01:03:01:04/01:03:01:05/01:03:12
DPB1*01:01:01G	01:01:01/417:01/462:01
DPB1*01:01:02G	01:01:02/162:01
DPB1*02:01:02G	02:01:02/141:01/352:01/414:01/416:01/461:01
DPB1*03:01:01G	03:01:01/03:01:08/104:01/124:01/351:01
DPB1*04:01:01G	04:01:01:01/04:01:01:02/04:01:31/126:01/350:01/415:01/459:01/464:01/534:01
DPB1*04:02:01G	04:02:01:01/04:02:01:02/105:01/463:01
DPB1*05:01:01G	05:01:01/05:01:02/05:01:07/135:01
DPB1*13:01:01G	13:01:01/107:01/133:01/518:01/519:01
DPB1*14:01:01G	14:01:01/498:01
DPB1*17:01:01G	17:01/131:01/168:01/460:01
DPB1*19:01:01G	19:01/106:01/533:01/535:01
DPB1*23:01:01G	23:01:01/138:01
DPB1*28:01:01G	28:01/296:01

Cuadro 2. Tablas de la agrupación P HLA-DP usadas en el Lab. HLA BCS CMNSXXI

HLA DP "P" Group

DPA1*01:03P	<i>DPA1*01:03:01:01/DPA1*01:03:01:02/DPA1*01:03:01:03/DPA1*01:03:01:04/DPA1*01:03:01:05/DPA1*01:03:02/DPA1*01:03:03/DPA1*01:03:04/DPA1*01:03:05</i>
DPA1*01:06P	<i>DPA1*01:06:01/DPA1*01:06:02</i>
DPA1*02:01P	<i>DPA1*02:01:01:01/DPA1*02:01:01:02/DPA1*02:01:02/DPA1*02:01:03/DPA1*02:01:04/DPA1*02:01:05/DPA1*02:01:06/DPA1*02:01:07/DPA1*02:01:08</i>
DPA1*02:02P	<i>DPA1*02:02:01/DPA1*02:02:02/DPA1*02:02:03/DPA1*02:02:04/DPA1*02:02:05/DPA1*02:02:06/DPA1*02:06</i>
DPB1*01:01P	<i>DPB1*01:01:01:01/DPB1*01:01:02/DPB1*01:01:03/DPB1*01:01:04/DPB1*01:01:05/DPB1*01:01:06/DPB1*162:01/DPB1*417:01/DPB1*462:01</i>
DPB1*02:01P	<i>DPB1*02:01:02/DPB1*02:01:03/DPB1*02:01:04/DPB1*02:01:05/DPB1*02:01:06/DPB1*02:01:07/DPB1*02:01:08/DPB1*02:01:09/DPB1*02:01:10/DPB1*02:01:11/DPB1*02:01:12/DPB1*02:01:13/DPB1*02:01:14/DPB1*02:01:15/DPB1*02:01:16/DPB1*02:01:17/DPB1*02:01:18/DPB1*141:01/DPB1*352:01/DPB1*414:01/DPB1*416:01/DPB1*461:01</i>
DPB1*03:01P	<i>DPB1*03:01:01/DPB1*03:01:02/DPB1*03:01:03/DPB1*03:01:04/DPB1*03:01:05/DPB1*03:01:06/DPB1*03:01:07/DPB1*03:01:08/DPB1*104:01/DPB1*124:01/DPB1*351:01</i>
DPB1*04:01P	<i>DPB1*04:01:01:01/DPB1*04:01:01:02/DPB1*04:01:02/DPB1*04:01:03/DPB1*04:01:04/DPB1*04:01:05/DPB1*04:01:06/DPB1*04:01:07/DPB1*04:01:08/DPB1*04:01:09/DPB1*04:01:10/DPB1*04:01:11/DPB1*04:01:12/DPB1*04:01:13/DPB1*04:01:14/DPB1*04:01:15/DPB1*04:01:16/DPB1*04:01:17/DPB1*04:01:18/DPB1*04:01:19/DPB1*04:01:20/DPB1*04:01:21/DPB1*04:01:22/DPB1*04:01:23/DPB1*04:01:24/DPB1*04:01:25/DPB1*04:01:26/DPB1*04:01:27/DPB1*04:01:28/DPB1*04:01:29/DPB1*04:01:30/DPB1*04:01:31/DPB1*126:01/DPB1*350:01/DPB1*415:01/DPB1*459:01/DPB1*464:01/DPB1*534:01</i>
DPB1*04:02P	<i>DPB1*04:02:01:01/DPB1*04:02:01:02/DPB1*04:02:02/DPB1*04:02:03/DPB1*04:02:04/DPB1*04:02:05/DPB1*04:02:06/DPB1*04:02:07/DPB1*04:02:08/DPB1*105:01/DPB1*463:01</i>
DPB1*05:01P	<i>DPB1*05:01:01/DPB1*05:01:02/DPB1*05:01:03/DPB1*05:01:04/DPB1*05:01:05/DPB1*05:01:06/DPB1*05:01:07/DPB1*135:01</i>
DPB1*09:01P	<i>DPB1*09:01:01/DPB1*09:01:02/DPB1*09:01:03/DPB1*09:01:04</i>
DPB1*10:01P	<i>DPB1*10:01:01/DPB1*10:01:02</i>
DPB1*11:01P	<i>DPB1*11:01:01/DPB1*11:01:02/DPB1*11:01:03/DPB1*11:01:04</i>
DPB1*13:01P	<i>DPB1*13:01:01/DPB1*13:01:02/DPB1*107:01/DPB1*133:01/DPB1*518:01/DPB1*519:01</i>
DPB1*14:01P	<i>DPB1*14:01:01/DPB1*14:01:02/DPB1*14:01:03/DPB1*498:01</i>
DPB1*15:01P	<i>DPB1*15:01:01/DPB1*15:01:02</i>
DPB1*16:01P	<i>DPB1*16:01:01/DPB1*16:01:02</i>
DPB1*17:01P	<i>DPB1*17:01/DPB1*131:01/DPB1*168:01/DPB1*460:01</i>
DPB1*19:01P	<i>DPB1*19:01/DPB1*106:01/DPB1*533:01/DPB1*535:01</i>
DPB1*20:01P	<i>DPB1*20:01:01/DPB1*20:01:02/DPB1*20:01:03</i>
DPB1*23:01P	<i>DPB1*23:01:01/DPB1*23:01:02/DPB1*138:01</i>
DPB1*26:01P	<i>DPB1*26:01:01/DPB1*26:01:02</i>
DPB1*28:01P	<i>DPB1*28:01/DPB1*296:01</i>
DPB1*35:01P	<i>DPB1*35:01:01/DPB1*35:01:02</i>
DPB1*41:01P	<i>DPB1*41:01:01/DPB1*41:01:02</i>
DPB1*46:01P	<i>DPB1*46:01:01/DPB1*46:01:02</i>
DPB1*155:01P	<i>DPB1*155:01:01/DPB1*155:01:02</i>
DPB1*236:01P	<i>DPB1*236:01:01/DPB1*236:01:02</i>
DPB1*348:01P	<i>DPB1*348:01:01/DPB1*348:01:02</i>
DPB1*354:01P	<i>DPB1*354:01:01/DPB1*354:01:02</i>

INMUNIDAD EN EL RECHAZO AL TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO.

El rechazo es un proceso complejo en donde hay una intervención tanto de la inmunidad celular como de la inmunidad humoral. Además, las contribuciones de estos mecanismos varían según el injerto y en muchas veces quedan reflejadas en las características histológicas de los órganos rechazados.

En el trasplante la diferencia entre lo propio y lo extraño está mayormente delimitada por la expresión de los antígenos del sistema HLA, de igual manera estos antígenos inducen en el receptor de un trasplante una respuesta inmune que dependiendo de la intensidad determinará algún tipo de rechazo con diferentes mecanismos involucrados que a continuación se mencionan.

En las reacciones mediadas por las células T, la destrucción del injerto se debe aparentemente tanto a la activación de los Linfocitos T Citotóxicos (LTC) $CD8^+$ como a las reacciones de hipersensibilidad retardada desencadenadas por las células $CD4^+$ cooperadoras. La reacción mediada por las células T se inicia cuando los linfocitos del receptor encuentran los antígenos HLA del donante. Se cree que las células dendríticas intersticiales transportadas por los órganos donantes son los inmunógenos más importantes. Las células dendríticas son encontradas por las células T del huésped en el propio órgano injertado, o bien cuando migran hacia los ganglios linfáticos de drenaje.

La identificación de las especificidades de clase II desencadena la proliferación de la subpoblación T colaboradora $CD4^+$. Al mismo tiempo, los precursores de los LTC $CD8^+$, que tienen receptores para los antígenos HLA de clase I, se diferencian hacia LTC maduros. Participan en el mismo las interacciones de las células presentadoras de antígeno, las subpoblaciones T y la liberación de citocinas, como la IL-2, la IL-4 y la IL-5 (Fig4).

Una vez formados los LTC efector, pueden lisar el tejido injertado. Además de las células T citotóxicas específicas, se forman también células T $CD4^+$ secretoras de citocinas por sensibilización; se cree que estas células desempeñan un papel muy importante en el rechazo de los injertos. Al igual que en las reacciones de

hipersensibilidad retardada, las citocinas procedentes de las células T CD4⁺ activadas incrementan la permeabilidad vascular y favorecen la acumulación local de células mononucleares. Algunos investigadores mencionan que la hipersensibilidad retardada junto con la lesión microvascular, isquemia tisular y destrucción mediada por macrófagos atraídos a la zona, es el mecanismo más importante en el rechazo de los trasplantes.¹¹

Sin embargo las diferencias en la naturaleza del HLA del binomio donador-receptor parecen mediar de mayor forma en la citotoxicidad ocasionada por las células T CD8⁺ y las reacciones llevadas a cabo las células T CD4⁺.

La manera en la que las células T llevan a cabo el alorreconocimiento no ha sido descrita completamente en sus bases moleculares. Dos mecanismos posibles se han propuesto. Las moléculas del sistema HLA extrañas al ser desprendidas de la superficie celular de las células donantes serían procesadas por las células presentadoras de antígeno del huésped y los péptidos así formados serían presentados en moléculas MHC propias.

De manera alternativa las células T del huésped reconocerían péptidos en la hendidura de las alo-moléculas del MHC iniciando el alorreconocimiento que derivaría en un rechazo del injerto.

Reacciones mediadas por anticuerpos

Por lo descrito anteriormente no existe hoy en día duda alguna de que las células T juegan un papel esencial en el rechazo de los órganos trasplantados, sin embargo dicho rechazo puede también ser mediado por la presencia de anticuerpos. El rechazo mediado por estos anticuerpos puede adoptar dos mecanismos: el primero causado por anticuerpos preformados en el receptor debido a eventos aloinmunizantes como un trasplante previo, mujeres multíparas que crean anticuerpos anti-HLA frente a los antígenos paternos desprendidos del feto, y las transfusiones sanguíneas de donantes no HLA idénticos.

El segundo mecanismo consta de los casos en el que los receptores no han sido sensibilizados a los antígenos del trasplante, las moléculas HLA de Clase I y Clase II son capaces de iniciar una respuesta inmune, la cual derive en la producción de novo de anticuerpos dirigidos (Fig. 4).

En cualquiera de los casos descritos el rechazo se origina inmediatamente después del injerto, debido a que los anticuerpos preformados reaccionan rápidamente con los antígenos depositándose en el endotelio vascular del órgano injertado. Se produce fijación del complemento y se produce una reacción de tipo Arthus.

Los anticuerpos así formados pueden mediar el rechazo por diferentes mecanismos tales como citotoxicidad dependiente de anticuerpos y depósitos de complejos antígeno-anticuerpo.

El sistema vascular del injerto parece ser el objetivo inicial en el rechazo ya que es donde se produce una mayor fijación de los complejos antígeno-anticuerpo. De manera histológica se puede apreciar dicha vasculitis, la cual recibe el nombre de "vasculitis del rechazo".

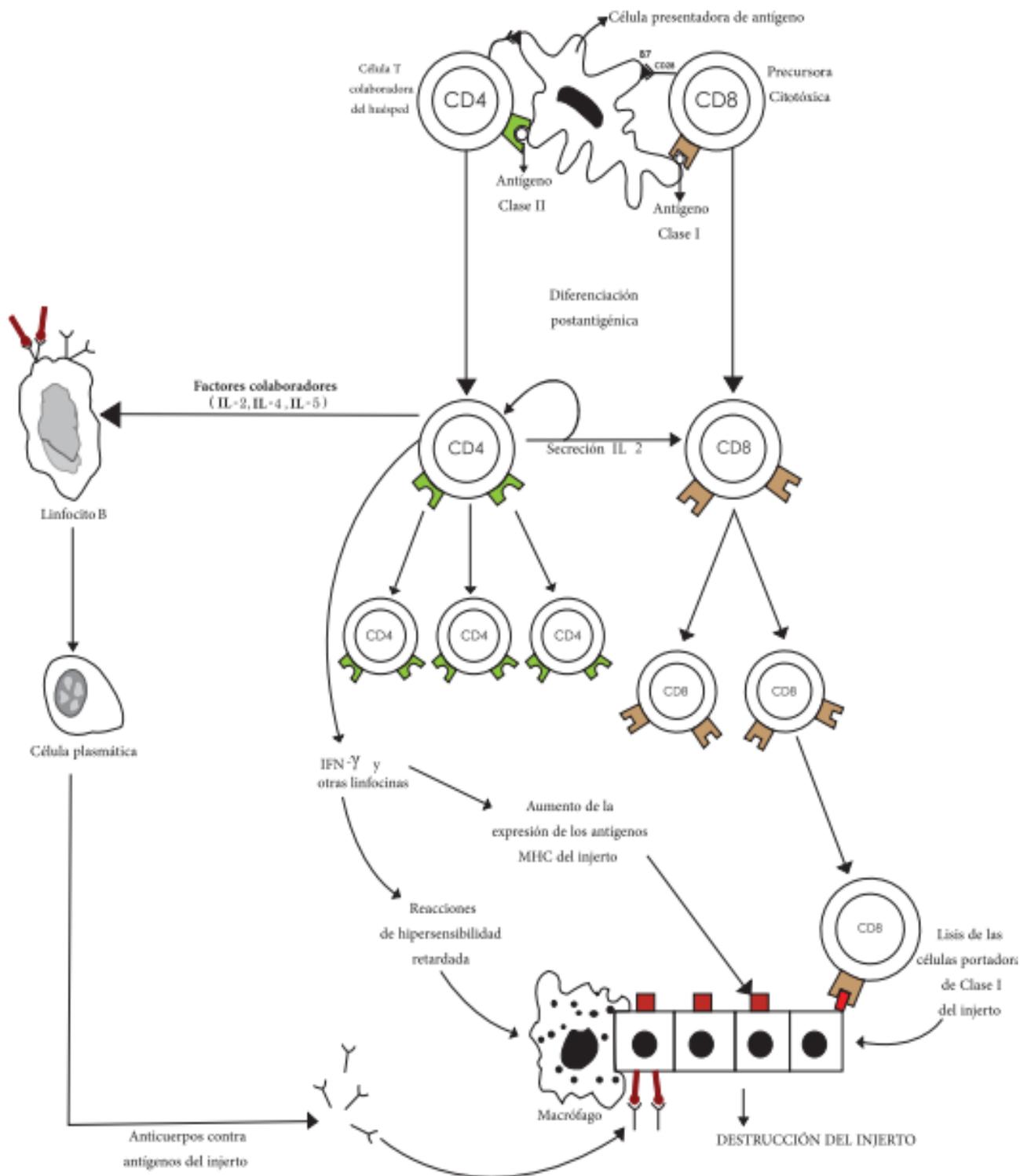


Figura 4. Mecanismo del rechazo al injerto en trasplante de órgano sólido. Esquema simplificado de los mecanismos de rechazo humoral y celular al injerto de órgano sólido.

De manera general el rechazo al injerto puede clasificarse de la siguiente manera considerando la morfología y los mecanismos subyacentes.

Rechazo hiperagudo.

Este tipo de rechazo ocurre de manera inmediata, la respuesta inmunitaria presente es la más agresiva y destructiva y presentándose en cuestión de minutos a horas, mediado principalmente por la presencia de anticuerpos clase IgG (subclase 1 y 3) preformados por eventos allosensibilizantes con especificidad por antígenos del donador.

Estos anticuerpos fijadores de complemento se unen al endotelio vascular, generando su destrucción y derivando en una oclusión trombótica de la vasculatura del injerto.

Rechazo Agudo.

El rechazo agudo es un proceso de lesión vascular y parenquimatosa en el que hay una intervención de linfocitos T y anticuerpos. Este tipo de rechazo suele iniciarse después de la primera semana de trasplante.

En el caso de un rechazo agudo al injerto de riñón las células endoteliales son las primeras dianas del sistema inmune.

Como ya se señaló, la lesión vascular característica presentada es la vasculitis del rechazo.

La vasculitis aguda del rechazo es la forma representativa del rechazo humoral. Se produce durante los primeros meses después de la intervención o al interrumpir el tratamiento inmunosupresor. Las principales lesiones se llevan a cabo en la capa íntima de la pared arterial, en donde se encuentra infiltración de neutrófilos y células mononucleares así como depósitos de inmunoglobulina y complemento en la pared de los vasos.

Rechazo crónico

Este rechazo se caracteriza por la presencia de fibrosis y alteraciones vasculares que derivan en la pérdida de la función de un injerto, esto está dado en un lapso de tiempo prolongado. En la mayoría de los injertos extirpados de trasplante renal, se encuentran características de rechazo crónico.

La fibrosis presente en este tipo de rechazo es debido a reacciones inmunitarias como la presencia de ciertas citocinas, además de la cicatrización tras la necrosis parenquimatosa que pudo haber ocurrido durante el rechazo agudo.

En este rechazo se caracteriza el crecimiento de la musculatura lisa de la íntima, provocando una arteriosclerosis acelerada.¹²

Entre las principales características clínicas de los pacientes que presentan dicho rechazo en el injerto renal, se encuentra una elevación progresiva de las concentraciones de creatinina en suero a lo largo de un periodo de 4 a 6 meses.

Las lesiones vasculares en este tipo de rechazo derivan en una isquemia renal paulatina. Además de los daños vasculares, en el injerto renal, los riñones de rechazo crónico suelen mostrar infiltrados inflamatorios con alto contenido en eosinófilos y células plasmáticas, estos descubrimientos sugieren un mecanismo de rechazo crónico mediado por células. Sin embargo no hay una descripción de los mecanismos patogénicos involucrados en el rechazo crónico ya que este involucra procesos más complejos que los presentados en la forma aguda.

CLASIFICACIÓN BANFF DEL RECHAZO AL INJERTO RENAL.

Ésta clasificación está dada para la disfunción en el injerto renal y se usa muy comúnmente para el diagnóstico del rechazo con base en una biopsia del injerto.

Las principales causas de disfunción en ésta primera fase incluyen rechazo agudo, trombosis y necrosis tubular aguda, entre otras.

En la patogénesis del trasplante renal existen diversos factores tanto inmunológicos, como los ya mencionados, y no inmunológicos. Entre los factores no inmunológicos sobresalen factores propios del donante, (incluyendo la calidad del tejido renal), toxicidad por medicamentos, las alteraciones obstructivas entre otros.

En el siguiente cuadro se muestra la clasificación de Banff, la cual es una clasificación morfológica del rechazo al injerto renal.

Cuadro 3. Clasificación Banff con base en las características presentadas en la biopsia del injerto renal. ¹³

Categorías diagnósticas de Banff para las biopsias del injerto renal
1.- Normal
2.- Cambios mediados por anticuerpos -Debe documentarse presencia de anticuerpos contra el donante y C4d o patología del injerto Depósitos de C4d sin evidencia de rechazo activo. Rechazo agudo mediado por anticuerpos Sospechoso para rechazo mediado por anticuerpos (AMR) si C4d ⁺ (en presencia de anticuerpos) o si no se demuestran aloanticuerpos (y C4d ⁺) en presencia de evidencia morfológica de daño tisular. C4d ⁺ , presencia de anticuerpos antidonante circulantes, evidencia morfológica de

lesión tisular aguda, tal como **(tipo/grado)**:

- I. Lesiones similares a necrosis tubular aguda, inflamación mínima.
- II. Inflamación capilar o glomerular (antes denominada marginación capilar) (ptc/g > 0) y/o trombosis, C4d⁺
- III. Lesiones arteriales v3 (necrosis fibrinoide o inflamación transmural)

Rechazo crónico activo mediado por anticuerpos

Sospechoso para rechazo mediado por anticuerpos (AMR) si C4d⁺ (en presencia de anticuerpos) o si no se demuestran aloanticuerpos (y C4d⁺) en presencia de evidencia morfológica de daño tisular.

-C4d⁺, presencia de anticuerpos antidonante circulantes, evidencia morfológica de lesión tisular crónica tales como doble contornos en paredes de capilares glomerulares (cg1, cg2 ó cg3) y/o multilaminación de las membranas basales de capilares peritubulares y/o fibrosis intersticial/atrofia tubular y/o engrosamiento intimal fibroso en arterias.

3.- Cambios limítrofes (“borderline”): “sospechosos” de rechazo agudo mediado por células T

-No hay arteritis intimal pero hay focos de tubulitis (t1, t2, t3) con mínima inflamación intersticial (i0, i1), o hay inflamación intersticial (i2,i3) con tubulitis leve (t1).

4. Rechazo mediado por células T

-Rechazo agudo mediado por células T (hasta hace poco llamado: Rechazo celular agudo/activo)

Tipo/grado

- IA. Inflamación intersticial > 25% (i2 ó i3) y focos de tubulitis moderada: t2
- IB. Inflamación intersticial > 25% (i2 ó i3) y focos de tubulitis severa: t3
- IIA. Arteritis (endarteritis) intimal leve a moderada: V1
- IIB. Arteritis (endarteritis) intimal severa, obstruyendo más del 25% de su luz: V2
- III. Arteritis transmural o necrosis fibrinoide de la pared arterial acompañada de inflamación linfocítica: V3

Rechazo crónico activo mediado por células T

Arteriopatía crónica del injerto (fibrosis intimal arterial con infiltración de células mononucleares en la fibrosis, formación de neoíntima)

5.- Fibrosis intersticial y atrofia tubular, sin evidencia de etiología específica (hasta hace poco llamada: Nefropatía crónica esclerosante del injerto)

Puede incluir esclerosis vascular o glomerular inespecíficas, pero la severidad se gradúa de acuerdo con las lesiones crónicas tubulointersticiales.

- I (leve): Fibrosis intersticial y atrofia tubular leve (6-25% de fibrosis intersticial en el área cortical Ci1).
- II (moderado): Fibrosis intersticial y atrofia tubular moderadas (26-50%).
- III (severo): Fibrosis intersticial y atrofia tubular severos (>50%)

6. Otros

Cambios que no se consideran debidos a rechazo. Pueden incluir lesiones g, cg ó cv aisladas y coincidir con categorías 2,3,4 y 5

- Enfermedades linfoproliferativas
- Cambios inespecíficos: Inflamación intersticial sin tubulitis, cambios vasculares

reactivos, venulitis)

-Necrosis tubular aguda

-Nefritis intersticial aguda

-Toxicidad por medicamentos

-Infecciones

Enfermedad glomerular recurrente o de novo

-Obstrucción/reflujo

-Lesiones por preservación/ reperfusión

-Otras

GENERALIDADES DEL ÓRGANO SÓLIDO RIÑÓN.

Generalidades del órgano sólido riñón

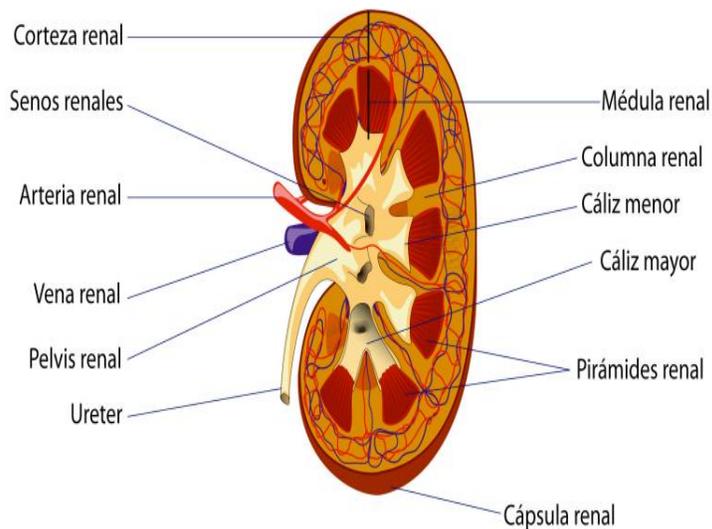
El riñón es un órgano encargado de diversas funciones, entre las que destacan su función depuradora, de regulación hidroelectrolítica y regulación ácido-base, así como funciones hormonales y metabólicas.

La principal función del riñón es la de mantener el ambiente interno a través de la excreción de productos de desecho y la regulación del volumen, contenido de electrolitos y pH del líquido extracelular a pesar de la ingesta alimentaria variable y las demandas ambientales cambiantes.

El riñón es el encargado de la producción de orina mediante el filtrado glomerular y la reabsorción y secreción tubular. En el transporte tubular intervienen varias proteínas distribuidas a lo largo de los diferentes fragmentos del túbulo, volviendo éste transporte selectivo para los diferentes solutos. La regulación del volumen extracelular y la excreción de sodio está regulada en el riñón por principalmente

cuatro factores que se activan por sensibilidad en los cambios de volumen: el sistema simpático, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA-aldosterona), el péptido natriurético atrial (ANP) y la hormona antidiurética (ADH).¹⁴

El riñón participa en el metabolismo y eliminación de algunas hormonas como la insulina, glucagón, cortisol, catecolaminas, somatotropina y prolactina. El riñón transforma la vitamina D inactiva ($25(\text{OH})\text{D}_3$) en su metabolito activo o calcitriol ($1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$).



Cada riñón se compone de una corteza externa, médula interna y una pelvis hueca la cual confluye en el uréter. La nefrona es la unidad funcional de dicho órgano, es muy variable la cantidad de nefronas que componen a cada riñón, pero hay en promedio 1.4×10^6 nefronas por riñón.

Figura 5. Anatomía del riñón.

Fuente: http://www.elmodernoprometeo.es/Sitio_web/Anatomia_files/urinario.pdf

FISIOPATOLOGÍA DEL RIÑÓN.

Enfermedad Renal Crónica

De manera general se define como la pérdida progresiva, generalmente irreversible, de la tasa de filtración glomerular que se traduce en un conjunto de síntomas y signos denominados uremia y que en su estadio terminal es incompatible con la vida.

Por definición la Enfermedad Renal Crónica (ERC) es la disminución de la función renal, expresada por una tasa de filtración glomerular (TFG) $<60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ o como la presencia de daño renal (alteraciones histológicas, albuminuria-proteinuria, alteraciones del sedimento urinario o en pruebas de imagen) de forma persistente durante al menos 3 meses.¹⁵

La insuficiencia renal crónica es un problema de salud pública a nivel mundial, el número de pacientes va en aumento tanto en países desarrollados como en desarrollo. Como consecuencia cada vez es mayor la necesidad de recurrir a procedimientos de diálisis y/o trasplante renal y por lo tanto aumenta progresivamente el costo de atención.

Cuadro 4. Factores de Riesgo para desarrollo de ERC: de susceptibilidad, inicio y progresión.

De susceptibilidad	De inicio	De progresión
Mayor Edad (> 60 años). Historia Familiar de ERC. Grupo étnico. Género masculino. Síndrome metabólico. Reducción de la masa renal. Bajo nivel socioeconómico y educación. Estados de hiperfiltración Disminución del número de nefronas. Tensión arterial >125/75. Obesidad. Ingesta elevada de proteínas. Anemia. Aumento de excreción urinaria de proteínas. Dislipidemia.	Enfermedades Renales primarias. Diabetes Mellitus. Hipertensión arterial sistémica. Enfermedades autoinmunes. Nefrotoxinas AINES. Aminoglucósidos. Medio de Contraste IV Otros. Patologías urológicas Obstrucción urinaria. Litiasis urinaria. Infección urinaria recurrente. Enfermedades hereditarias.	Proteinuria TAS >130 mm Hg. Alta ingesta de proteínas. Pobre control de la glucosa Obesidad. Anemia. Dislipidemia.

Fuente: Guía de Referencia rápida para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad Renal Crónica Temprana. Consejo de Salubridad de Salud. .¹⁶

En México la ERC es una de las principales causas de atención en hospitalización y en los servicios de urgencias, considerándose una enfermedad catastrófica debido al número creciente de casos, altos costos de inversión, recursos de infraestructura y capital humanos limitados, la detección tardía y altas tasas de morbilidad y mortalidad en programas de sustitución.

Clasificación

La clasificación de ERC se realiza considerando la presencia de daño renal o una TFG disminuida, en cuanto menos 2 determinaciones dentro de 3 meses (cuadro 2). Los marcadores de daño renal incluyen la proteinuria y anormalidades del sedimento urinario, estudios de imagen o histopatológicos.

Clásicamente se ha utilizado la concentración sérica de creatinina para evaluar la función renal, pero se ha visto que incluso cifras de creatinina dentro de los valores de referencia pueden corresponder a TFG <60 mL/min/ 1.73 m² .Por ello la creatinina no se debería de utilizar como única prueba para el estudio de la función renal.

La TFG es la mejor herramienta para evaluar dicha función, cabe mencionar que parámetro se debe determinar por lo menos 2 veces en un intervalo de 3 meses pues este varía con la edad, sexo y la masa corporal del individuo, situándose entre $90-140$ mL/min/ 1.73 m² en personas adultas jóvenes sanas.

Cuadro 5. Clasificación de la enfermedad renal crónica de acuerdo a la TFG y al daño renal.

Estadio	Descripción	Tasa de Filtración Glomerular (mL/min/1.73m ²)	Plan de acción
	Incrementación del Riesgo	≥90 (con factores de riesgo)	Escrutinio y reducción de factores de riesgo para ERC
1	Daño renal con Tasa de Filtrado Glomerular normal	≥90	Diagnóstico y tratamiento; tratamiento de morbilidad asociada; intervenciones para retardar la progresión; reducción de factores de riesgo para enfermedad cardiovascular.
2	Daño renal con Tasa de Filtrado Glomerular levemente	60-89	Estimación y retraso de la

	disminuida		progresión
3	Moderada disminución de la Tasa de Filtrado Glomerular	30-59	Evaluación y tratamiento de complicaciones
4	Severa disminución de la Tasa de Filtrado glomerular	15-29	Preparar para terapia de reemplazo renal
5	Enfermedad renal terminal	<15 (o diálisis)	Terapia de reemplazo renal (si hay uremia)

Fuente: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/335_IMSS_09_Enfermedad_Renal_Cronica_Temprana/GRR_IMSS_335_09.pdf

Terapéutica en la Enfermedad Renal Crónica

Hoy en día la terapéutica en el tratamiento de la enfermedad renal crónica consta de terapias multidisciplinarias. En el siguiente diagrama se muestra una guía rápida para la clasificación y tratamiento de los diferentes estadios de la ERC propuesta en nuestro país.

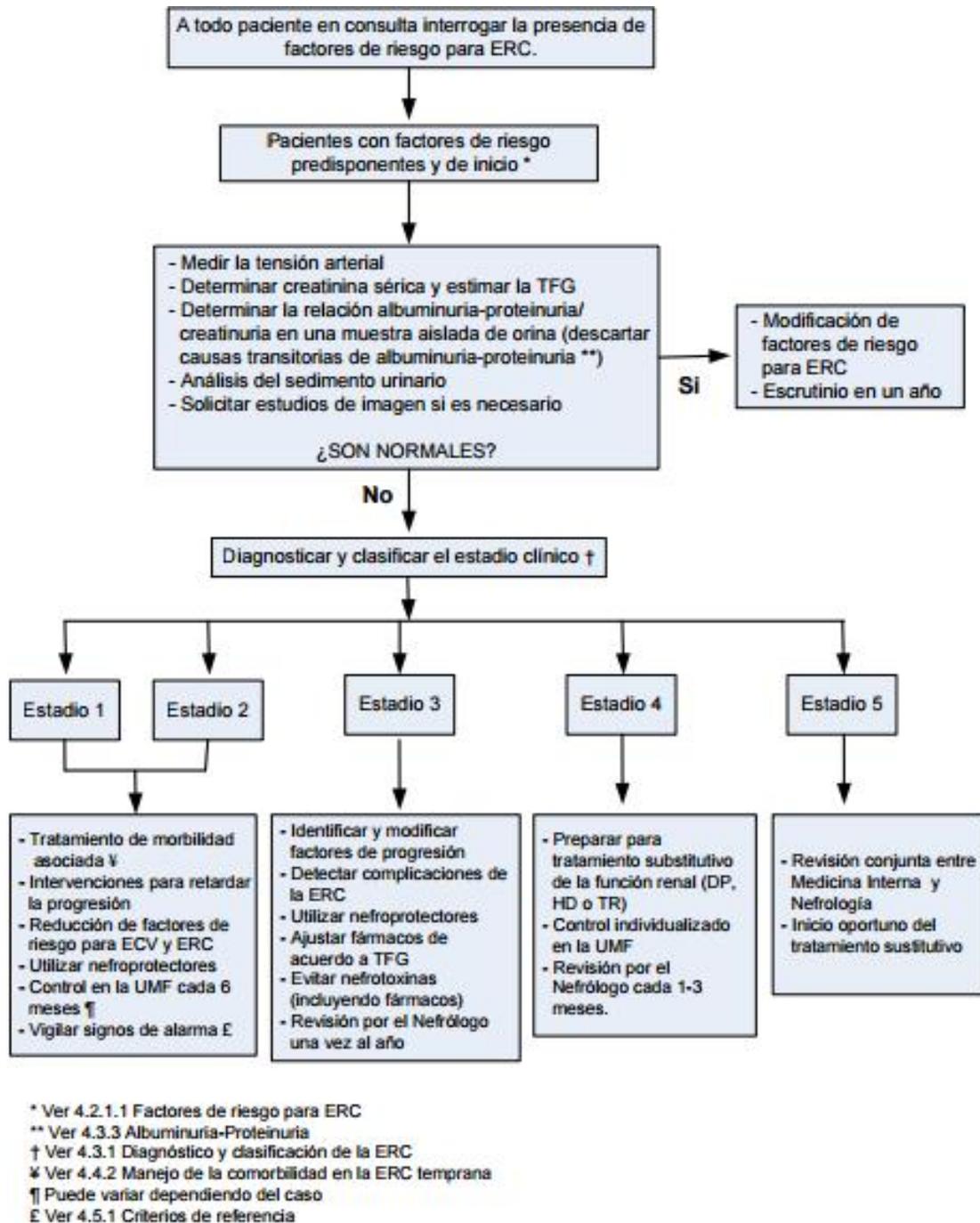


Figura 6.- Esquema de diagnóstico y seguimiento de la Enfermedad Renal Crónica.

Fuente: CENETEC, Guía de práctica clínica IMSS-335-09

Los métodos de sustitución de la función renal son diálisis peritoneal, hemodiálisis y trasplante renal. Estos son terapéutica para ERC en estadio terminal.

Entre las indicaciones para iniciar diálisis peritoneal y hemodiálisis, se incluye: síndrome urémico grave, sobrecarga de volumen que no responde al tratamiento con diuréticos, hiperkalemia no controlada por la terapéutica, acidosis metabólica grave, episodio de sangrado masivo y de difícil control relacionado a uremia, pericarditis urémica y taponamiento cardíaco.

Entre las ventajas de la diálisis peritoneal, se describen: mayor estabilidad hemodinámica, mejor control de la anemia, mayor tiempo de preservación de la función renal residual, mayor independencia y movilidad, no requiere un acceso vascular ni anticoagulación.

Se sugiere considerar el uso de diálisis peritoneal como terapia sustitutiva renal ante su ventaja en la preservación de la función renal residual.

La diálisis peritoneal está indicada en todos los casos con ERC etapa 5, excepto en los que existe una clara contraindicación para la misma, generalmente derivada de un peritoneo inutilizable, de una situación psico-social concreta del paciente o cuando el enfermo o la familia se negara a este tipo de terapia.

Trasplante renal.

A pesar de las ventajas descritas para la sustitución de la función renal por diálisis peritoneal, el trasplante renal se considera el tratamiento sustitutivo de elección de los pacientes con insuficiencia renal crónica terminal (figura 6), de modo que la rehabilitación de la mayoría de los pacientes con esta modalidad terapéutica es casi total. Cuando se estudia la calidad de vida se comprueba que ésta mejora mucho en relación con la situación de la diálisis y los pacientes mejoran de muchas de las manifestaciones de la uremia, como la anemia, la osteodistrofia renal, la neuropatía, el prurito, etc.¹⁷

La supervivencia de los pacientes y de los injertos ha mejorado paulatinamente y en la actualidad es superior al 80% al cabo de 5 años. Esto se ha logrado con la mejora de las técnicas quirúrgicas, pero sobre todo con los avances en el

tratamiento inmunosupresor (que combina varios fármacos como prednisona, azatioprina, ciclosporina, micofenolato-mofetil, FK-506, etc).

El progreso en los diferentes aspectos relacionados con el trasplante renal ha permitido mejorar sus resultados, lo que se ha traducido en un aumento de la calidad de vida de los pacientes si lo comparamos con el resto de modalidades terapéuticas de la insuficiencia renal crónica terminal, lo que ha conducido en los últimos años a un intento de aplicar esta técnica a un número cada vez mayor de pacientes, de lo que se ha derivado un incremento de la edad y patología asociada tanto de donantes como de receptores.

LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y EL TRASPLANTE RENAL EN MÉXICO

Como ya se mencionó, la ERC es una resultante de diversas enfermedades crónicas degenerativas teniendo entre las más destacadas la diabetes mellitus y la hipertensión arterial, estos datos no son exclusivos en nuestro país ya que a nivel mundial se presenta el mismo comportamiento de la enfermedad derivando en resultados fatales que pudieran ser evitados si la enfermedad es tratada.

Las cifras de morbilidad y mortalidad en nuestro país son alarmantes, sin embargo no existe un registro de pacientes con ERC por lo que se desconoce el número preciso de pacientes en cualquiera de sus estadios, los grupos de edad y sexo más afectados, así como el comportamiento propio de los programas.

Se estima una incidencia de pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) de 377 casos por millón de habitantes y la prevalencia de 1,142.¹⁸

De acuerdo a las cifras reportadas por la Fundación Mexicana del Riñón (FMR) actualmente existen 9.6 millones de personas con Insuficiencia Renal Leve, 65 mil personas con tratamiento continuo de diálisis y más de 75 mil enfermos renales crónicos no atendidos adecuadamente.

En México, el primer trasplante renal fue realizado por los doctores Manuel Quijano, Gilberto Flores y Federico Ortiz Quezada en el Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social, en 1963; desde entonces se han construido más de 106 centros de trasplante en diferentes estados del país.

Hoy en día nuestro país cuenta con un Centro Nacional de Trasplantes, el cual es el órgano responsable de impulsar y coordinar los procesos desde la donación hasta el trasplante de órganos, tejidos y células, desarrollando el marco regulatorio para favorecer el desempeño de los integrantes del Subsistema Nacional de Donación y Trasplantes, otorgando a los pacientes que así lo requieran una mayor oportunidad, con legalidad y seguridad.

De acuerdo con el CENATRA hasta el primer trimestre del 2016 en México existen un total de 12,131 pacientes en espera de trasplante de riñón.

En el siguiente gráfico (Gráfico 1) podemos observar el comportamiento histórico del trasplante de riñón en nuestro país desde el año 2000 hasta el primer trimestre del año 2016.

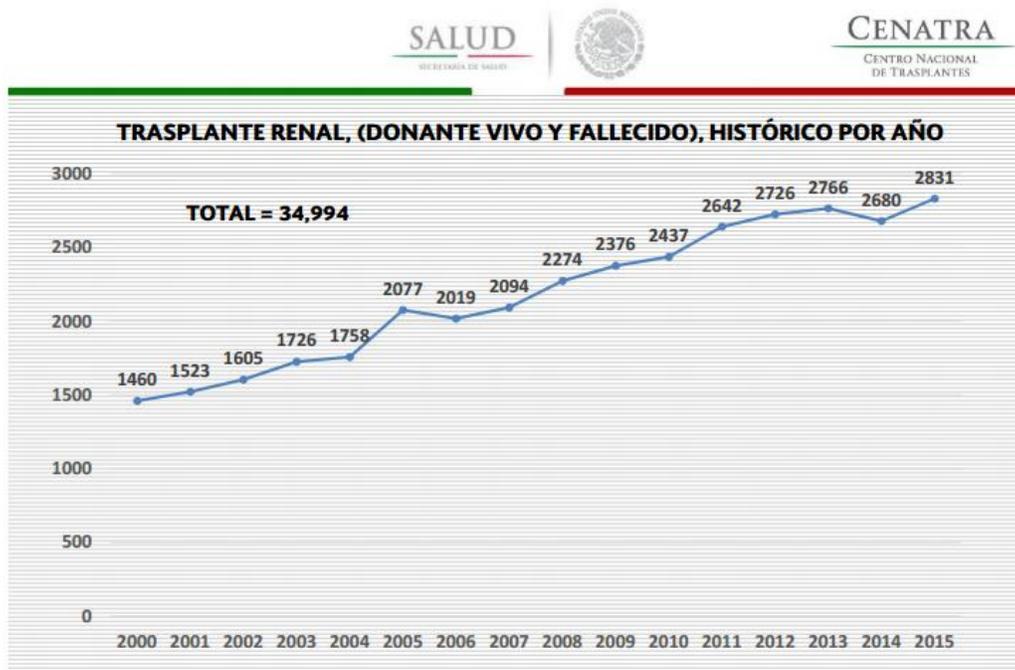


Gráfico 1. Trasplante renal histórico por año

Fuente: 3/04/2016, consultada en el SIRNT.

En México al año se realizan un aproximado de 2,000 y 2,300 trasplantes al año de los cuales el 75% es de donador familiar relacionado y el 25% cadavérico (grafico2).

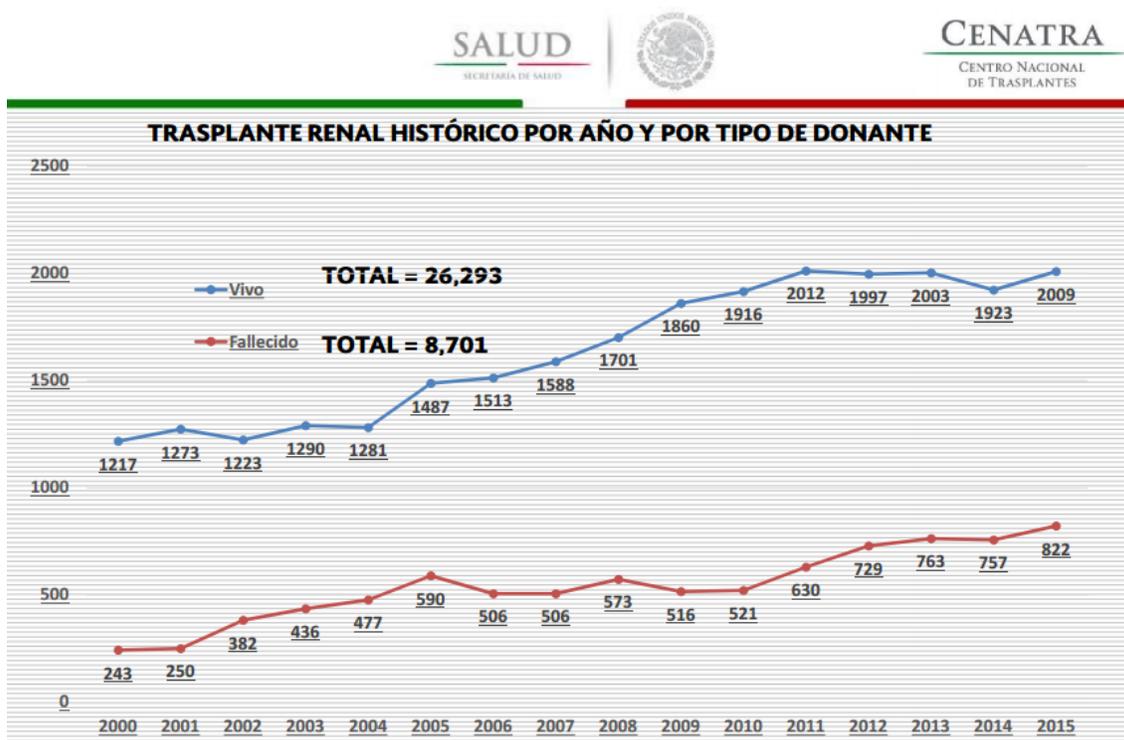


Gráfico 2. Trasplante renal histórico por año y tipo de donante

Fuente: 3/04/2016, consultada en el SIRNT.

En cuanto a los centros de trasplante en nuestro país, estos se ubican principalmente en las capitales de las entidades federativas y en las ciudades más grandes del país.

Como se muestra a continuación (Gráfico 3), la CDMX es la entidad federativa que realiza el mayor número de trasplantes en nuestro país, seguido por las grandes ciudades como Jalisco, Guanajuato y Nuevo León. Tan solo durante el primer trimestre del año 2016 se realizaron un total de 176 trasplantes de riñón en la CDMX.

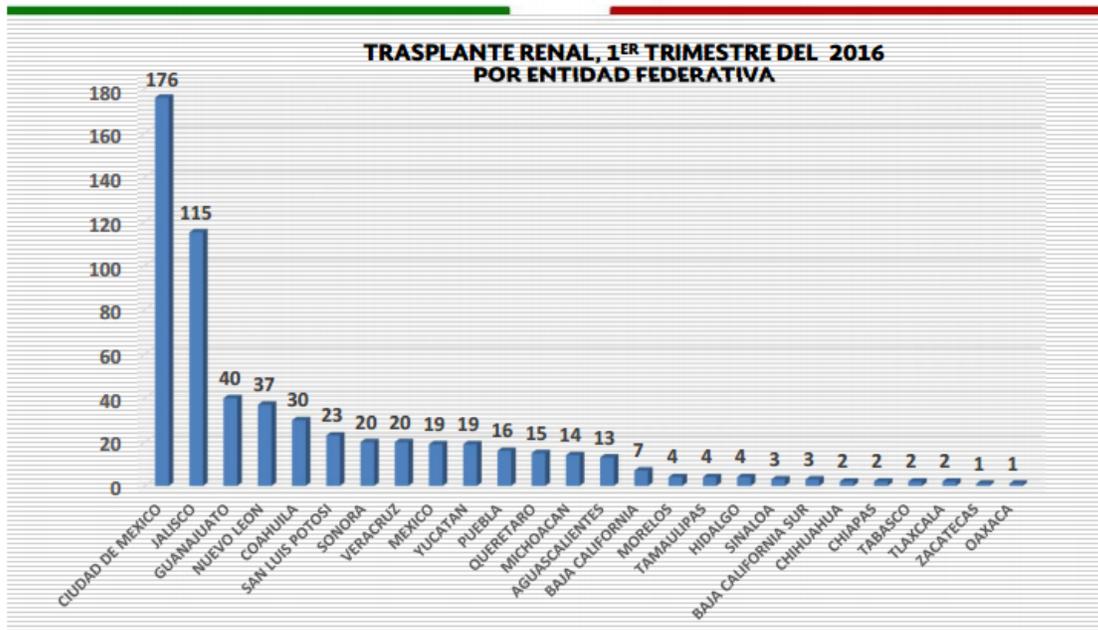


Gráfico 3. Trasplante por entidad federativa durante el primer trimestre 2016

Fuente: 3/04/2016, consultada en el SIRNT.

En México el CENATRA es responsable del desarrollo y la rectoría del Subsistema Nacional de Trasplantes (SNT), que tiene por objetivo definir y establecer un modelo de donación y trasplantes apropiado para las necesidades del sistema de salud que está integrado por diferentes instituciones públicas, sociales y privadas:

- Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)
- Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado (ISSSTE)
- Servicios de salud de Petróleos Mexicanos
- Servicios de salud de la Secretaría de la Defensa Nacional
- Servicios de salud de la Secretaría de Marina
- Hospitales privados
- Secretaría de Salud del Gobierno del Distrito Federal
- Secretarías de salud estatales y federal

El SNT es una estructura virtual conformada por todos los hospitales que tienen una licencia sanitaria para realizar donación, trasplante o como banco de tejidos.

La institución encargada del mayor número de trasplantes de riñón en nuestro país es la seguridad social con un total de 57% de los trasplantes realizados (Gráfico 4), seguido por la institución pública con un 27% y al final la institución privada con un 16% de los trasplantes de riñón realizados en el primer trimestre del año 2016.

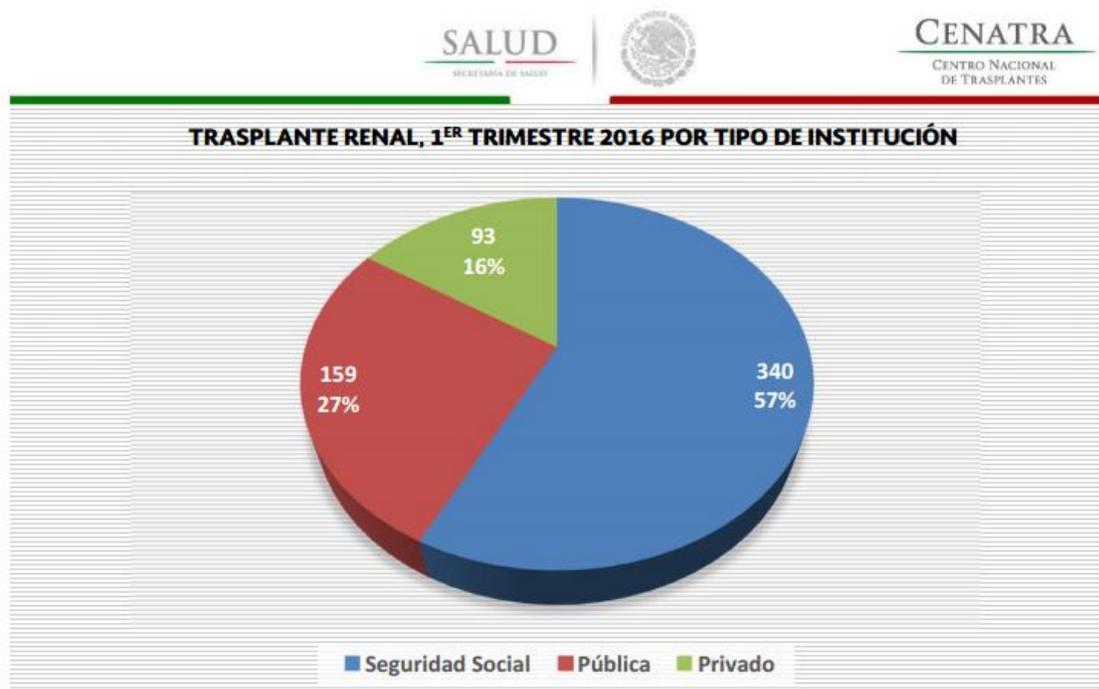


Gráfico 4. Trasplante renal por tipo de institución durante el primer trimestre 2016

Fuente: 3/04/2016, consultada en el SIRNT.

Dentro de los cinco primeros lugares de centros con mayor actividad en trasplante renal son establecimientos del IMSS, en donde encontramos a la U.M.A.E del CMN SXXI como el segundo establecimiento con mayor actividad en trasplante renal con un total de 41 trasplantes durante el primer trimestre del año 2016, solo por debajo del Hospital de Especialidades de CMN de Occidente en el estado de Jalisco, con un total de 52 trasplantes de riñón durante dicho periodo.

Evaluación pretrasplante del receptor.

Podrán ser considerados para trasplante renal todos aquellos pacientes con ERC en avanzada, así como aquellos que ya se encuentren en terapia sustitutiva.

El paciente a recibir un injerto renal debe ser evaluado por diferentes servicios como: Infectología, Cardiología, Neumología, Enfermedades neoplásicas, Enfermedad vascular cerebral, Enfermedad vascular periférica, Gastrointestinal, Enfermedades hepáticas, Urología, Hematología Ginecología, Dental y Otorrinolaringología, Aspectos psicosociales.

Además de las ya mencionadas, tanto el receptor debe de someterse a evaluaciones de riesgo inmunológico. Antes de la realización de algún otro tipo de pruebas inmunológicas se debe asegurar una compatibilidad en sistema sanguíneo ABO

Cuadro 6. Compatibilidad de grupo sanguíneo ABO

Compatibilidad entre Grupo Sanguíneo de receptor y donador	
Receptor	Puede ser su donador
0	0
A1	A1 / 0
A2	A2 / 0
B	B / 0
A1B	A1B/ A1/ B/ 0
A2B	A2/ A2/ B/ 0

Cabe mencionar que en el programa de trasplante renal y de corazón se siguen las reglas que regulan la transfusión sanguínea. Sin embargo, ahora hay evidencias de órganos sólidos trasplantados de manera exitosa con diferencias en grupo, como donadores del tipo A2, o A2B que pueden donar a individuos del tipo

B u O. Este tipo de procedimiento se realiza previa remoción de anticuerpos anti-AB mediante el uso de prostaféresis o inmunoadsorción, más el uso de fármacos inmunosupresores de inducción.¹⁹

El cruzar esta barrera permite que pacientes con tiempos prolongados en lista de espera para trasplantes se vean beneficiados, de igual manera donantes vivos con HLA (Antígenos Leucocitarios Humanos) idénticos, pero con grupo sanguíneo incompatible con el receptor no tendrán que descartarse como donadores.

Las principales pruebas inmunológicas que deben de realizarse antes de un trasplante renal son:

- Tipificación de los antígenos HLA Clase I y Clase II
- Determinación y monitoreo de anticuerpos anti-HLA
- Prueba cruzada linfocitaria

Tipificación HLA

Antes de realizar un trasplante se debe evaluar la compatibilidad antigénica del donador y receptor con la finalidad de optimizar la sobrevida del injerto y disminuir las reacciones inmunológicas.

Entre las principales pruebas de histocompatibilidad realizadas en un programa de trasplante se encuentra la tipificación de antígenos clase I y clase II del sistema HLA así como el monitoreo y detección de anticuerpos anti-HLA mediante un panel de linfocitos o antígenos HLA purificados.

La tipificación del sistema HLA en el proceso de trasplante renal es de suma importancia ya que permite conocer el grado de compatibilidad entre donador/receptor.

Actualmente se pueden tipificar el HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ y – DP, así como anticuerpos anti-MICA, pero varía de laboratorio a laboratorio. La técnica que históricamente ha apoyado por más de 30 años es la tipificación de antígenos HLA por prueba de microlinfocitotoxicidad o test NHI desarrollada por el Dr. Paul

Terasaki. Hoy en día debido al alto grado de polimorfismo que exhibe el HLA con numerosas variantes alélicas la tipificación basada a nivel del DNA ha permitido mejorar la asignación del fenotipo HLA del individuo en estudio.

Cuadro 5. Polimorfismo de algunos genes del sistema HLA para Junio/2016

CLASE I	Alelos	CLASE II	Alelos	MIC	Alelos
HLA-A	3,399	HLA-DRA	7	MICA	105
HLA-B	4,242	HLA-DRB(1-9)	2,018	MICB	42
HLA-C	2,950	HLA-DQA1	69		
HLA-E	21	HLA-DQB1	911		
HLA-F	22	HLA-DPA1	43		
HLA-G	53	HLA-DPB1	644		

Información tomada de <https://www.anthonynolan.org/>

El tipo de método para la tipificación del DNA (SSP, SSO, SBT y RSCA) dependerá del grado de resolución (baja, media o alta) que cada programa de trasplante requiera así como a los recursos con los que se cuente y la experiencia del capital humano.

En el laboratorio de Histocompatibilidad del BCS CMN SXXI, se realizan métodos de biología molecular basados en técnicas de hibridación y electroforesis.

Cuadro 6. Estudio molecular en la tipificación del sistema HLA

Estudio molecular	
Hibridación	SSO (Sequence-Specific Oligonucleotide)
Electroforesis	SSP (Sequence-Specific Primers)
	SBT (Sequence Based Typing)
	RFLP (Restriction Fragment Polymorphism)
DNA conformacional	SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism)
	RSCA (Reference Strand Mediated Conformational analysis)

Información tomada de: Determinación del antígeno único como biomarcador de rechazo agudo en pacientes en protocolo de trasplante renal de la UMAE HE CMN SXXI de 2007 a 2014.¹³

Los métodos utilizados en el laboratorio de HLA del BCS CMN SXXI son estudios moleculares SSO y SSP que se describirán a continuación.

-PCR-SSO (Polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide/ Reacción en cadena de la polimerasa de secuencias específicas de oligonucleótidos).

Es la amplificación específica de los locus HLA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la subsiguiente hibridación del producto amplificado por medio de sondas de oligonucleótidos de secuencia específica. La mayor parte del amplio polimorfismo del sistema HLA resulta de eventos en los cuales pequeñas secciones de nucleótidos de un alelo (no más de 100 bases) son transferidos a otro alelo.

De esta manera, muchas de las secuencias tienden a compartir alelos y no son alelo-específicas, surgiendo el uso de sondas de secuencia específica.

- **PCR-SSP** (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers/* Reacción en cadena de la polimerasa de secuencias específicas de iniciadores).

La especificidad de los alelos HLA amplificados por PCR-SSP, se determina por los iniciadores (*Primers*). Cada par de iniciadores utilizados amplifica uno o varios alelos. El número total de iniciadores utilizados deberá amplificar todos los alelos conocidos para el locus a determinar: Dependiendo de su selección, la PCR SSP puede ser de alta, mediana o baja resolución.

Esta técnica requiere de varios controles, cada pozo contiene un par de iniciadores control que reacciona con una secuencia de DNA diferente a las regiones polimórficas HLA, y que sirve como control interno en todo el proceso de amplificación. Un segundo control, denominado “tubo abierto” el cual contiene todos los reactivos excepto el DNA si este pozo resulta positivo indica contaminación.

La importancia clínica de la tipificación HLA en el protocolo de trasplante renal no está nada discutida. La diversidad de polimorfismos de los antígenos del MHC hace que la probabilidad de que un potencial receptor de trasplante renal encuentre un donador “no relacionado” con los mismos alelos HLA sea menor de 1:1'000,000.

Está perfectamente establecido que el mayor efecto benéfico se obtiene cuando el genotipo HLA del receptor y el donador es idéntico, traducido en una mayor supervivencia del injerto, así como reducción del uso de fármacos inmunosupresores.²⁰

La tipificación del sistema HLA en el proceso de trasplante renal es de suma importancia ya que permite conocer el grado de compatibilidad entre donador/receptor. Por otro lado, es de vital importancia un rastreo de anticuerpos contra antígenos del sistema HLA del donador presente en el receptor para

predecir un rechazo humoral del injerto, teniendo como objetivo principal el aumento de la sobrevida del mismo.

PRUEBAS CRUZADAS Y DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS.

La prueba cruzada o *Cross-Match* permite detectar en el suero del receptor la presencia de anticuerpos preformados dirigidos contra las células del donante.

Este estudio se puede realizar mediante técnicas de microlinfocitotoxicidad, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) o por citometría de flujo.

Esta prueba en cualquiera de sus variantes usa linfocitos del donador con suero del receptor, con el fin de buscar anticuerpos preformados en contra de antígenos de la superficie celular (Antígenos HLA y no HLA, pero no MICA ya que estos no se encuentran expresados en la membrana linfocitaria).

Todo esto tiene la finalidad de prevenir un evento de rechazo hiperagudo o pérdida temprana del injerto, entendiendo que una prueba cruzada positiva contra indica el trasplante renal debido a la presencia de Anticuerpos Donador Específico preformados.

La prueba cruzada es uno de los procedimientos más importantes y necesarios en el trasplante de órganos, sobre todo en el renal. En los casos de una prueba cruzada positiva es importante descartar la presencia de autoanticuerpos no-HLA, los cuales son irrelevantes para trasplantar y se traducen como resultados falsos positivos. Estos anticuerpos son del tipo IgM y reaccionan a baja temperatura. La manera más efectiva para confirmar un resultado positivo es tratar el suero del receptor con un agente reductor como ditiotreitól (DTT). Los anticuerpos IgM son inactivados por acción del DTT, de manera que si aún persiste un resultado positivo éste puede atribuirse a la presencia de anticuerpos anti-HLA del tipo IgG y por lo tanto es una contraindicación para trasplantar.

La presencia de anticuerpos linfocitotóxicos en el suero de pacientes en lista de espera de trasplante renal limita las oportunidades de que éste se lleve a cabo con éxito. Se ha demostrado que los pacientes con una elevada tasa de anticuerpos

linfocitotóxicos presentan una mayor incidencia de episodios de rechazo agudo, factores relacionados con una menor supervivencia del injerto.

En cuanto a la determinación de anticuerpos existen diversas técnicas, en la siguiente tabla (tabla) podemos observamos algunas de las principales características.

Cuadro 7. Características de pruebas cruzadas y determinación de anticuerpos por diferentes técnicas.

Características de pruebas cruzadas y determinación de Ac					
TÉCNICA	Tipo de prueba				
	Prueba Cruzada	Tamizaje	%PRA	Single Antigen	MICA
CDC Y CDC-AHG	++	-	+	-	-
ELISA	-	+	+	+	+
CITOMETRÍA DE FLUJO (CF)	+++	+	+	++	++
LUMINEX	-	+	+	+++	+++

Cada pocillo de ELISA o microesfera contiene: 18 antígenos para el tamizaje, 6 antígenos para %PRA y 1 antígeno HLA para SA.

En la búsqueda de estos anticuerpos hoy en día se emplean anticuerpos purificados adsorbidos a una placa de ELISA o perlas de silicón para el uso en CF o Luminex.

-Ensayo de microlinfocitotoxicidad CDC ²¹

Este ensayo es un método de referencia clásico que ha sido usada por mucho tiempo en la detección de anticuerpos anti HLA presentes en el suero del paciente.

Una muestra del suero se incuba con un panel de linfocitos viables con un fenotipo HLA conocido, si el suero del paciente contiene anticuerpos específicos contra las moléculas del HLA presentes en los linfocitos, se presenta una lisis celular, gracias a la reacción antígeno-anticuerpo con fijación de complemento, la lisis se visualiza gracias a un colorante. La reacción se cuantifica según el porcentaje de células muertas.

Existe una versión de esta técnica a la cual se le añade AHG tras la incubación del suero con las células lo que permite exacerbar la reacción de los anticuerpos presentes en la prueba, en el caso de que el título de anticuerpos no sea el suficiente para activar la cascada del complemento, ya que el ensayo CDC es incapaz de detectar bajas concentraciones de anticuerpos.

Una de las limitaciones de la técnica es que para la determinación del grado de sensibilidad y de la especificidad de los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes en lista de espera se necesita ensayar cada suero con un panel amplio de células (alrededor de 40) para que estén representadas todas las especificidades HLA o al menos las más frecuentes en nuestra población, por lo que este tipo de determinaciones tiene una demora constante.

Aunado al tiempo de realización una desventaja es que solamente determina anticuerpos fijadores de complemento (IgG, IgM). Aunque bien se sabe que la mayoría de los autoanticuerpos son de clase IgM, por lo que se ha desarrollado una variante de la técnica clásica de microlinfocitotoxicidad que consiste en tratar los sueros con *Dithiotreitol* (DTT) para eliminar la IgM. Mediante este tratamiento sólo se detectan los anticuerpos IgG presentes en el suero que en la mayoría de los casos serían anticuerpos específicos anti-HLA.

-Ensayo por ELISA

Esta técnica consiste en la detección de anticuerpos presentes en un suero que son capaces de reconocer antígenos HLA purificados adheridos a un soporte sólido. Estos antígenos pueden proceder de plaquetas o de líneas celulares transformadas con distintos HLA.

Al igual que en las otras técnicas la mezcla de antígenos debe ser representativa de la población general. El suero se incuba con el HLA pegado a la placa. En caso de que existan anticuerpos anti-HLA, estos se unirán a ellas y quedarán fijados en la placa. En caso contrario, todas las inmunoglobulinas se eliminarán con los lavados. El revelado se hace mediante el uso de un segundo anticuerpo marcado con un enzima y adición de un sustrato de la enzima, en caso de que haya anticuerpos anti-HLA esa enzima producirá una reacción colorimétrica al actuar sobre su sustrato en el último paso de la técnica. Esa reacción se cuantifica en un espectrofotómetro.

Mediante ELISA se detectan todos los anticuerpos, tanto fijadores de complemento como los no fijadores, sin embargo algunas casas comerciales utilizan plaquetas para obtener los antígenos por lo que estas preparaciones a pesar de contener teóricamente sólo moléculas HLA suelen estar contaminadas con antígenos plaquetarios que pueden dar lugar a falsos positivos.

-Ensayo por Citometría de Flujo

Este método consiste en una reacción antígeno-anticuerpo sobre la superficie celular visualizada mediante el uso de un segundo anticuerpo marcado con un fluorocromo y el uso de un citómetro de flujo que es un instrumento muy potente que detecta cada célula presente en un flujo de líquido iluminado por un haz de láser.

Las muestras de partida para la obtención de células son las mismas que en el caso de la CDC, pero no es necesario separar las poblaciones T y B, ya que el

uso de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos nos permite distinguirlos en el citómetro.

La presencia de anticuerpos se hace evidente en el citómetro de flujo al incidir sobre la muestra un haz de láser, el cual excita el fluorocromo que va conjugado al anticuerpo y emite luz a una determinada longitud de onda. Esta señal luminosa se capta por unos detectores y un complejo sistema informático es capaz de transformar el mensaje luminoso al lenguaje informático.

Mediante el uso de esta técnica en realidad se determina la presencia de anticuerpos frente a moléculas presentes en la superficie de los linfocitos, pero al igual que la microlinfocitotoxicidad, esta técnica no permite distinguir entre la presencia de anticuerpos relevantes y no relevantes en el trasplante. La clase de Ig que se detecte sólo depende del segundo anticuerpo que se utilice. Si utilizamos un segundo anticuerpo frente a Ig totales detectaríamos todos los anticuerpos anti linfocitarios presentes en el suero (citotóxicos y no citotóxicos).

-Ensayo Luminex®

Este análisis es muy parecido a la citometría de flujo convencional, la diferencia radica en la base a analizar, en el sistema Luminex se utilizan microperlas recubiertas de antígenos purificados HLA y no células.

Se tratan de microperlas de poliestireno con un diámetro de 5.6 µm las cuales tienen un código de color interno que emplea fluoróforos en el rango de rojo e infrarrojo, lo cual se consigue usando diferentes cantidades de colorantes en cada perla, de esta manera se construyen 100 perlas, cada una con una señal característica única identificable en el espectro.

-Screening (Escrutinio de anticuerpos anti-HLA).

Esta prueba permite, en una sola determinación, detectar la presencia de anticuerpos contra los antígenos de compatibilidad HLA, tanto clase I como clase II; de igual manera, permite detectar la presencia de los antígenos dirigidos contra antígenos denominados cadena A relacionado a MHC clase I (MICA-A), que han

sido ampliamente descritos en la literatura por su participación en caso de rechazo de injertos.

-Determinación del % PRA (Panel Reactivo de Anticuerpos).

La información que se obtiene permite conocer el grado de sensibilización del paciente cuyo objetivo es anticipar el tipo de terapia inmunosupresora u otro tipo de terapia que requiera el paciente en la etapa previa al trasplante o en el postoperatorio

Esta prueba logra monitorear periódicamente la presencia de anticuerpos anti-HLA en los sueros de los pacientes que se encuentran en espera de un trasplante, asimismo, nos permite conocer si los anticuerpos presentes en el paciente están dirigidos contra antígenos del donador de clase I o clase II (anticuerpos donador específicos), así como realizar una caracterización respecto a la especificidad de dichos anticuerpos.

-Single Antigen

La prueba SA es capaz de detectar a los anticuerpos anti-HLA donador específicos en el suero de los pacientes candidatos a un trasplante renal, dicha prueba consiste en un ensayo en fase sólida empleando tecnología LUMINEX®.

Debido a su alta sensibilidad, esta técnica es capaz de detectar niveles muy bajos de anticuerpos anti-HLA. Adicionalmente es capaz de determinar especificidades de los anticuerpos con más precisión.

La tecnología Luminex® se basa en el principio de la citometría de flujo donde las microperlas se encuentran suspendidas en un líquido el cual se hace pasar por el haz de un laser. El laser excita el colorante interno de cada microperla y a la ficoeritrina conjugada, resultando en una emisión de fluorescencia, tanto de la microperla como de la ficoeritrina conjugada, la cual es detectada por el citómetro y posteriormente interpretada por un software que determina la concentración del anticuerpo y la especificidad del HLA al que va dirigido. La cuantificación objetiva de la concentración de los anticuerpos anti-HLA se expresa mediante la intensidad

media de fluorescencia (*Mean Fluorescence Intensity, MFI*) que alcanzan los sueros de los pacientes.

Actualmente algunos centros hospitalarios proponen un algoritmo de manejo basado solo en la prueba *Single Antigen* y un porcentaje de %PRA calculado a partir de esta prueba, debido a su alta sensibilidad.

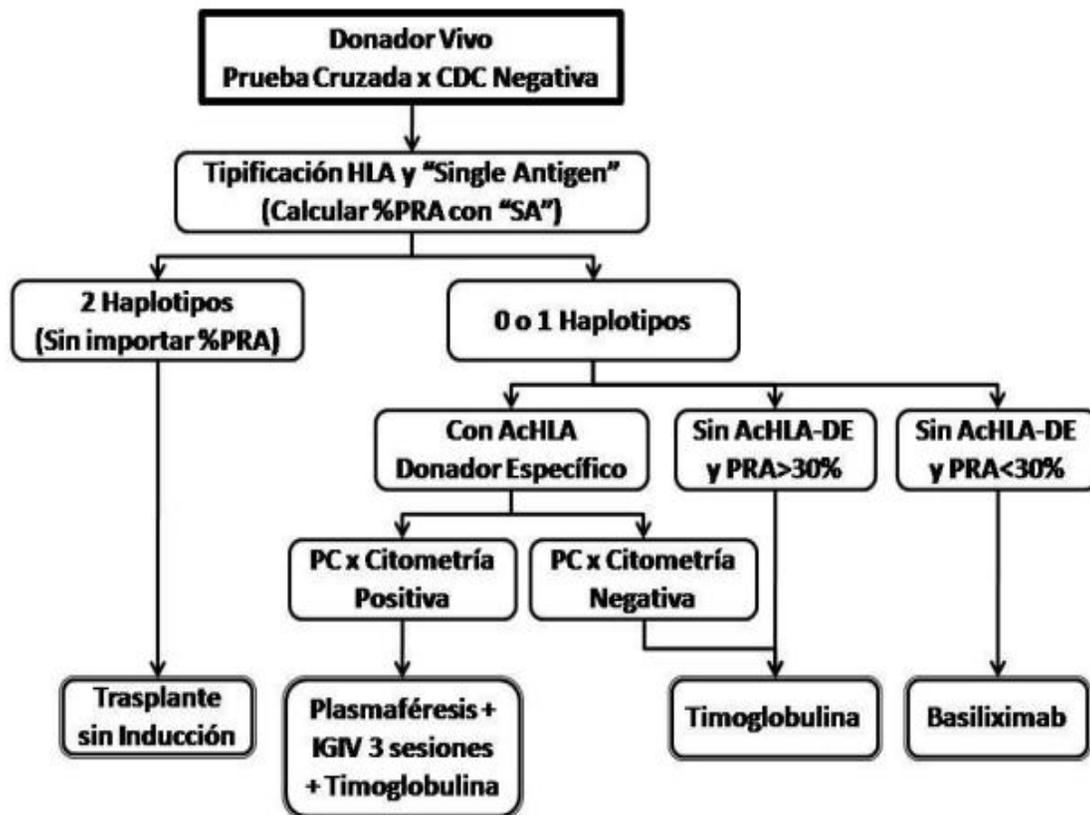


Figura7.- Algoritmo de manejo TR propuesto por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. Tomado de <http://www.innsz.mx/imagenes/ProtocoloTR-INNSZ-2015-ver-10.pdf>

Como podemos apreciar, la participación del laboratorio de histocompatibilidad es de suma importancia cuando de trasplantes hablamos, incluyendo órgano sólido y progenitores hematopoyéticos.

Remarcando lo mencionado, la tipificación del sistema HLA en el proceso de trasplante renal es de suma importancia ya que permite conocer el grado de compatibilidad entre donador/receptor. Por otro lado, es de vital importancia un rastreo de anticuerpos contra antígenos del sistema HLA del donador presente en el receptor para predecir un rechazo humoral del injerto, teniendo como objetivo principal el aumento de la sobrevida del mismo.

Sin embargo se ha descrito la importancia de solamente algunas moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad como marcadores del rechazo para el trasplante de órgano sólido ya que no todos los aloanticuerpos dirigidos contra el sistema HLA son considerados patogénicos para el rechazo hiperagudo, agudo o crónico mediado por anticuerpos. Debido a esto, hoy en día en los protocolos de trasplante de órgano sólido solo se lleva a cabo la tipificación de ciertos loci del sistema HLA, no obstante se han reportado algunos casos de rechazo al injerto mediado por anticuerpos en pacientes donde no se encontraban incompatibilidades entre las moléculas del sistema HLA tipificadas en el receptor y el donador, de la misma manera existen reportes de rechazo agudo al injerto en pacientes no portadores de anticuerpos donador específico para moléculas del sistema HLA tipificadas en el donador.

Este tipo de evidencia permite sospechar sobre la patogenicidad de anticuerpos dirigidos contra moléculas del sistema HLA que no han sido bien descritos como de importancia en la mediación de la respuesta inmune al rechazo hiperagudo, agudo o crónico del injerto.

Existen diferentes factores como el porcentaje de expresión de la molécula en el tejido trasplantado y/o la variabilidad de la molécula los que permiten sospechar si una molécula puede ser de importancia en el rechazo de trasplante sólido (riñón).

Entre las moléculas de clase II del sistema HLA bien descritas de importa para el rechazo de riñón mediado por anticuerpos se encuentran las moléculas HLA-DR y HLA-DQ.

Existen otras moléculas de clase II como HLA-DP, que debido a su baja expresión en células del endotelio renal, han sido consideradas menos inmunogénicas que otros antígenos del sistema HLA, por lo cual se ha pensado que los anticuerpos dirigidos a éstas moléculas, en específico al antígeno HLA-DP, no muestran el mismo potencial patogénico que las moléculas anteriormente mencionadas²², excluyéndolas de la práctica clínica rutinaria en el trasplante de riñón.

Los primeros estudios sugerían que las incompatibilidades en HLA-DP no afectaban de manera adversa la sobrevida del injerto, excepto probablemente en retrasplantes y en pacientes altamente sensibilizados.

Los resultados iniciales observados en la sobrevida del riñón trasplantado realizando únicamente la tipificación de las moléculas más inmunogénicas llevaron a la exclusión del antígeno HLA-DP de la mayoría de los algoritmos de compatibilidad para el trasplante de riñón. Sin embargo existe la evidencia de que los anticuerpos en contra HLA-DP pueden ser patogénicos. De manera interesante las parejas donador –receptor con una compatibilidad en HLA-A, B, C, DR, DQ pueden desarrollar una incompatibilidad en HLA-DP.²³

Actualmente en México no existe una investigación que nos de indicios de la importancia y el comportamiento del alelo HLA-DP en nuestra población.

JUSTIFICACIÓN ²⁴

En el año 2005 la ERCT fue la décima causa de muerte a nivel nacional, dando lugar a 10 mil fallecimientos, si las condiciones actuales persisten, se espera que para el año 2025 haya cerca de 212 mil casos y se registren alrededor de 160 mil muertes relacionadas a dicha enfermedad. La tasa de crecimiento de la IRC, descontando los decesos, ha sido aproximadamente del 11% anual en los últimos 10 años.

Existen en México alrededor de 140,000 con Insuficiencia Renal Crónica, de los cuáles sólo el 50% tienen la oportunidad de ser atendidos en el sector salud

Los costos que implica una sesión de hemodiálisis por paciente en México varían entre las unidades del sector público con un promedio de \$159,000 pesos anuales, mientras que en instituciones privadas los precios aumentan a \$168,000 pesos anuales.

En cuanto a la terapia sustitutiva por trasplante renal, el costo de un trasplante de vivo relacionado en el sector público es de entre \$200,000 y 250,000 pesos y entre \$500,000 y \$600,000 pesos en el sector privado, si el donante es cadavérico cuesta alrededor de \$150,000 pesos en el sector público y \$300,000 en el sector privado.

El costo de la procuración de los órganos oscila entre \$20.000 y \$30,000 pesos.

En los últimos años se han incrementado considerablemente los pacientes a la espera de un trasplante de riñón en México, en 2010 los receptores eran 7,240, en 2011 8,054, en 2012 eran 9,086, en 2013 sumaban 10,043, en 2014 eran 11,302 y el año pasado 2015 contábamos con 12,095 pacientes receptores en espera de riñón.

La ERC representa una de las enfermedades más costosas a nivel mundial en materia de tratamiento, y su costo continúa aumentando, hecho que constituye un reto económico para los sistemas de salud. Además afecta de manera importante la fuerza laboral de una nación, ya que la aparición de la enfermedad comúnmente ocurre durante la edad productiva del paciente.

Con el propósito de reducir los costos del tratamiento, el IMSS ha impulsado un programa de trasplantes el cual representará un ahorro de 600 millones de pesos, además de ofrecer una mayor calidad de vida, dándole la oportunidad al paciente de reincorporarse a la vida laboral.

El trasplante renal tiene un mayor impacto positivo en la salud del paciente, además de resultar económicamente más viable para los sistemas de salud pública por ser una solución a largo plazo. Por ello es necesario que se lleve a cabo un buen monitoreo inmunológico para aumentar así las probabilidades de éxito del trasplante y prevenir la pérdida del órgano a mediano plazo.

Aquí la importancia de realizar la tipificación del antígeno HLA-DP en pacientes en protocolo de trasplante renal, tanto la determinación del antígeno como sus anticuerpos en la población atendida y los casos convenientes para dicho análisis, de esta manera se procura obtener un mayor éxito en la supervivencia del injerto. Justificando el análisis del antígeno HLA-DP (tipificación y rastreo de anticuerpos) como un camino para optimizar el recurso con el que se cuenta en el instituto sin dejar de lado la premisa principal de atención centrada en el paciente.

OBJETIVO

General

Recopilar y analizar datos de una población de pacientes incluidos en el protocolo de trasplante renal, con el propósito de establecer la tipificación de la molécula HLA-DP de importancia para el rechazo del órgano sólido (riñón).

Particulares

- Implementar la metodología para la tipificación de la molécula HLA-DP PCR-SSO
- Analizar la presencia de anticuerpos contra HLA-DP mediante la prueba del antígeno único y su relación con el rechazo renal de tipo humoral.

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Los pacientes no HLA-DP idénticos (Receptor/Donador) con presencia de anticuerpos anti HLA-DP, incluidos en protocolo de trasplante renal, tendrán una mayor susceptibilidad de presentar un rechazo al injerto mediado por anticuerpos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Se revisaron expedientes de pacientes con protocolo de Trasplante Renal Donador Vivo finalizado, de un periodo de 2010-2015 del HE CMN SXXI.

Para este estudio se utilizaron expedientes de pacientes con los siguientes criterios de inclusión: rechazo agudo al injerto renal, presencia de anticuerpos anti HLA-DP en la prueba del antígeno único sin la presencia de algún Anticuerpo Donador Específico contra algún otro antígeno Clase I o Clase II, del sistema HLA.

La muestra generada no incluye pacientes pediátricos.

Se obtuvo una población inicial n=100 pacientes con presencia de anticuerpos anti HLA-DP, finalizando con una n=15 de pacientes con pérdida temprana del injerto.

Lugar de desarrollo de estudio.

Banco Central de Sangre, Laboratorio de HLA. CMN SXXI, IMSS.

Descripción general del estudio.

La presente investigación se enfocó en un estudio retrospectivo en el que se recopilaron y analizaron datos obtenidos de pacientes que presentaron rechazo al trasplante renal, con el fin de establecer la implicación de anticuerpos anti HLA-DP donador específico en el rechazo o pérdida del injerto, detectados por la prueba del antígeno único, abarcando un periodo desde 2010 hasta 2015.

La presencia de anticuerpos anti-HLADP se determinó por la prueba de SA, todos los resultados fueron obtenidos retrospectivamente

Para la tipificación HLA-DP de los binomios, se implementó la técnica PCR-SSO como se describe en el anexo 1.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se propuso analizar las siguientes variables.

Variables dependientes

Cuadro 8. Variables Dependientes Propuestas

NOMBRE	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	DEF. CONCEPTUAL	DEF. OPERACIONAL	UNIDAD DE MEDICIÓN
Anticuerpo Donador Específico	Cuantitativa	Razón	Anticuerpos preformados contra el HLA DP del posible donador.	Anticuerpo analizado por medio de la prueba del antígeno único (<i>Single Antigen</i>) a través de tecnología Luminex.	Intensidad de Fluorescencia Media (FMI)
Tipo de rechazo	Cualitativa	Nominal	Rechazo humoral, es aquel que es mediado por anticuerpos y la reacción ocurre en un promedio de 6 meses después del trasplante. Rechazo celular, consiste en la necrosis de las células del tejido producida por la infiltración de linfocitos T y macrófagos del huésped.	Característica evaluada por medio de una biopsia del tejido sólido.	

Variables independientes

Cuadro 9. Variables independientes propuestas				
NOMBRE	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	DEF. CONCEPTUAL	DEF. OPERACIONAL
Edad	Cualitativa	Ordinal	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un individuo	Información obtenida de expediente.
Sexo	Cualitativa	Nominal	Características biológicas y fisiológicas que definen a hombres y mujeres	Información obtenida de expediente.
Eventos de aloinmunización	Cualitativa	Nominal	Eventos de sensibilización causantes de la aparición de anticuerpos anti-HLA específicos contra alguno de los antígenos del donante. (transfusiones sanguíneas, múltiples embarazos, trasplantes previos)	Información obtenida de expediente.

Sin embargo los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron reportados con estadística descriptiva.

Debido a la característica de la muestra fue no recomendable forzar algún tipo de inferencia estadística, principalmente por el número de tamaño de muestra obtenido. El tamaño de muestra apropiado es uno de los aspectos más importantes de cualquier diseño experimental. La elección del tamaño de muestra y la probabilidad β del error tipo II guardan una estrecha relación.

La probabilidad del error tipo II depende de la verdadera diferencia en las medias δ . A una gráfica de β contra δ para un tamaño particular de la muestra se le llama la curva de operación característica, o curva OC, de la prueba. El error β también es una función del tamaño de la muestra.²⁵

En general, para un valor dado de δ , el error β se reduce cuando el tamaño de la muestra se incrementa. Es decir, es más fácil detectar una diferencia especificada en las medias para tamaños grandes de la muestra que para los tamaños pequeños.

De tal manera que en el presente trabajo solo se muestran descriptivamente los datos obtenidos, que si bien no se obtuvo una inferencia estadística, los datos brutos son reales y válidos para darnos indicios de la implicación de anticuerpos anti HLA-DP donador específico en el rechazo o pérdida del injerto en nuestro centro hospitalario.

RESULTADOS

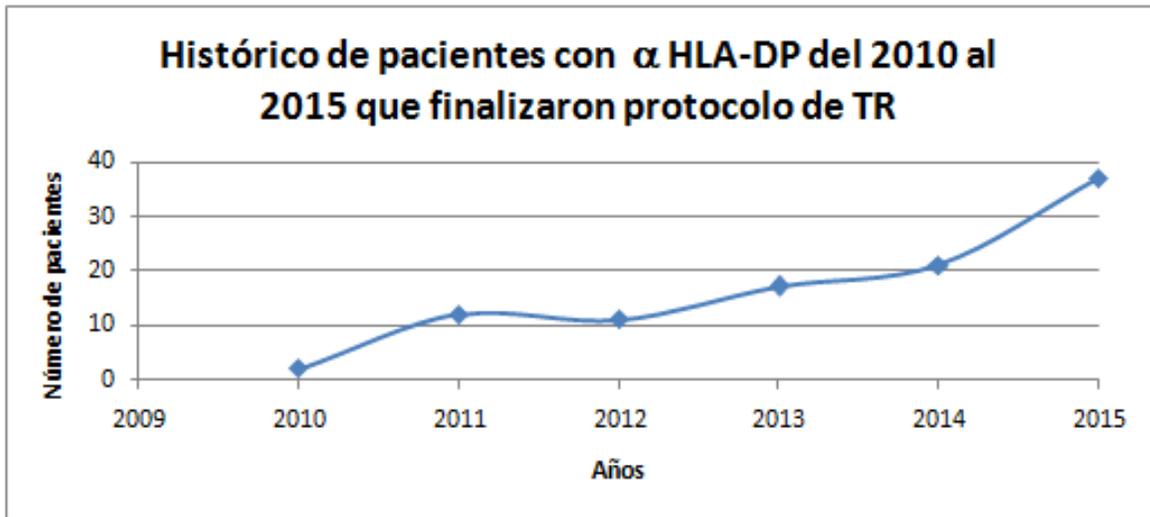
Se emplearon un total de 71 expedientes de pacientes con presencia de anticuerpos anti-DP en la prueba del Single Antigen en un periodo de 2010 a 2015, excluyendo pacientes pediátricos y receptores de donador fallecido. Cabe mencionar que el total de expedientes original es de 100 pacientes, sin embargo solo se tuvo acceso a la revisión de 71 de esos expedientes.

Se seleccionaron aquellos pacientes que tuvieran reportado rechazo al injerto renal de tipo humoral (rechazo agudo) con base en los resultados de la biopsia del injerto, obteniendo una muestra de 15 pacientes con rechazo agudo al injerto de tipo humoral. Dentro de estos 15 solamente 2 tuvieron presencia de ADE con especificidad anti HLA-DP.

En ninguno de los caso ocurrió que hubiera una incompatibilidad de grupo eritrocitario en sistemas sanguíneos mayores ABO y Rh.

A continuación se muestra una gráfica con el periodo de incidencia de anticuerpos anti HLA-DP en la prueba del *Single Antigen*.

Gráfico 5. Histórico de pacientes con anticuerpos α HLA-DP del 2010 al 2015 que finalizaron protocolo de TR



Pacientes que cumplieron requisitos iniciales para el ingreso al protocolo del año 2010 al 2015, la tendencia creciente de número de pacientes en protocolo de trasplante renal que presentan anticuerpos DP se ve aumentada de manera significativa en el último año de 2014 a 2015 .

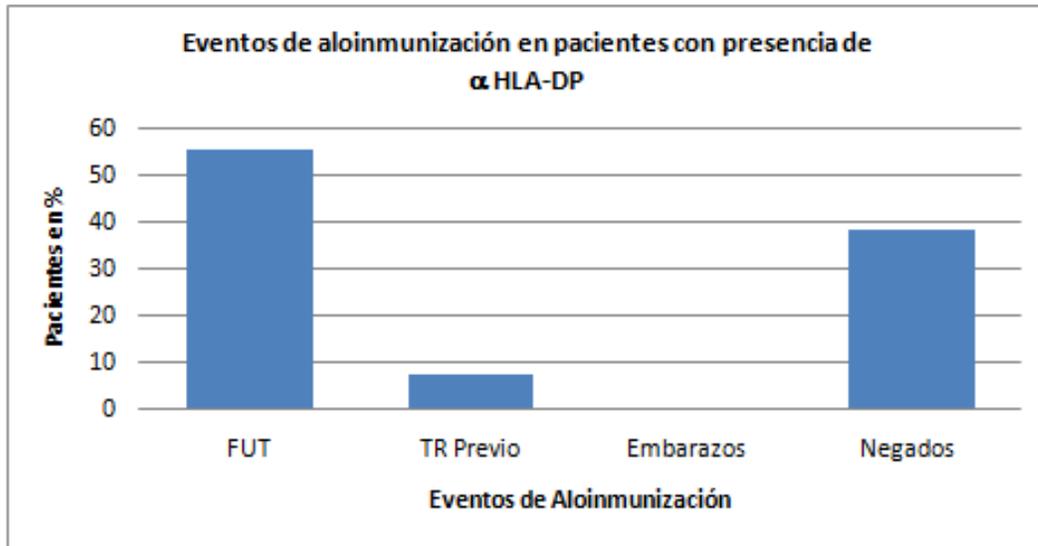
Ya que el laboratorio cuenta con el rastreo de anticuerpos con Panel Reactivo de Anticuerpos PRA, se realizó una comparación de los resultados en PRA contra los resultados obtenidos en SA obteniendo que del 100% de los casos detectados en SA solo se detectó 4% con PRA.

Haciendo referencia al marco teórico, se mencionó que existe una variedad de eventos de aloinmunización en pacientes con ERC.

1. Trasplantes previos (TR)
2. Transfusiones sanguíneas (FUT)
3. Embarazos

En el siguiente gráfico se muestran los porcentajes de eventos de aloinmunización (transfusiones sanguíneas, trasplante renal previo, embarazos), así como pacientes que negaron estos eventos en la anamnesis en pacientes con presencia de anticuerpos HLA-DP incluidos en la muestra de estudio,

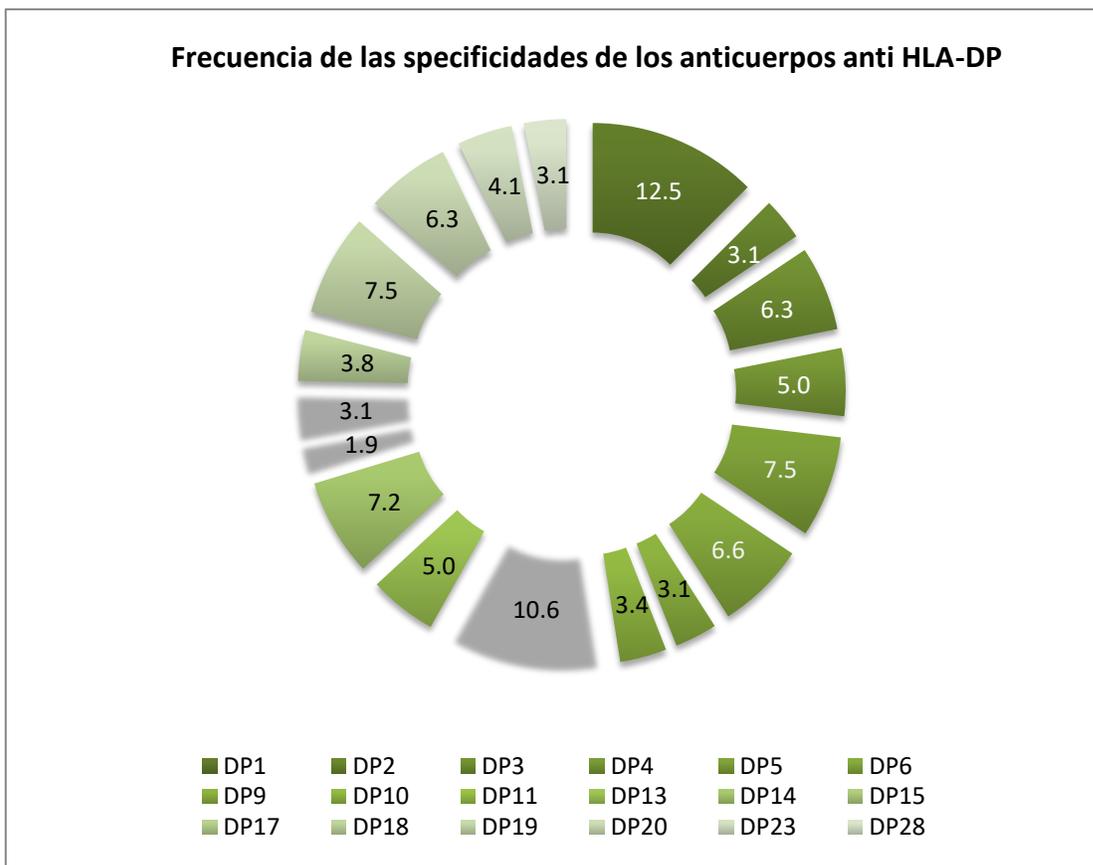
Grafico 6.- Eventos de Aloinmunización en paciente que presentaron anticuerpos anti HLA-DP total de la muestra inicial a estudiar n=100



Eventos de aloinmunización en pacientes con anticuerpos anti DP, la transfusión sanguínea fue el evento con mayor incidencia en estos pacientes, seguido por TR. No hubieron pacientes con embarazos previos/abortos. El 38% de los pacientes negaron algún evento de aloinmunización.

Las especificidades de los anticuerpos anti HLA-DP presentadas en la muestra total n=100 es la siguiente expresada en porcentajes.

Gráfico 7.- Frecuencia en porcentaje de las especificidades de los anticuerpos anti HLA-DP.



Muestra n= 100 El anticuerpo con especificidad DP de mayor incidencia en la población atendida fue el DP1 seguido por DP 11, DP15 parece ser el anticuerpo menos incidente en la población.

De la muestra inicial 100 solo 71 expedientes de pacientes fueron revisados, 15 presentaron rechazo agudo al injerto de tipo humoral con anticuerpos HLA-DP de las siguientes especificidades.

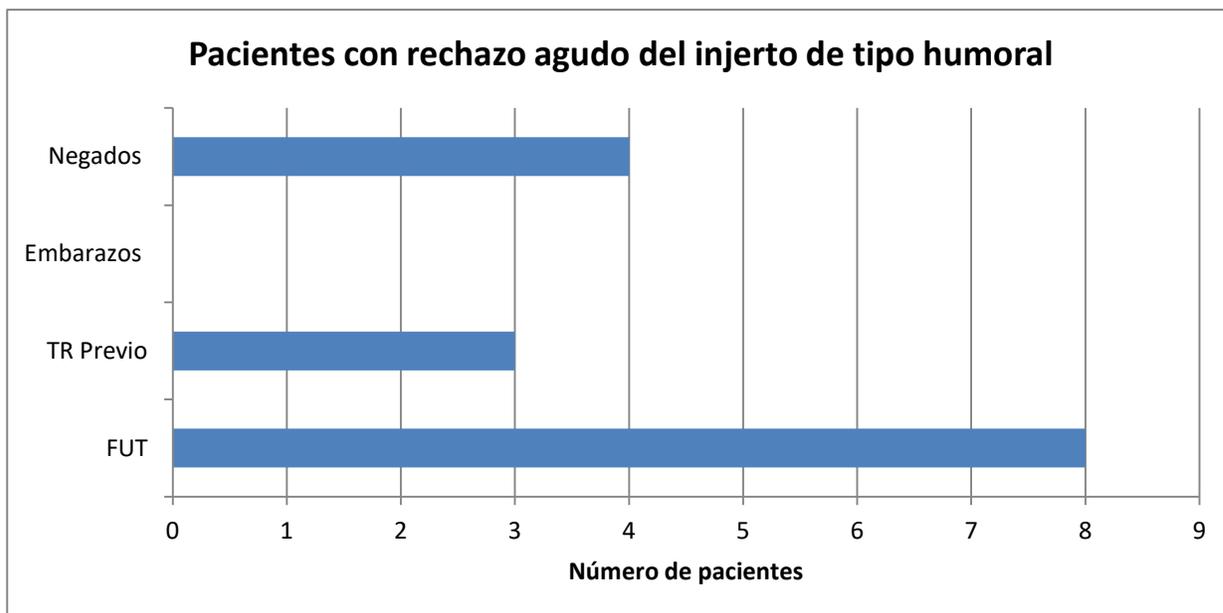
Cuadro 10.- Especificidades de los anticuerpos α HLA-DP de los pacientes que presentaron rechazo agudo del injerto de tipo humoral.

Paciente	SA CII	α -DP
1	(8%)	DP23(23:01), DP13(13:01), DP1 (01:01)
2	(5%)	DP19 (19:01)
3	(8%)	DP1(01:01),DP5(05:01)
4	(5%)	DP2(02:01), DP4(04:01,04:02), DP18(18:01)
5	(15%)	DP1(01:01), DP3(03:01), DP5(05:01)
6	(8%)	DP2(02:01)
7	(10%)	DP13(13:01), DP11(11:01), DP1(01:01)
8	(9%)	DP11(11:01)
9	(9%)	DP1(01:01)
10	(13%)	DP19 (019:01)
11	(18%)	DP1(01:01), DP11(11:01),DP6(06:01)
12	(11%)	DP14(14:01), DP23(23:01), DP6(06:01), DP1(01:01), DP10(10:01)
13	(52%)	DP9(09:01),DP5(05:01),DP14((14:01), DP17(17:01), DP10(10:01)
14	(5%)	DP1(01:01),DP5(05:01)
15	(2%)	DP17(17:01), DP14(14:01)

Resultado del SA CII expresado en porcentaje, de los anticuerpos presentes en los receptores de trasplante renal que presentaron rechazo humoral. El anticuerpo DP1 fue el de mayor coincidencia entre la muestra de 15 pacientes.

A su vez estos pacientes se agruparon con base en sus eventos de aloinmunización.

Gráfico 8.- Pacientes que presentaron pérdida temprana del injerto agrupados con base en sus eventos de aloinmunización.



La transfusión sanguínea fue el evento de aloinmunización con mayor presencia en los pacientes con rechazo (8 de 15), seguido por el trasplante renal previo (3 de 15). 4 de 15 negaron algún evento de aloinmunización.

Estos 15 binomios con rechazo fueron tipificados en el alelo HLA-DP con los siguientes resultados de los loci HLA-DPB1 y HLA-DPA1

Cuadro 11. Resultados de las tipificaciones de los 15 binomios que presentaron pérdida temprana del injerto. Resultado expresado en alelos y agrupaciones.

	HLA-DP (Receptor)		HLA-DP (donador)	
1	DPA1*01:03/01:13	DPB1*04:02/ 04:02P	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:02/ 04:02P
2	DPA1*01:05/02:01	No hibridación de la muestra	DPA1*01:03/02:01	DPB1*04:01/11:01P
3	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:01/04:02	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:02/ 04:02P
4	DPA1*01:03/02:01	DPB1*04:01/17:01	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:02/04:01
5	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:02/04:02	DPA1*01:03/02:01	DPB1*05:01/04:02
6	DPA1*01:03/02:01	DPB1*04:02/17:01	DPA1*01:03/02:01	DPB1*04:02/17:01
7	DPA1*01:03/02:01	DPB1*04:01/05:01	DPA1*01:03/01:03	DPB1*02:01/04:01
8	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:02/04:02P	DPA1*01:03/02:01	DPB1*04:02P/10:01P
9	DPA1*01:03/02:02	DPB1*03:01/0402	-	-
10	DPA1*01:03/02:01	DPB1*01:01P/03:01P	DPA1*01:03/01:03	DPB1*03:01P/04:02
11	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:02P/04:02P	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:02P/04:02P
12	DPA1*02:02/04:01	DPB1*04:02P/05:01P	DPA1*01:03/04:01	DPB1*04:01P/04:02P
13	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:01/04:02P	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:01/04:02P
14	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:02/04:02P	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:02/04:02P
15	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:01P/04:02P	DPA1*01:03/01:03	DPB1*04:02/04:02P

De los 15 binomios con rechazo al injerto, solo fueron tipificados en su totalidad 13 de ellos, posiblemente por degradación de la muestra no se llevo a cabo la hibridación de la misma para la tipificación.

Los resultados fueron validados con las tipificaciones de los controles de calidad externos (UCLA).

Cuadro 12. Resultados del consenso del control de calidad externo.

DPA1		DPB1	
02:01	02:02	05:01	13:01
01:03	01:03	04:01	04:01
01:03	01:03	04:02	04:02
01:03	01:03	02:01	04:01
01:03	02:01	03:01	10:01
01:03	01:03	04:01	04:02

Cuadro 13. Resultados reportados por el laboratorio de HLA BCS CMN SXXI con la técnica SSO-LUM-OL.

DPA1		DPB1	
02:01	02:02	05:01P	13:01P
01:03	01:03/01:13	04:01	04:01
01:03	01:03/01:13	04:02	04:02
01:03	01:03/01:13	02:01	04:01
01:03/01:013	02:01	03:01	10:01
01:03	01:03	04:01	04:02

De los pacientes tipificados para HLA-DP solamente dos presentan ADE con la siguiente Intensidad de Fluorescencia Media (MFI)

Cuadro 14. MFIs Reportadas de los ADE HLA-DP

# Paciente	MFI (Intensidad de Florescencia Media) de los anticuerpos donador específico	
4	AC1 (04:02)	2400,96
5	AC2 (05:01)	1000,19

Intensidad de fluorescencia media de los ADE en el binomio 4 MFI 2400.96 con especificidad

DP*0402 y binomio 5 MFI 1000.19 con especificidad DP*05:01

La tipificación de los diversos antígenos del sistema HLA no HLA-DP fue realizada por diferentes técnicas y fueron obtenidos de manera retrospectiva de la base de datos del Laboratorio de HLA BCS, CMN SXXI IMSS.

Cuadro 15.- Resultados de la tipificación de los 15 binomios con rechazo, sin incluir el resultado de la tipificación del antígeno HLA-DP.

	HLA RECEPTOR	HLA DONADOR
1	A2,A68(28),B62(15),B39(16),Cw1,Cw7,DR4,DR4,DQ8(3),DQ8(3).	idem a R
2	A11,A68(28),B44(12),B45(12),Cw6,Cw7,DR1,DR4,DQ8(3),DQ5(1).	A3,A68(28),B45(12),B7,Cw6,Cw7,DR4,DR15(2),DQ8(3),DQ6(1).
3	A2,A2,B39(16),B41,Cw7,Cw7,DR4,DR11(5),DQ7(3),DQ8(3)	A24(9),A31(19),B48,B52(2),Cw8,Cw15,DR4,DR14(6),DQ7(3),DQ8(3).
4	A2,A68(28),B65(14),B35,DR1,DR14(6),DQ5(1),DQ7(3)	A2,A2,B61(40),B35,DR14(6),DR14(6),DQ7(3),DQ7(3).
5	A24(9),A68(28),B62(15),B39(16),Cw1,Cw7,DR8,DR8,DQ4,DQ4	A68(28),A68(28),B39(16),B48,Cw7,Cw8,DR8,DR8,DQ4,DQ4.
6	A2,A2,B71(70),B39(16),DR17(3),DR4,DQ2,DQ8(3).	A2,A2,B71(70),B39(16),Cw10,Cw7,DR17(3),DR16(2),DQ2,DQ7(3).
7	A3,A30(19),B38(16),B57(17),Cw6,Cw12,DR4,DR15(2),DQ8(3),DQ6(1)	A3,A11,B38(16),B51(5),DR15(2),DR16(2),DQ5(1),DQ6(1)
8	A2,A68(28),B39(16),B48,Cw10(3),Cw8,DR4,DR4,DQ8,DQ8.	A24(9),A26(10),B61(40),B44(12),Cw10(3),Cw4,DR7,DR8,DQ2,DQ4
9	A11,A68(28),B35,B35,Cw4,Cw7,DR4,DR8,DQ8,DQ4.	A2,A11,B35,B35,Cw4,Cw4,DR8,DR8,DQ4,DQ4
10	A68(28),A68(28),B7,B51(5),Cw15,Cw15,DR1,DR8,DQ4,DQ5(15)	A2,A68(28),B35,B51(5),Cw4,Cw15,DR8,DR8,DQ4,DQ4.
11	A22,A24(9),B39(16),B39(16),Cw7,Cw7,DR4,DR4,DQ8(3),DQ8(3).	A22,A24(9),B39(16),B39(16),Cw7,Cw7,DR4,DR4,DQ8(3),DQ8(3).

12	A2,A68(28),B39(16),B60(40),Cw10(3),Cw10(3),DR4,DR15(2),DQ6,DQ8.	A30(19),A68(28),B27,B39(16),Cw2,Cw10(3),DR15,DR15,DQ6(1),DQ6(1).
13	A2,A11,B62(15),B53,Cw1,Cw4,DR8,DR13(6),DQ4,DQ6(1)	A2,A68(28),,B62(15),B39(16),Cw1,Cw7,DR4,DR8,DQ4,DQ8.
14	A2,A24(9),B39(16),B61(40),Cw7,Cw10(3),DR14(6),DR8,DQ7(3),DQ4	A2,A24(9),B35,B61(40),Cw10(3),Cw4,DR8,DR14(6),DQ7(3),DQ4
15	A2,A24(9),B62(15),B38(16),Cw1,Cw12,DR4,DR14(6),DQ8(3),DQ5(1)	A2,A2,B62(15),B48,Cw1,Cw8,DR4,DR4,DQ8(3),DQ8(3).

Tipificación de los alelos no DP de los binomios tipificados, resultados obtenidos de la base de datos del laboratorio de HLA.

Con los resultados de la tipificación del sistema HLA obtenemos que en la siguiente tabla se muestra la compatibilidad de los 15 binomios comparando los antígenos del sistema HLA tipificados que comparten.

Cuadro 16.- Número de antígenos del sistema HLA que comparten los binomios con rechazo agudo y/o pérdida temprana del injerto.

Binomio	Grado de compatibilidad de alelos HLA No DP	Grado de compatibilidad de alelos DPB1
1	Idem a R	Idem a R
2	6 de 10	No hibridación de la muestra
3	4 de 10	1 de 2
4	4 de 8	1 de 2
5	7 de 10	1 de 2
6	6 de 8	2 de 2
7	4 de 8	1 de 2
8	1 de 10	1 de 2
9	5 de 10	No hibridación de la muestra
10	5 de 10	1 de 2
11	Idem a R	Idem a R
12	5 de 10	1 de 2
13	5 de 10	2 de 2

14	8 de 10	2 de 2
15	5 de 10	1 de 2

Con rojo se representan los binomios con ADE, con azul los binomios de Donador Vivo Emocionalmente Relacionado y en negro los binomios Donador Vivo Relacionado.

Analizando los grados de compatibilidad (cuadro 20) resulta que de nuestra muestra de binomios el 100% (n=11) sin contar a los binomios emocionalmente relacionados y las muestras que no hibridaron en la tipificación, observamos que un 82% comparte un haplotipo en los antígenos del sistema HLA-A, -B, -C,-DR,-DQ mientras que en el antígeno HLA-DP solo se comparte en un 55%.

Del 82% que comparte un haplotipo el 27% es correspondiente a aquellos que comparten ambos alelos HLA-DP, mientras que el 18% del total que comparten ambos haplotipos comparten de la misma manera los alelos del antígeno HLA-DP.

Cuadro 17.- Resultados de la compatibilidad de los binomios que presentaron rechazo			
HLA-A, -B, -C,-DR,-DQ		HLA-DP	
1 Haplotipo	2 Haplotipos (Idem)	1 Alelo	2 Alelos (idem)
82%		55%	27%
	18%		18%

Resultados expresados en porcentaje con respecto al total n=11, excluyendo a los binomios de donador emocionalmente relacionado y de las muestras que no hibridaron.

DISCUSIÓN

Para presente estudio se llevó a cabo el análisis retrospectivo de los pacientes con presencia de anticuerpos anti HLA-DP, observamos que en un periodo de cinco años solamente un total de 100 candidatos fueron reconocidos, lo cual nos habla de una baja presencia de estos anticuerpos en la población atendida en este centro hospitalario.

No solo se ha presentado la implicación de estos anticuerpos en pérdidas tempranas del injerto, sino se han reportado casos de rechazo crónico con anticuerpos HLA-DP de novo.²⁶²⁷

De manera empírica la aparición de anticuerpos HLA-DP y/o la disparidad de este locus recientemente ha tomado presencia en casos clínicos en cuanto a la pérdida de un injerto renal sea un primer trasplante o un retrasplante.²⁸

En este estudio realizado solo se consideraron anticuerpos preformados que pudieran implicar un riesgo en el éxito del trasplante.

En el Gráfico 5 podemos observar que en el último año 2015 ha habido un incremento en la detección de estos anticuerpos, podemos pensar que este comportamiento se debe un tanto a la demanda de trasplantes que ha tenido el centro hospitalario, tan solo para este año en la Ciudad de México se realizaron un total de 730 trasplantes de riñón, teniendo por entendido que el HE CMN SXXI es el segundo centro de trasplantes más activo en la ciudad, reportando un total de 41 trasplantes para el primer trimestre del año 2016. Además se debe tomar en cuenta que la prevalencia de la ERC ha ido en aumento en los últimos años, se han realizado varios estudios donde se han determinado variables que propician la aparición de la enfermedad en personas jóvenes, las causas incluyen: factores ocupacionales (uso de pesticidas y exposición al sol), hábitos (reducida ingesta de agua, consumo de AINES, analgésicos y uso reducido de fármacos renoprotectores), y lesiones de pigmento de mioglobina o hemoglobina que pueden bloquear los vasos sanguíneos del riñón²⁹

A su vez el aumento en la demanda de la sustitución renal con TR y la mejora en los esquemas inmunosupresores así como el avance y la implementación de mas y nuevas técnicas de laboratorio para la histocompatibilidad en el trasplante, han permitido el incremento en protocolos de segundos y terceros trasplantes, debido a esto encontramos una mayor presencia de anticuerpos. En un estudio reciente realizado en Portugal se estudiaron los efectos de los eventos de aloinmunización en la presencia de anticuerpos en pacientes con protocolo de TR, se describe el trasplante previo como el evento de aloinmunización que deriva en una mayor presencia de anticuerpos principalmente anticuerpos de clase II.

En específico para los anticuerpos anti DP hay una presencia del 15.4 % teniendo una aloinmunización con un trasplante renal previo, siendo significativamente mayor que en la sensibilización producida para el mismo locus en una transfusión sanguínea o un embarazo 2.4 y 8.6% respectivamente.³⁰

En algunos estudios se menciona que la presencia de los anticuerpos anti HLA-DP en los pacientes antes del trasplante renal es alrededor del 14% y una presencia del 77% encontrada después del trasplante.³¹

De esta manera el comportamiento en el aumento de la sensibilización para este antígeno en los últimos años va de la mano con el aumento de la aloinmunización por trasplantes previos.

Como ya se ha mencionado la prueba de PRA apoya en la determinación del grado de sensibilización de un paciente contra antígenos del sistema HLA, pero hablando específicamente del antígeno HLA-DP tenemos que esta prueba es limitada con respecto al Single Antigen, ya que solo logró detectar anticuerpos anti DP solamente en el 4% de todos los casos incluidos en el protocolo.

Esto se puede explicar debido a la naturaleza de la técnica, en donde tenemos diferentes antígenos adsorbidos en una sola perla, sin embargo se esperaría que esta prueba tuviera una mayor sensibilidad con respecto al SA aunque una menor especificidad.

Con los resultados observados en el laboratorio vemos que la técnica del SA tiene una mayor sensibilidad y especificidad para detectar estos anticuerpos anti HLA-DP al tener un antígeno y no varios antígenos purificados por perla.

También se sabe que los resultados en estas técnicas de rastreo de anticuerpos se ven afectados por diversos factores como el efecto de prozona, por lo cual aunque haya la presencia del anticuerpo la técnica es incapaz de detectarlo. Recientemente Tambur et al del laboratorio de inmunología del trasplante en Chicago, realizaron un comparativo de SA, la fijación de C1q, y la determinación del SA con diluciones para ver los efectos de poszona en el rastreo de anticuerpos para diferentes loci del sistema HLA, entre sus resultados se encuentra que el locus HLA-DP es el más difícil de evaluar ya que solamente algunas perlas dieran positivo para éste, adicionalmente fue el locus en el que hubo una mayor discrepancia entre los resultados dando a notar que existen una serie de factores inhibitorios adicionales con respecto a los demás loci.³²

En el gráfico 6 observamos que las transfusiones sanguíneas son el evento de alloinmunización con mayor incidencia en nuestra población, cabe destacar que en el protocolo no hubo pacientes con embarazos previos y/o abortos.

El TR es el de menor incidencia y como se mencionó anteriormente es el evento de alloinmunización que provoca una mayor sensibilización para antígenos Clase II del sistema HLA además de provocar anticuerpos más patogénicos.

Sin embargo en nuestro estudio no se observó este comportamiento ya que la mayoría de los anticuerpos anti DP y los anticuerpos ADE se presentaron con antecedentes de transfusiones, se esperaba que los casos con trasplante renal previo reportaran ADE. Este puede ser un resultado sesgado por el tamaño de la muestra.

En cuanto a las especificidades de los anticuerpos encontrados, el de mayor frecuencia en porcentaje fue contra el antígeno HLA-DP1 con un 12,5% y el menor fue HLA-DP28 con una frecuencia del 3,1%. Todas las especificidades se

reportan con la designación serológica del antígeno, sin embargo hasta la fecha oficialmente se ha designado valor serológico del antígeno HLA-DP1 al 4.

En nuestra muestra estudio no se reportaron anticuerpos contra la cadena DPA en ninguno de los pacientes, se sospecha de papel que juega el polimorfismo de la cadena DPA1 en la intensidad y especificidad de la reactividad antígeno - anticuerpo con el heterodímero pero se necesita más investigación al respecto.

Lo que ha sido francamente demostrado es un alto nivel de desequilibrio de enlace entre DPA1 y DPB1 debido a la posibilidad de combinaciones no permitidas para el heterodímero que podrían ser inestables en la superficie celular. Sugiriendo que para el heterodímero DPA1-DPB1, la unidad de selección es la combinación de los aminoácidos de los epitopos contribuidos por ambos genes DPA1 y DPB1.²⁴

Aunque no todos los binomios presentaron ADE aproximadamente el 21% de todos los pacientes con la presencia de anticuerpos anti DP presentaron una pérdida temprana del injerto con una biopsia que sugiere un rechazo de tipo humoral.

En el cuadro 13 se muestran las especificidades de los anticuerpos presentes en los pacientes con rechazo del injerto de tipo humoral, lo que podemos destacar es que la especificidad con mayor presencia fue DP1 con una incidencia en prácticamente la mitad de las muestras (8/15)

Algunos investigadores muestran que las incompatibilidades HLA-DP entre donador-receptor no tienen una gran influencia en el éxito del primer trasplante renal, pero han tenido un impacto cuando se habla de un retrasplante³³, esto empata con lo observado en el presente estudio.

Comparando entre lo reportado por el grafico 6 y el grafico 8 de los resultados, por eventos de alloinmunización observamos que el 19% de los pacientes con FUT presentaron rechazo, esto por arriba de aquellos pacientes que negaron un evento de alloinmunización 17%. En comparación con aquellos que presentaban un TR previo, este fue el que mayor porcentaje de rechazo tuvo con un 60% (3/5). Esto

concuera con lo observado por Thauat³³ el cual por análisis de las incompatibilidades de los epitopes DP determina que el evitar o eliminar anticuerpos DP preformados por trasplantes previos o embarazos se ve traducido en un mejor éxito en el trasplante.

La tipificación del locus HLA-DP se realizó a los quince binomios con rechazo por metodología PCR-SSO, sin embargo como se muestra en el cuadro 14, no se logró tipificar a dos de los binomios debido a condiciones de la muestra. Se determinó tanto la cadena A1 como la B1, que son los genes activos que codifican para la molécula HLA-DP.

El polimorfismo de la molécula HLA-DP está mayormente concentrada en 6 regiones hipervariables (HVRs) de la A-F, en el exón dos del gen DPB1. Como lo muestran los resultados en la cadena DPB1 es donde residen la mayor cantidad de polimorfismos del antígeno HLA.DP, en comparación con la cadena DP-A1 que en general es muy constante con la molécula DPA1*01:03 en la mayoría de las muestras analizadas. En general el polimorfismo de DPA está restringido e involucra menos aminoácidos en la secuencia que DPB, así DPA solo se divide en 4 grupos DPA1-*01: 04.

Como se comentó la cadena DPB1 de la molécula HLA-DP es la más susceptible a cambios y a contener mutaciones, dando origen a una molécula en extremo polimórfica. Dicha característica complica su determinación por la metodología empleada, dando paso a una vasta cantidad de ambigüedades en los resultados.

Es de saberse que la tipificación de otros loci del sistema HLA se apoya no solo en los resultados obtenidos en la técnica per se. La asignación de un fenotipo involucra un análisis que va de estudiar el desequilibrio de enlace que presentan los genes codificantes para estas moléculas, como la frecuencia poblacional de las mismas.

El antígeno HLA-DP es una molécula que recientemente ha atraído el interés de líneas de estudio ya que se creía de muy poca relevancia clínica, por tanto los datos sobre esta son escasos y limitados a la población en donde se realiza dicha

investigación. En México no contamos aún con un estudio de la frecuencia alélica HLA-DP para nuestra población.

Complementando lo mencionado, el desequilibrio de enlace entre los loci del sistema HLA se debe a la cercanía física que se presenta entre ellos. La molécula DP no presenta este comportamiento, y se explica como un gen bien equilibrado en la población ya que físicamente en la secuencia génica se encuentra relativamente alejado de los demás loci del sistema HLA con una distancia aproximada de 1Mpb alejado de la molécula clásica más cercana (HLA-DQ). Esta es una distancia grande en relativo con la distancia que se encuentra entre los loci que presentan un desequilibrio de enlace fuerte, el ejemplo más claro es la distancia entre el gen DQB1 y DRB1 la cual es de tan solo aproximadamente 80Kpb.

El gen del antígeno HLA-DP al ser muy equilibrado en su segregación y no contar con datos de frecuencia alélica se vuelve algo complicado al momento de tipificar y dilucidar las ambigüedades obtenidas por la técnica usada (PCR-SSO).

La *World Marrow Donor Association* (WMDA) propone una nomenclatura para la tipificación de alelos ambiguos. Dicha nomenclatura consta de agrupar estos alelos en cajas superiores G y P como ya se ha menciona en el marco teórico. De esta manera es como se lograron resolver la mayoría de las ambigüedades dadas por la técnica, por ende gran parte de las tipificaciones se reportaron como grupos de alelos.

La técnica PCR-SSO para la tipificación del antígeno HLA-DP tiene una gran limitante al momento de determinar el alelo, resultando en muchas ambigüedades. Un estudio demostró que en comparación con la tipificación SBT-DP la técnica SSO resultó en un 30% igual en la tipificación y un 70% de resultados ambiguos, en todos los casos la técnica SSO incluía el resultado correcto obtenido por secuenciación.

La ambigüedad en los resultados se debe muy probablemente por el polimorfismo fuera de las seis HVRs, para las cuales no hay disponible una sonda de DNA en el

ensayo por SSO. A pesar de esto todos los motivos polimórficos de las seis HVRs del exón 2 pudieron ser asignados usando el método PCR-SSO.

Sin embargo para validar los resultados obtenidos en la tipificación se montaron las muestras del control de calidad externo enviado por la UCLA, acertando al 100% de las tipificaciones de los controles con base en el resultado del consenso, como se muestra en las tablas 15 y 16.

Llevado a cabo el comparativo de los anticuerpos presentes y los resultados de la tipificación HLA-DP en la búsqueda de ADE, sobresalen solamente dos casos de Anticuerpos Donador Específico en los binomios 4 y 5 reportando las MFI 2400,96 y 1000,19 respectivamente.

En cuanto a la especificidad de los anticuerpos, por limitaciones de la técnica de rastreo SA para el antígeno HLA-DP4 no puede diferenciar entre los alelos DPB1*04:02/04:01, caso del binomio 4, pero al compartir el alelo DPB1*04:01 automáticamente se asignó la especificidad de DPB1*04:02 al anticuerpo presente.

En el caso del binomio 5 la especificidad del anticuerpo es francamente marcada DPB1*05:01, siendo esta la única incompatibilidad de la cadena beta en este binomio.

En un estudio realizado tiempo atrás en el laboratorio se determinaron los valores mínimos para predecir un posible rechazo humoral dentro de la UMAE HE CMN SXXI

Ambos casos presentan un evento de aloinmunización por transfusión sanguínea, con base en lo ya estudiado para pacientes con transfusiones sanguíneas: valor mínimo de MFI para anticuerpos anti-HLA de clase I 1,320.53, valor mínimo de MFI para anticuerpos anti-HLA de clase II 1,208.73 y valor mínimo de MFI para ambas clases 1,060.69.

Uno de los valores de MFI encontrados (binomio 4) rebasa por prácticamente el doble el valor de MFI mínimo establecido para anticuerpos anti HLA de clase dos.

Mientras que el anticuerpo presente en el binomio 5 tiene una MFI muy cercana a este mínimo establecido con 320 de MFI menor, lo cual indica que estos anticuerpos pueden ser tan patogénicos como los de clase II habitualmente estudiados.

Esto permitiría decir que la presencia de estos anticuerpos podrían estar involucrados en el rechazo humoral del injerto incluso ser el causante del mismo, sin embargo también hay que tomar en cuenta que en el estudio mencionado no se implicaron anticuerpos anti DP para la determinación de los valores de MFI. Se ha demostrado que existe una diferencia significativa entre las MFIs reportadas para los anticuerpos DP con respecto DQ y DR, en donde no existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos últimos.³⁴

Un estudio realizado en el Hospital de la universidad Thomas Jefferson en EUA, reafirma los porcentajes ya mencionados de la presencia de los anticuerpos HLA-DP siendo detectables en un 5-40% de los pacientes. Además mencionan que las MFI registradas para anticuerpos DP son menores que las presentadas por los anticuerpos DR y DQ (2945 vs 7866 y 8283 respectivamente).

En cuanto al grado de compatibilidad se ha reportado que el 80% de los pacientes para trasplante renal que comparten el 100% de los antígenos comúnmente determinados para este protocolo, no comparten los mismo antígenos HLA-DP.

En nuestro caso cuadro 20 vemos los indicios del comportamiento de la molécula HLA-DP con respecto al resto de los antígenos.

Del 82% que comparte un haplotipo el 27% es correspondiente a aquellos que comparten ambos alelos HLA-DP, esto es decir que a pesar de solamente compartir un haplotipo de los antígenos HLA-A, -B, -C,-DR,-DQ comparten los dos alelos HLA-DP al igual que para los pacientes que comparten ambos haplotipos se comparten ambos alelos HLA-DP.

Algunos reportes dicen que debido al débil desequilibrio de enlace de HLA-DP con los antígenos clásicos HLA CI y CII podría presentarse un elevado porcentaje de incompatibilidad, de cualquier manera se menciona que debido a la restricción polimórfica en los motivos HVR las incompatibilidades alélicas podrían no llevar a la formación de un anticuerpo anti-DP.

En el presente estudio se reportó un porcentaje muy bajo de la presencia de anticuerpos de la especificidad del locus DP con disparidad en los binomios tipificados. Este comportamiento parece ser similar con el reportado en la literatura, donde en algunos estudios no hay la presencia de anticuerpos restringidos a la especificidad del antígeno HLA-DP diferente pero si una amplia sensibilización para el antígeno DP.

Este comportamiento ya ha sido observado en donde los anticuerpos anti HLA-DP en el suero de pacientes sensibilizados son específicos para epítopes compartidos por diferentes antígenos HLA.

Un estudio realizado en el Centro Médico de la Universidad de Maastricht (Billen 2010) menciona que los anticuerpos ADE y los No ADE en contra del antígeno DP son dirigidos al alelo per se, más bien van dirigidos a una incompatibilidad específica HVR, lo cual quiere decir que solamente un pequeño número de incompatibilidades en los epítopes puede ser reconocida por el sistema inmune del receptor, se menciona que hay una inmunodominancia en las regiones HVR-F y -C y que estas corresponden a los epítopes bien definidos serológicamente por anticuerpos monoclonales. De tal manera que como lo mencionan en otro estudio realizado por Laux³⁵, la compatibilidad inmunogenética de los epítopes DPB1 es funcionalmente más relevante que la clásica incompatibilidad a nivel alélico.

Además se han descrito relaciones interlocus que le suman importancia clínica para el estudio de este antígeno, la más representativa es la relación de la reacción cruzada que han presentado los anticuerpos DP contra el antígeno HLA-DR, principalmente DR11. Esta antigenicidad cruzada bien descrita³⁶ se debe a que la molécula DR11 tiene los aminoácidos D y E en las posiciones 57 y 58 que

se correlacionan con los aminoácidos D y E en HVR-C en las posiciones 56-57) en 7 de los 13 alelos presentes en la prueba de SA para DP.

Así es como se han reportado casos de pacientes sin incompatibilidades en el locus HLA-DP pero que presentan rechazo del injerto renal por presencia de anticuerpo de especificidad DP, dicho fenómeno se ve representado en los resultados de este estudio, muy probablemente debido a la antigenicidad cruzada.

CONCLUSIONES

- ❖ Se establece la tipificación de la molécula HLA-DP como de importancia para el rechazo de riñón en pacientes del HE CMN SXXI, IMSS.
- ❖ El análisis comparativo a nivel alélico del HLA-DP muestra sin inferencia estadística que no existe una implicación negativa de la presencia de ADE HLA-DP y el éxito en el trasplante renal en pacientes del HE CMN SXXI, IMSS.
- ❖ Más allá de la presencia de ADE DP, una alta sensibilización DP puede verse reflejado en una disminución en el éxito del trasplante renal.
 - No se recomienda la tipificación del antígeno HLA-DP como prueba de rutina para pacientes en protocolo de primer trasplante renal
 - Se recomienda la tipificación del antígeno HLA-DP en todos los pacientes en protocolo de segundo o tercer trasplante renal
 - La sensibilización para HLA-DP de los receptores de trasplante renal debe analizarse por el ensayo del antígeno único, ya que este es más sensible que PRA para detectar dichos anticuerpos.
 - El anticuerpo de mayor prevalencia fue DP1 (12.5%) en nuestra población de estudio, de manera descriptiva las especificidades presentes de los anticuerpos DP es homogénea
 - Se recomienda que los límites de las MFIs obtenidas de los anticuerpos HLA-DP sean considerados menores que los propuestos para otros antígenos HLA CII, se necesita futura investigación para determinar los mismos.
- ❖ La tipificación del locus HLA-DP por el método SSO proporciona resultados ambiguos, debe apoyarse en tablas de agrupaciones alélicas G y P para su correcto reporte.

PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO^{37,38,39,40}

La molécula HLA-DP no es una molécula ampliamente estudiada pues hasta hace algunos años no se creía de importancia en la práctica clínica.

Con el comienzo de la tipificación del locus DP y el rastreo de anticuerpos en la clínica, se desencadena una serie de investigaciones de importancia para la mejora en la atención centrada en el paciente.

La promoción de un trabajo conjunto con varios centros hospitalarios que practiquen los mismos o similares protocolos de histocompatibilidad permitirá realizar investigaciones más integrales del antígeno HLA-DP con un alcance inferencial a toda la población mexicana.

HLA-DP MFI

Determinar un límite específico de la MFI de los anticuerpos DP sería de gran apoyo para el médico, proporcionando un punto de referencia para la toma de decisiones en cuanto a la terapéutica inmunosupresora antes y después del trasplante renal.

Tipificación HLA-DP por PCR-SSP

La introducción de esta técnica llevaría a una mejora en los resultados ya que por principio de la misma, las sondas implementadas tienen una mayor especificidad derivando en menor número de ambigüedades en los resultados. Se requiere implementar un protocolo para la investigación en la implementación de esta técnica en la práctica clínica, su comparación costo/beneficio con la técnica implementada PCR-SSO y la aplicación como una técnica complementaria.

Estudio de Frecuencia alélica HLA-DP

Tener un registro por laboratorio de alelos bien documentados, mejoraría la práctica clínica de la tipificación en el laboratorio de histocompatibilidad, siendo el principal punto de apoyo para resolver ambigüedades al momento de designar un fenotipo.

Además sería de gran impacto en la alimentación de la base de datos de frecuencias alélicas para la implementación de una prueba cruzada virtual.

Implicación Clínica de la molécula HLA

Hoy en día ha sido bien descrita la implicación del alelo HLA-DPB1 en el rechazo de injerto contra huésped cuando hablamos de un trasplante de precursores hematopoyéticos, sería de suma importancia determinar el impacto en el éxito de trasplante de médula ósea en la población atendida en el HE CMN SXXI.

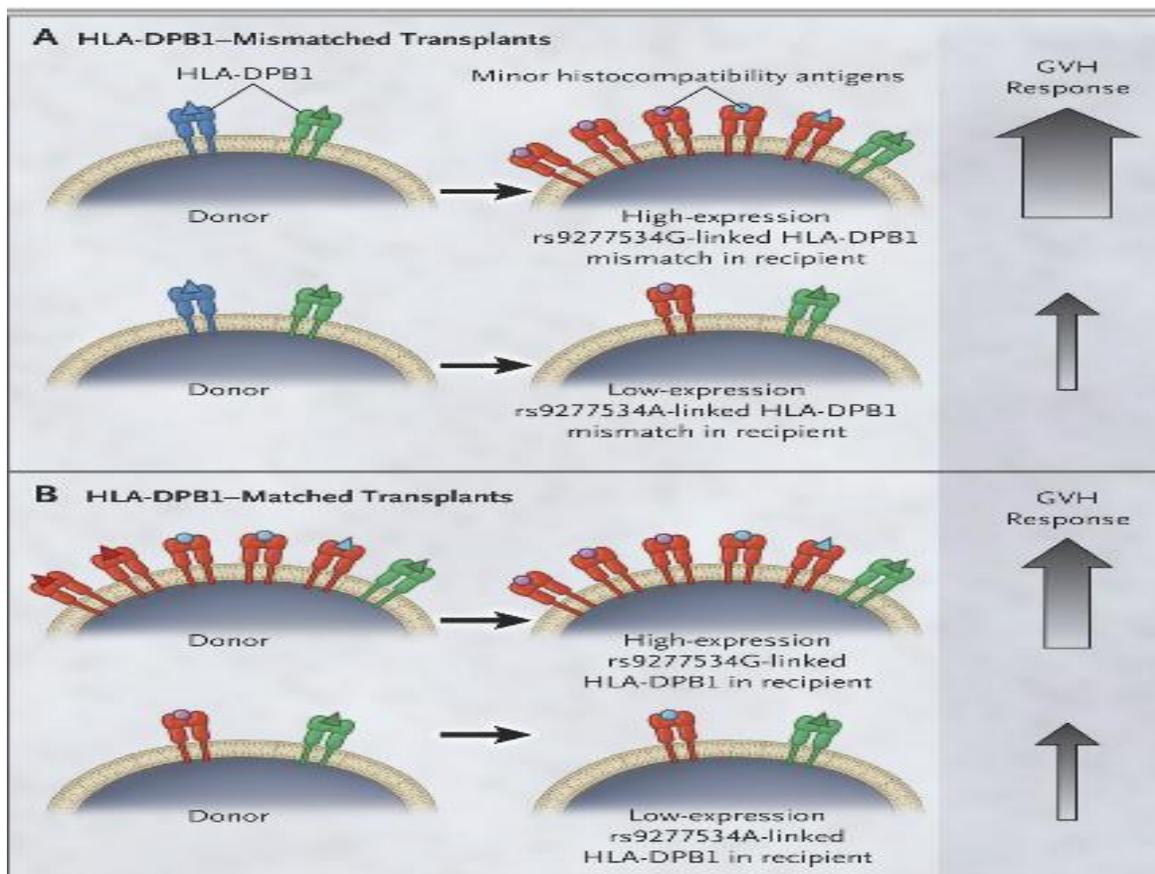


Figura 11.- Esquema propuesto del papel de la expresión HLA-DPB1 en el reconocimiento de la célula en la Enfermedad de Injerto Contra Huésped. Fuente. (Petersdorf, 2015)

La tipificación HLA-DP no solo es de importancia para el trasplante, se ha visto que puede ser de apoyo para el diagnóstico de algunas patologías como espondilitis anquilosante con antígenos de riesgo relativo alto como DPA1*01:03.

ANEXO 1

Tipificación de HLA

PCR-SSO

1. Realizar extracción del DNA a la concentración y pureza requerida.
2. Realizar la amplificación de los loci a tipificar (HLA-DPA1 y HLA-DPB1), preparando la mezcla de amplificación siguiente.
 - Muestra de DNA a la concentración necesaria para la reacción.
 - Solución D-Mix con iniciadores de la amplificación.
 - Concentración de Taq polimerasa necesaria.
3. Colocar las muestras en el bloque del termociclador e iniciar el programa de amplificación.
4. Retirar las muestras del termociclador.
5. Realizar la desnaturalización de las muestras amplificadas.
 - Agregar solución de desnaturalización e incubar por lo menos 10min.
 - Agregar solución de neutralización e incubar por 10 min a temperatura ambiente.
6. Colocar en hielo la placa con el producto de PCR neutralizado.
7. Encender el termociclador a la temperatura de 60°C
8. Preparar la mezcla de hibridación
 - Combinar volúmenes apropiados de la mezcla de perlas LABType[®] y el buffer de hibridación.
9. Adicionar la mezcla de hibridación al producto de PCR neutralizado, agitar con vortex e incubar la placa de PCR en el termociclador precalentado a 60°C por 15 min.
10. Adicionar lavado de buffer y centrifugar 5 min a 1300g.
11. Repetir el paso anterior para un total de 3 lavados.
12. Durante la tercera centrifugación preparar la solución de trabajo 1X SAPE
 - Mezcla de la solución stock SAPE con el buffer de SAPE, preparar lo necesario para el número de reacciones.

- 13.** Adicionar la solución 1X SAPE al producto de hibridación e incubar en el termociclador a 60°C por 5 min.
- 14.** Realizar un lavado con buffer de lavado 5 min a 1300g, retirar el buffer de lavado y resuspender con vortex.
- 15.** Agregar 70 uL de buffer de lavado a cada muestra y transferir a una placa de lectura.

Lectura de la muestra con Luminex® versión 2.2 o posterior

- 1.** Si no está ocupando el sistema de suministro, llenar la botella del líquido de revestimiento y cerrar la tapa.
- 2.** Una vez que el equipo ha pasado por el calentamiento, seguir con el revestimiento, enjuagar con alcohol y lavar con líquido de revestimiento. Calibrar con esferas de control y calibración, realizar 4 lavados obligatorios. Preparar el sistema de suministro una vez terminado.
- 3.** Seleccionar el ícono de NUEVO LOTE o NUEVO MULTI-LOTE. Seleccionar la mezcla correcta de perlas – verificar que el número de lote sea el correcto. Asignar un nombre a la sesión.
- 4.** Introducir el ID de la muestra o importar el ID de una lista de pacientes. Verificar la correcta posición de las muestras en la placa. Seleccionar GUARDAR.
- 5.** Si se está trabajando con un multi-lote, repetir los pasos 3 y 4 hasta completar el lote.
- 6.** Una vez terminado, seleccionar “paso único” desde la barra del menú principal. Esto permitirá verificar si la elección de la plantilla fue la correcta y asegura que la muestra se están leyendo correctamente.
- 7.** Colocar el equipo en la orientación apropiada y seleccionar INICIO – el tiempo de lectura varía entre 10 seg y 1.5 min dependiendo del recuento de perlas LABScreen®. Si la primer muestra fue leída correctamente quitar la selección de configuración única.
- 8.** Cuando el equipo termine de leer una muestra continuará con la siguiente hasta leer el total de muestras.

9. Una vez terminado el proceso se realiza un guardado automático de los datos.

Apagado (obligatorio)

1. Lavar 2X con fluido de revestimiento, sanitizar 1X con lejía (cloro) al 20%, lavar 3X con agua desionizada y remojar 1X con agua desionizada.
2. El equipo se puede apagar y aflojar la tapa de la botella del fluido de revestimiento.

Detección de anticuerpos Prueba del Antígeno Único (SA)

1. Poner una alícuota de suero en un tubo de 1.5 mL
 - Nota: Centrifugar el suero durante 10 min a 9300g para remover cualquier rastro de fibrina.
2. Agregar al tubo 5 uL de perlas Single Antigen Clase I y Clase II LABScreen®. O bien 10 µL de la mezcla de PRA CI/CII
 - Realizar vortex al reactivo al menos 20 segundos antes de su uso.
 - Mezclar suavemente el reactivo con el suero usando una pipeta.
3. Incubar durante 30 minutos sin luz vigilando que la temperatura esté entre 20 – 25 °C con agitación suave (opcional).
4. Lavar 3X usando 1ml del buffer de lavado. Centrifugar a 9,300g por 2 min.
5. Después del último lavado, retirar cuidadosamente todo el buffer.
 - Durante el tiempo de incubación preparar la anti-IgG humana de cabra conjugada con PE. Se encuentra a una concentración de 100X, combinar 1uL del anticuerpo con 99 uL de buffer de lavado. Preparar también suficiente buffer de lavado (aproximadamente 5 mL por muestra) El stock del buffer tiene una concentración 10X, llevarlo a 1X.

Marcaje de la muestra

1. Añadir 100 uL de IgG-PE a cada muestra y realizar vortex.
2. Incubar en ausencia de luz durante 30 minutos vigilando que la temperatura esté entre 20 – 25 °C con agitación suave (opcional).
3. Lavar 2X con 1mL de buffer de lavado. Centrifugar a 9,300g por 2 min.
4. Después del último lavado, retirar cuidadosamente todo el buffer.
5. Añadir 70 uL de PBS 1X a cada muestra y mezclar.
 - Nota: El volumen final tiene que ser aproximadamente de 80 uL.
6. Guardar las muestras en ausencia de luz a 4°C hasta su lectura.

Lectura de la muestra con Luminex® versión 2.2 o posterior

10. Si no está ocupando el sistema de suministro, llenar la botella del líquido de revestimiento y cerrar la tapa.
11. Una vez que el equipo ha pasado por el calentamiento, seguir con el revestimiento, enjuagar con alcohol y lavar con líquido de revestimiento. Calibrar con esferas de control y calibración, realizar 4 lavados obligatorios. Prepara el sistema de suministro una vez terminado.
12. Seleccionar el ícono de NUEVO LOTE o NUEVO MULTI-LOTE. Seleccionar la mezcla correcta de perlas – verificar que el número de lote sea el correcto. Asignar un nombre a la sesión.
13. Introducir el ID de la muestra o importar el ID de una lista de pacientes. Verificar la correcta posición de las muestras en la placa. Seleccionar GUARDAR.
14. Si se está trabajando con un multi-lote, repetir los pasos 3 y 4 hasta completar el lote.
15. Una vez terminado, seleccionar “paso único” desde la barra del menú principal. Esto permitirá verificar si la elección de la plantilla fue la correcta y asegura que la muestra se están leyendo correctamente.
16. Colocar el equipo en la orientación apropiada y seleccionar INICIO – el tiempo de lectura varía entre 10 seg. y 1.5 min. dependiendo del recuento

de perlas LABScreen®. Si la primera muestra fue leída correctamente quitar la selección de configuración única.

17. Cuando el equipo termine de leer una muestra continuará con la siguiente hasta leer el total de muestras.
18. Una vez terminado el proceso se realiza un guardado automático de los datos.

Apagado (obligatorio)

3. Lavar 2X con fluido de revestimiento, sanitizar 1X con lejía (cloro) al 20%, lavar 3X con agua desionizada y remojar 1X con agua desionizada.
4. El equipo se puede apagar y aflojar la tapa de la botella del fluido de revestimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Rodey, G. (2000). *HLA Beyond Tears: Introduction to Human Histocompatibility*. United States of America: De Novo, Inc.
- ² Natarajan, K., Li, H., Mariuzza, R. & Marguiles, D. (1999). MHC Class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenet*, 1(1), 32-46.
- ³ Sompayrac, L. (2015) *How the Immune System Works*. Malden, MA: Blackwell Science.
- ⁴ Lechler, R. & Warrens, A. (Eds)(2000). *HLA in Health and Disease*. San Diego, CA: Academic Press.
- ⁵ Sonderstrup, G. & McDevitt, H. (2001). DR, DQ, and you: MHC alleles and autoimmunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(7), 795-796. DOI: 10.1172/JCI12634.
- ⁶ NCBI (2016). HLA-DPB major histocompatibility complex, class II, DP beta, 1. Recuperado el 22 de Noviembre del 2015 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3115>.
- ⁷ López-Martínez, A., Chávez-Muñoz, C. & Granados, J. (2005). Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad. *Revista de Investigación Clínica*, 57 (2), 132-141.
- ⁸ Sidney, J., Steen, A., Moore, C., Ngo, S., Chung, J., Peters, B., & Sette, A. (2010). Five HLA-DP Molecules Frequently Expressed in the Worldwide Human Population Share a Common HLA Supertypic Binding Specificity. *The Journal of Immunology*, 184, 2492-2503. DOI: 10.4049/jimmunol.0903655
- ⁹ Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Jon.C. Aster, (2005). *Patología estructural y funcional: Robbins y Cotran*. Séptima edición. España: Elsevier.
- ¹⁰ Abbas A., Lichtman, A. & Pillai, S (2008). *Inmunología celular y molecular*. Sexta edición. Madrid, España: Mc Graw-Hill.
- ¹¹ Nefropatología. *Patología del Trasplante Renal*. Recuperado el 17 de Febrero del 2016 de: www.kidney pathology.com/Trasplante.html
- ¹² Rang, H., Dale, M., Ritter, M. & Flower, J. (2008). *Farmacología*. Barcelona, España: Elsevier.
- ¹³ Lozano, K. & Morán, M. (2015). *Determinación del antígeno único como biomarcador de rechazo agudo en pacientes en protocolo de trasplante renal de la UMAE HE CMN SXXI de 2007 a 2014*. Tesis de Licenciatura. UNAM, México.
- ¹⁴ Consejo de Salubridad General. *Guía de Referencia Rápida: Prevención, diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Renal Crónica Temprana*. Recuperado el 29 de noviembre del 2015 de: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/335_IMSS_09_Enfermedad_Renal_Cronica_Temprana/GRR_IMSS_335_09.pdf.
- ¹⁵ Instituto Nacional de Salud Pública (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, Resultados Nacionales*. Recuperado el 9 de Noviembre del 2015 de: http://ensanut.insp.mx/doctos/ENSANUT2012_PresentacionOficialCorta_09Nov2012.pdf

-
- ¹⁶ Jofre, R., López-Gomez, J. & Valderrábano, F. (2000). Quality of life form patient groups. *Kidney International*, 57 (74), 121-S130. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.07420.x
- ¹⁷ Méndez-Durán, A., Méndez-Bueno, F., Tapia-Yañez, T., Muñoz, A. & Aguilar-Sánchez, L. (2010). Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Trasplante*, 31(1), 7-11. DOI: 10.1016/S1886-2845(10)70004-7.
- ¹⁸ Tanabe, K., Takahashi, K., Sonda, K., Tokumoto, T., Ishikawa, N., Kawai, T., Fuchinoue, S., Oshima, T., Yagisawa, T., Nakazawa, H., Goya, N., Koga, S., Kawaguchi, H., Ito, K., Toma, H., Agishi, T. & Ota, K. (1998). Long-Term results of ABO-Incompatible living kidney transplantation: a single center experience. *Transplantation*, 65(2), 224-8.
- ¹⁹ De-Leo-Cervantes, C. (2005). Pruebas de histocompatibilidad en el programa de trasplante. *Revista de Investigación clínica*, 57 (2), 142-146.
- ²⁰ Histocompatibilidad e inmunogenética. *Nomenclatura de HLA*. Recuperado el 24 de Marzo del 2016 de: <http://www.histocompatibilidad-e-inmunogenetica.com/fundamentos/capitulo-3-el-complejo-mayor-de-histocompatibilidad/nomenclatura-hla/>
- ²¹ Chang-Monteagudo, A., Bencomo- Hernández, A., Morera-Barrios, M., Ustáriz-García, C. & Guardia- Peña, O. (2014). Evolución de la nomenclatura de los factores del sistema de antígenos leucocitarios humanos. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 30(1). Recuperado de: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/125/99>
- ²² Encarnación, M., Fernández, A., Franco, E., González, M. & Núñez, A. (2004) Comparación de métodos de estudio de anticuerpos anti-HLA y pruebas cruzadas en el trasplante renal. *Actualizaciones en Trasplantes*. Recuperado de: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/trasplante/inmunologia04.pdf>
- ²³ Bachelet, T., Martinez, C., Del Bello, A., Couzi, L., Kejji, S., Guidicelli, G., Lepreux, S., Visentin, J., Congy-Jolivet, N., Rostaing, L., Taupin, J., Kamar, N., & Merville, P. (2016). Deleterious Impact of Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Toward HLA-Cw and HLA-DP in Kidney Transplantation. *Transplantation*, 100(1), 159-166. DOI: 10.1097/TP.0000000000000821.
- ²⁴ Fillipone E., & Faber J. (2015). Humoral immunity in renal transplantation: epitopes, Cw and DP, and complement-activating capability – an update. *Clinical Transplantation*, 29, 279-287. DOI: 10.1111/ctr.12524
- ²⁵ Martínez, J. (2013). Anticuerpos, antígenos leucocitarios humanos y biomoduladores en los efectos adversos agudos de las transfusiones. *Gaceta Médica de México*, 149,81-88.
- ²⁶ Douglas C. Montgomery,(2004). *Diseño y análisis de experimentos*. Segunda edición. Traducción,DF, México: Limusa Wiley.

-
- ²⁷ Cippà, P., Gaspert, A., Etter, C., Guenduez, Z., Ferrari-Lacraz, S., Rüsi, B. & Fehr, T. (2014). Late antibody-mediated rejection by de novo HLA-DP-specific antibody after renal transplantation: A case report. *Human Immunology*, 75, 462-465. DOI: 10.1016/j.humimm.2014.02.008.
- ²⁸ Jolly, E., Key, T., Rasheed, H., Morgan, H., Butler, A., Pritchard, N., Taylor, C. & Clatworthy, M. (2012). Preformed Donor HLA-DP-Specific Antibodies Mediate Acute and Chronic Antibody-Mediated Rejection Following Renal Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 12(10), 2845-2848. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04172.x.
- ²⁹ Mierzejewska, B., Schroder, P., Baum, C., Blair, A., Smith, C., Duquesnoy, R., Marrari, M., Gohara, A., Malhotra, D., Kaw, D., Liwski, R., Rees, M., & Stepkowski, S. (2014). Early acute antibody-mediated rejection of a negative flow crossmatch 3rd Kidney transplant with exclusive disparity at HLA-DP. *Human Immunology*, 75, 703-708. DOI: 10.1016/j.humimm.2014.04.001.
- ³⁰ Salvador, B., Rodríguez, M., Ruipérez, L., Ferré, A., Cunillera, O. & Rodríguez, L. (2015). Enfermedad renal crónica en Atención Primaria: prevalencia y factores de riesgo asociados. *Atención Primaria*, 47 (4), 236-245. DOI: 10.1016/j.aprim.2014.06.003
- ³¹ Lopes, D., Barra, T., Malheiro, J., Tafulo, S., Martins, L., Almeida, M., Pedroso, S., Dias, L., Castro, A. & Cabrita, A. (2015) Effect of Different Sensitization Events on HLA Alloimmunization in Kidney Transplantation Candidates. *Transplantation Proceedings*, 47, 894-897. DOI: 10.1016/j.transproceed.2015.03.014.
- ³² Billen, E., Christiaans, M., Doxiadis, I., Voorter, C. & Van den Berg-Loonen, E. (2010) HLA-DP antibodies before and after renal transplantation. *Tissue Antigens*, 75, 278-285. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2009.01428.x.
- ³³ Tambur, A. Herrera, N., Haarberg, K., Cusick, M., Friedewald, J. & Glotz, D. (2005) Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. *American Journal of transplantation*, 15, 2421-2430. DOI: 10.1111/ajt.13295.
- ³⁴ Thauvat, O., Hanf, W., Dubois, V., McGregor, B., Perrat, G., Chauvet, C., Touraine, J. & Morelon, E. (2009). Chronic humoral rejection mediated by anti-HLA-DP alloantibodies: Insights into the role of epitope sharing in donor-specific and non-donor specific alloantibodies generation. *Transplant Immunology*, 20, 209-211. DOI: 10.1016/j.trim.2008.12.006.
- ³⁵ Ling, M., Marfo, K., Masiakos, P., Aljanabi, A., Lindower, J., Glicklich, D., Boccardo, G., Greenstein, S., Chaochnick-Friedmann, J., Kayler, L., Kinkhabwala, M. & Akalin, E. (2012). Pretransplant anti-HLA-Cw y anti-HLA-DP antibodies in sensitized patients. *Human Immunology*, 73, 879-883. DOI: 10.1016/j.humimm.2012.07.320
- ³⁶ Laux, G., Mansmann, U., Deufel, A., Opelz, G. & Mytilineos, J. (2003). A new epitope-based HLA-DPB matching approach for cadaver kidney retransplants. *Transplantation*, 75, 1527-32. DOI: 10.1097/01.TP.0000061759.57702.8A.

-
- ³⁷ Bodme, J., Bodmer, W., Heyes, J., So, A., Tonks, S., Trowsdale, J. & Young, J. (1987) Identification of HLA-DP polymorphism with DP alpha and DP beta probes and monoclonal antibodies: correlation with primed lymphocyte typing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(13), 4596–600.
- ³⁸ Mack, S., Cano, P., Hollenbach, J., He, J., Hurley, C., Middleton, D., Moraes, M., Pereira, S., Kempenich, J., Reed, E., Setterholm, M., Smith, A., Tilanus, M., Torres, M., Varney, M., Voorter, C., Fischer, G., Fleischhauer, K., Goodridge, D., Klitz, W., Little, A., Majers, M., Marsh, S. Müller, C., Noreen, H., Rozemuller, E., Sánchez-Mazas, A., Senitzer, D., Trachtenberg, E. & Fernández-Vina, M. (2013). Common and Well-Documented HLA Alleles. *Tissue Antigens*, 81(4), 194-203. DOI: 10.1111/tan.12093.
- ³⁹ Lauterbach, N., Voorter, C., Stallinga, C., Groeneweg, M., Wieten, L. & Tilanus, M. (2012). Full-length HLA-DPB1 diversity in multiple alleles of individuals from Caucasian, Black, or Oriental origin. *Tissue Antigens*, 79, 165-173. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2011.01834.x
- ⁴⁰ Petersdorf, E., Malkki, M., O’huigin, C., Carrington, M., Gooley, T., Haagenson, M., Horowitz, M., Spellman, S., Wang, T. & Stevenson P. (2015). High HLA-DP Expression and Graft-versus-Host Disease. *The new England Journal of Medicine*, 373(7), 599-609. DOI: 10.1056/NEJMoa1500140
- ⁴¹ Díaz-Peña, R., Castro-Santos, P., Aransay, A., Brüges-Armas, J., Pimentel-Santos, F. & López-Larrea, C. (2013). Genetic study confirms association of HLA-DPA1/ 01:03 subtype with ankylosing spondylitis in HLA-B27-positive populations. *Human Immunology*, 74, 764-767. DOI: 10.1016/j.humimm.2013.02.001
