



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN**

**“SALVADOR ZUBIRÁN”**

*Utilidad de la determinación de anticuerpos  
anti-HLA donador específico en la predicción del  
rechazo renal*

**T E S I N A**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**ESPECIALISTA EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

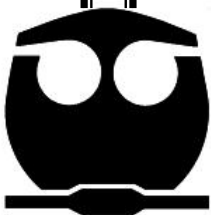
**PRESENTA**

**Q.F.B DULCE GRACIELA REYES REYES**

**ASESOR**

**DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019**





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: Dr. Rodolfo Pastelín Palacios

Vocal: Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez

Secretario: Dr. Mario Adán Moreno Eutimio

Vocal: Dr. Constantino III Roberto López Macías

Vocal: M. en C Julio César Martínez Álvarez

## **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Departamento de Trasplantes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y  
Nutrición Salvador Zubirán

## **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Julio Granados Arriola

\_\_\_\_\_

## **SUSTENTANTE:**

Q.F.B. Dulce Graciela Reyes Reyes

\_\_\_\_\_



---

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres que me brindaron todo el apoyo para realizar y finalizar la Especialidad en Bioquímica Clínica.

Agradezco a mi asesor el Dr. Julio Granados Arriola por su apoyo para que se llevara a cabo el trabajo de investigación.

A todo el equipo del laboratorio de histocompatibilidad: Q.F.B. Natalian Castelan Carmona, Biol. Norma González Tableros, Biol. Mayra López Martínez, Q.F.B. Adriana Arvizu Hernández y Q.F.B. Adrián de Santiago Zárate, quienes colaboraron en este proyecto, gracias por todo su apoyo.

Al Departamento de trasplantes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

A mi alma mater la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme la oportunidad de formarme como profesionista.



---

## Índice

1. Resumen.....	5
2. Abreviaturas.....	6
3. Introducción.....	7
3.1 Inmunología de trasplante.....	10
3.1.1 Antígenos leucocitarios humano (HLA).....	10
3.1.2 Moléculas de clase I.....	12
3.1.3 Moléculas clase II.....	14
3.1.4 Reconocimiento antigénico.....	14
3.1.5 Reconocimiento antigénico implicado en el trasplante.....	17
3.2 Tipos de rechazo de tejido.....	20
3.2.1 Diagnóstico de rechazo: clasificación de Banff.....	23
4. Justificación.....	29
5. Hipótesis.....	29
6. Objetivos.....	29
6.1 Objetivo general.....	29
6.2 Objetivos particulares.....	29
7. Material y métodos.....	30
7.1 Criterios de inclusión.....	30
7.2 Detección de anticuerpos anti-HLA donador específico.....	30
7.3 Análisis estadístico.....	31
8. Resultados.....	32
9. Discusión.....	43
10. Conclusión.....	47
<b>Anexo</b> .....	48
<b>Referencias</b> .....	49



## 1. Resumen

La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) es un problema de salud pública a nivel mundial; en México se considera la quinta causa de muerte, siendo el trasplante renal la mejor opción para los pacientes en estado terminal. A pesar del éxito terapéutico del trasplante y de la mejoría en la calidad de vida del paciente, el mayor problema al que ahora se enfrenta es el rechazo del injerto. El mecanismo que lleva a la pérdida del injerto renal incluye la presencia de anticuerpos contra antígenos del donador expresado en el riñón trasplantado denominados “anticuerpos donador específico anti-HLA” (ADES). El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de anticuerpos donador específico anti-HLA utilizando la tecnología Luminex® en pacientes con rechazo de trasplante del injerto renal y asociarlos con rechazo clínico e histopatológico.

Este es un estudio clínico retrolectivo y prospectivo realizado en el laboratorio de histocompatibilidad del departamento de trasplantes en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Se incluyeron 73 pacientes sometidos a trasplante renal del 2015 al 2017, de los cuales 24 pacientes presentaron rechazo del injerto en el primer año pos-trasplante; la recolección de datos se realizó en la base de datos del hospital mediante el sistema “*online Labsis*”.

Resultados. Se observó que los ADES anti-HLA se presentaron principalmente en aquellos pacientes con rechazo del injerto renal (15/24) y fueron menos frecuentes en los que no presentaron rechazo (13/49), esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0.006$ ). Además se encontró que los anticuerpos anti-HLA de clase II se asocian con rechazo renal agudo en el 60% de los casos ( $p=0.00004$ ).

Conclusión: Este estudio demostró que el rechazo del injerto renal está asociado principalmente con la presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico (ADES); además, mostró que los anticuerpos anti-HLA de clase II los que con mayor frecuencia (60%) muestran rechazo  $p=0.00004$



---

## 2. Abreviaturas

**Ac** Anticuerpo

**ADES** Anticuerpos donador específico

**CPA** célula presentadora de antígeno

**CS** Creatinina en suero

**DC** Donador cadavérico

**DVR** Donador vivo relacionado

**DVNR** Donador vivo no relacionado

**HLA** Antígeno leucocitario humano

**IgG** Inmunoglobulina tipo G

**IRC** Insuficiencia renal crónica

**MHC** complejo principal de histocompatibilidad

**RH** Rechazo humoral

**RC** Rechazo celular

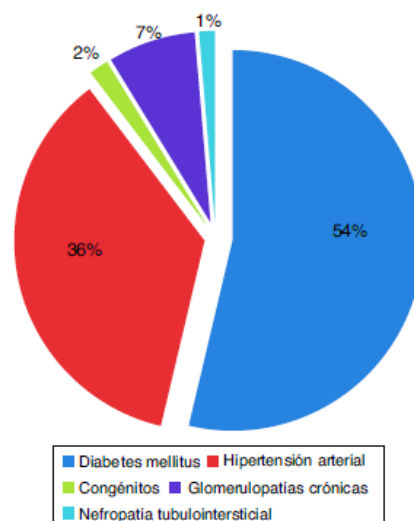
**TGF** Tasa de filtración glomerular



### 3. Introducción

La insuficiencia Renal Crónica (IRC) se define como la presencia de daño renal con duración igual o mayor a tres meses, se caracteriza por anomalías estructurales o funcionales del riñón y por una tasa de filtración glomerular (TFG) < 60ml/min (K/DOQI 2002) [1]. La IRC es un proceso fisiopatológico multifactorial, progresivo e irreversible que frecuentemente lleva a un estado terminal lo que obliga al paciente a la terapia de reemplazo renal, ya sea mediante diálisis (peritoneal o hemodiálisis) o mediante trasplante renal [2].

En México la insuficiencia renal crónica constituye un problema de salud pública, asociado con elevada morbilidad, mortalidad, con grandes costos de manejo y en consecuencia con disminución de la calidad de vida [3]. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en México cada año mueren más de 12 mil mexicanos a causa de insuficiencia renal y constituye la quinta causa de muerte a nivel nacional; siendo la nefropatía diabética la principal causa de IRC, seguida de la nefropatía hipertensiva según se muestra en la **figura 1**.

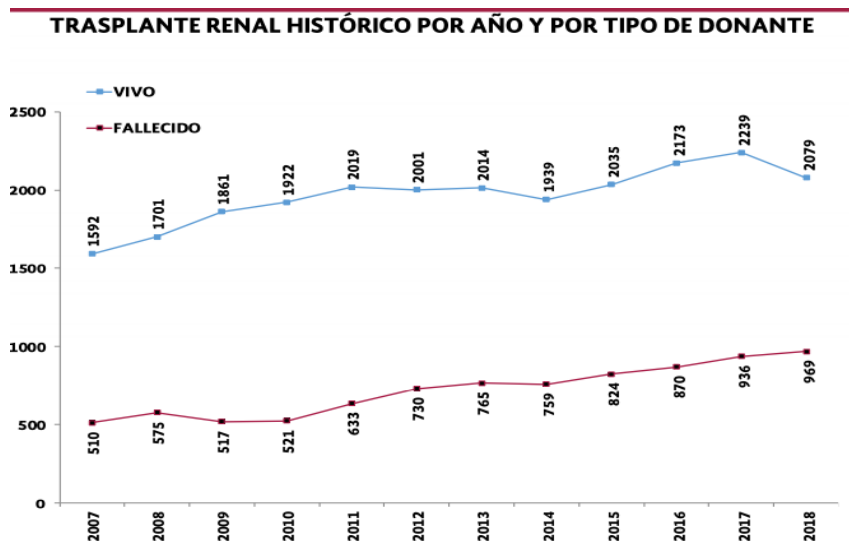


**Figura 1.** Causas primarias de insuficiencia renal crónica.  
Imagen tomada de Rev. Salud Jal. Ocegueda-Silva.





A nivel mundial el número de trasplantes de riñón continúa en aumento y de acuerdo con datos del Registro Mundial de Trasplantes, en 2017 se realizaron 89,823 trasplantes de riñón, 40.2% de ellos provenientes de donante vivo, siendo el trasplante renal el más frecuente (66.2%) [4]. En México, la cifra de trasplantes también va en aumento, según datos del Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA) en 2018 se realizaron 3,048 trasplantes de riñón en todo el país, la cifra que ha ido en aumento en los últimos 10 años [5], ver **figura 2**.



**Figura 2.** Trasplante de riñón en México en 2018 *fuente:* Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA).

A pesar del éxito terapéutico y de la mejoría en la calidad de vida, el mayor problema al que se enfrentan los pacientes trasplantados es el rechazo del injerto [6]. Este fenómeno es un proceso inmunológico que daña el injerto y puede ocurrir en cualquier momento a partir del trasplante.



---

Existen tres formas de rechazo, la que ocurre minutos después de realizar la anastomosis de la arteria renal se llama rechazo hiperagudo y se debe a la existencia de anticuerpos preformados que no se detectaron mediante la prueba cruzada y que al activar el sistema del complemento inducen rechazo; existe además otro tipo de rechazo más común que ocurre dentro del primer año posterior al trasplante el cual lleva a la pérdida del injerto y que se le conoce como rechazo agudo; por otro lado, existen también episodios de rechazo con un curso de años o décadas caracterizado por fibrosis del injerto y pérdida paulatina de la función y que se denomina rechazo crónico.

En los tres tipos de rechazo el sistema inmune tiene un papel preponderante debido a que es un sistema biológico cuya función es presentar antígenos a los linfocitos T y B con el objeto de diferenciar lo propio de lo extraño [7]. Al identificar lo extraño, se activa la respuesta inmune a través de mecanismos celulares y humorales.

Uno de los pioneros en la inmunología del trasplante, el Dr. Paul Terasaki propuso en el año 2003 que la mayoría de los trasplantes son rechazados por la acción de anticuerpos “*teoría humoral del trasplante*” y en menor grado por células, concluyó que los anticuerpos inducen rechazo del aloinjerto con las siguientes características:

- 1) Causan rechazo hiperagudo renal.
- 2) Activan el Sistema del complemento y conducen a depósitos del fragmento C4d en el órgano trasplantado induciendo falla temprana del injerto.
- 3) Son útiles como indicadores de presensibilización lo que anticipa el desarrollo de rechazos agudos.
- 4) Están presentes en el 96% de los casos (826 pacientes en estudio) de rechazo de injerto renal.
- 5) Se asocian con rechazo crónico injertos de riñón, corazón, pulmón e hígado (33 estudios).
- 6) Pueden ser detectado en la circulación (tres estudios) [8].



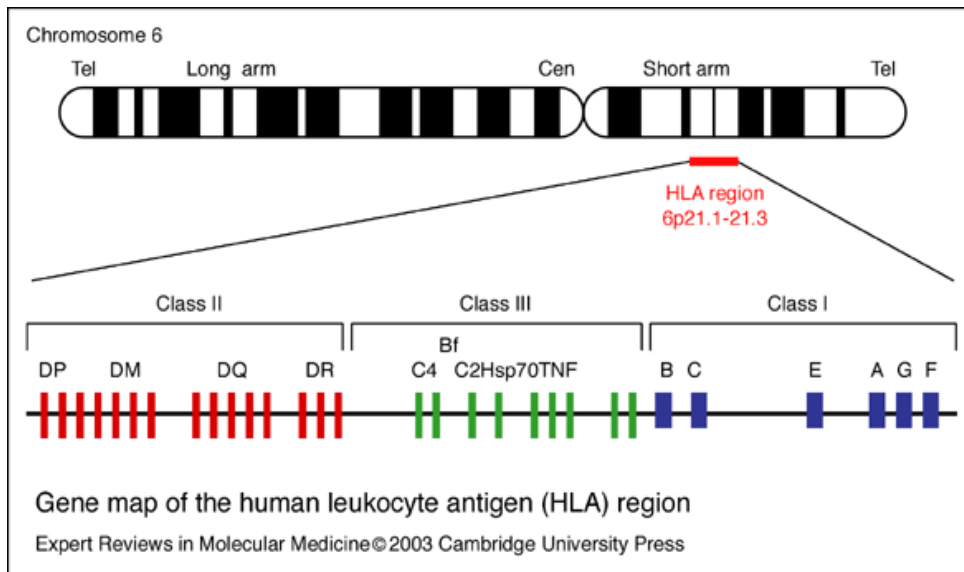
---

### 3.1 Inmunología de trasplante

#### 3.1.1 Antígenos leucocitarios humano (HLA)

El complejo principal de histocompatibilidad es un conjunto de genes altamente polimórficos [9], en el humano los antígenos del MHC son conocidos como HLA (*Human leukocyte antigen, por sus siglas en inglés*). Los antígenos del MHC juegan un papel importante en el control inmunológico esto se debe a que su función principal es el reconocimiento de lo propio de lo extraño. Con el paso del tiempo se han descubierto múltiples funciones biológicas, entre las más importantes está la presentación antigénica, su papel en la inmunobiología del trasplante, la formación del repertorio de células T y la autoinmunidad [10]. El HLA se localiza en el brazo corto del cromosoma seis, ocupando un segmento de 3,500 kilobases. Está dividido en tres regiones diferentes (**Figura 3**). Los genes de clase II están localizados más cerca del centrómero. Esta región contiene los *loci*: HLA-DRA, DRB, DQA, DQB, DPA, DPB, DNA, DMA, DMB, DOB y algunos pseudogenes involucrados en el procesamiento y transporte intracelular de antígenos como LMP1, LMP, TAP1 y TAP2. En la región más telomérica se ubican los genes clase I: HLA-A, B, C y otros recientemente en vías de caracterización: HLA E, F, G, H, J. Entre las regiones de clase I y II se encuentra un grupo heterogéneo de genes que codifican algunas de las proteínas del sistema del complemento, el gen de la enzima 21-hidroxilasa, genes de las proteínas de choque térmico y genes de la familia del factor de necrosis tumoral, entre otros. A todo el conjunto se le denomina región de clase III del HLA.

Dos propiedades separadas del MHC dificultan que los patógenos evadan las respuestas inmunitarias de esta manera. En primer lugar, el MHC es poligénico: contiene varios genes MHC de clase I y MHC de clase II diferentes, de modo que cada individuo posee un conjunto de moléculas de MHC con diferentes intervalos de especificidades de unión a péptidos. En segundo lugar, el MHC es altamente polimórfico; es decir, hay múltiples variantes de cada gen dentro de la población como un todo. Los genes MHC son, de hecho, los genes más polimórficos conocidos [11].



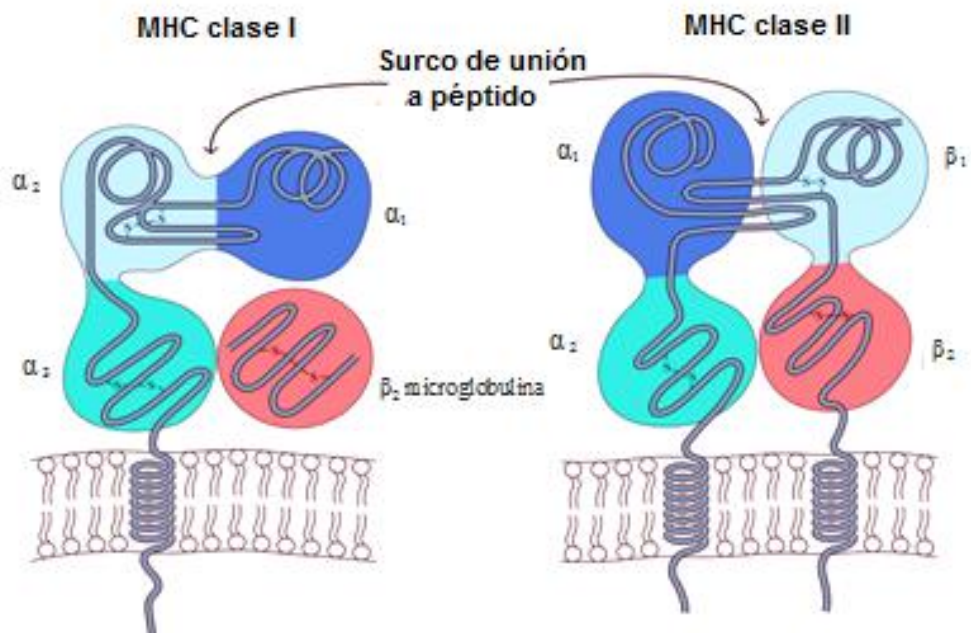
**Figura 3.** Regiones del HLA. El HLA se localiza en el brazo corto del cromosoma seis. Imagen tomada de expert reviews in molecular 2003



---

### 3.1.2 Moléculas de Clase I

Las moléculas clase I del MHC están constituidas por una cadena polipeptídica codificada en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21) llamada cadena alfa ( $\alpha$ ) cuyo peso es de 44 kilodaltones (kD), a ésta se acopla otra cadena llamada  $\beta$ 2-microglobulina codificada en el cromosoma 15 cuyo peso es de 12 kD [12]. Se requiere la asociación de la cadena  $\alpha$  con la cadena  $\beta$ 2 para lograr la expresión de moléculas de clase I en la membrana celular. La cadena  $\beta$  se une mediante enlaces no covalentes con la porción externa de la cadena  $\alpha$  y carece de contacto directo con la membrana celular. La región extracelular de la cadena  $\alpha$  se divide en dos partes: una región amino terminal de unión al péptido y otra región similar a las inmunoglobulinas (Igs) [13]. La cadena  $\alpha$  se fija en la membrana plasmática mediante el segmento transmembranal hidrofóbico y una cola citoplasmática hidrófila. La cadena alfa está organizada en tres dominios ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3) cada uno contiene 90 aminoácidos (aa), el dominio transmembrana contiene 40 aa, y 30 aa en la porción intracitoplásmica. Los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 interactúan para formar una plataforma de ocho cadenas  $\beta$  antiparalelas enlazadas por dos largas regiones  $\alpha$ -helicoidales. Esta estructura forma un surco profundo o hendidura y es el sitio de unión del péptido y puede unir fragmentos de 8-10 aa. El dominio  $\alpha$ 3 está altamente conservado entre las moléculas de clase I y contiene una secuencia que es reconocida por la molécula CD8+ en la superficie de las células T [9].



**Figura 4.** Estructura de las moléculas HLA de clase I y clase II que muestran los dominios externos, el segmento transmembranaral y la cola citoplásmatica. Imagen tomada de Kuby Inmunología, 7edición, 2014.



---

### 3.1.3 Moléculas de Clase II

La molécula de clase II está formada por dos cadenas polipeptídicas diferentes asociadas en forma no covalente [9]. La estructura es de una cadena  $\alpha$  de 32 kilodaltones y otra llamada beta ( $\beta$ ) de 29 kilodaltones. Ambas se codifican dentro del del MHC, existen varias subregiones (HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ) cada una de ellas con una cadena alfa y otra beta, todas ellas extraordinariamente polimórficas con excepción de la cadena  $\alpha$  de la región HLA-DR. Cada uno de los *loci* tiene dos dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$  siendo  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  los dominios proximales de la membrana. Ambos tienen un segmento transmembranal y una porción intracitoplásmica. Los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  forman la hendidura de unión de Ag, la hendidura de unión Ag puede contener un péptido de 13-18 aa (**Figura 4**). La unión de péptidos por las moléculas de clase I y II no muestra la fina especificidad de la unión a Ag como se ve con los receptores de células Ig o T. Se piensa que la relación de las células CD4+ con las moléculas de clase II involucra los residuos no polimórficos del segmento  $\beta 2$ . La región intracelular también incluye una zona intramembranal y otra intracitoplasmática. Se piensa que la relación estructural es semejante a la descrita para las moléculas clase I [10], [13].

### 3.1.4 Reconocimiento antigénico.

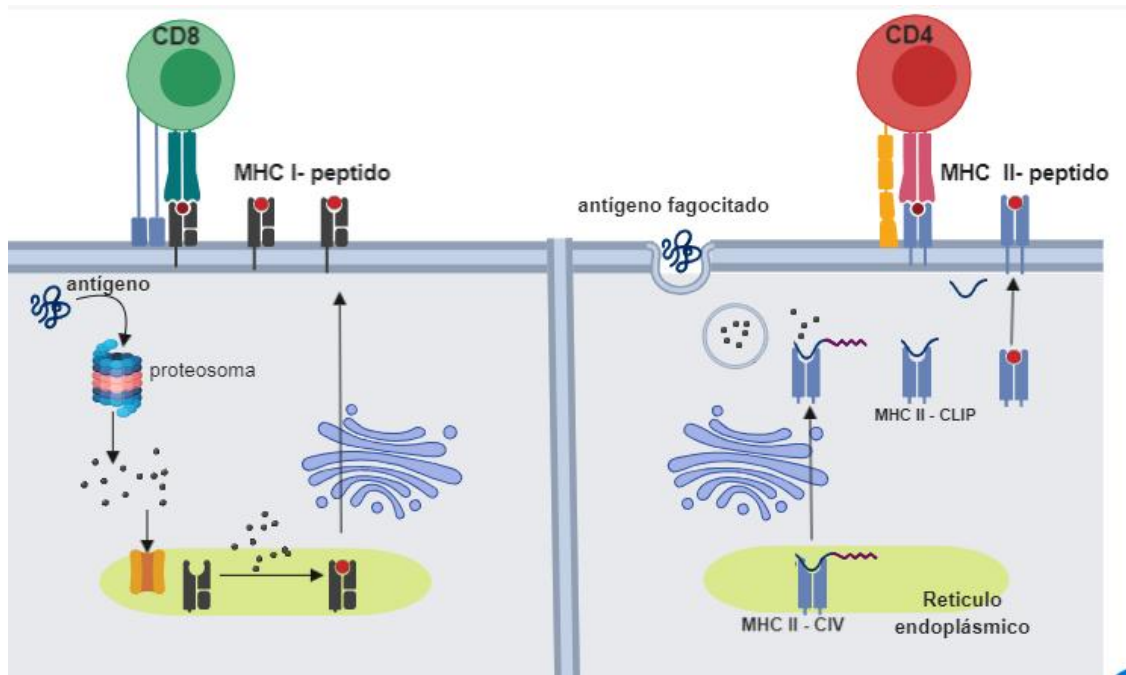
Las células T reconocen antígenos sólo si éstos se acoplan a las moléculas del MHC sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Existen dos formas en que puede ocurrir la presentación del antígeno, una de ellas está destinada a la identificación de infecciones intracelulares (virus o proteínas tumorales) [14], el cual es procesado dentro del proteosoma y posteriormente transportado al retículo endoplasmático mediante el transportador y procesador de antígenos (TAP). Las aminopeptidasas del retículo endoplásmico recortan péptidos de 8 a 10 aa para acoplarlos a las moléculas clase I del MHC antes de transferirlos a la superficie, para ser presentados a células T CD8 [15].



---

La segunda estrategia en la que también participan las células presentadoras de antígenos profesionales (incluyen células dendríticas, células B y macrófagos) está destinada a identificar antígenos derivados de infecciones extracelulares (bacterias). Estas proteínas se endocitan y se procesan en los lisosomas para después ser transportadas al endosoma donde son acopladas a las moléculas clase II del MHC, posteriormente se conducen desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi formando un complejo en el que participa la cadena formando un fragmento conocido como CLIP, finalmente, la molécula HLA-DM remueve el CLIP facilitando así el acoplamiento del péptido inductor de alta afinidad, antes de la transferencia a la célula superficie para ser reconocido por el receptor de antígeno de los linfocitos T CD4 según se muestra en la **figura 5** [15].





**Figura 5.** Vías de procesamiento y presentación de antígenos. En la Vía de presentación de clase I (endógena), los antígenos de las proteínas citosólicas son procesados mediante proteosomas y los péptidos se transportan hacia el retículo endoplásmico, donde se unen a las moléculas del MHC de clase I para ser presentados a linfocitos T CD8. En la vía de presentación de clase II (exógena), los antígenos extracelulares se endocitan en vesículas en las que se procesan los antígenos y los péptidos se unen a las moléculas del MHC de clase II los cuales son presentados a linfocitos T CD4.



---

### 3.1.5 Reconocimiento antigénico implicado en el trasplante.

La respuesta inmune generada contra antígenos en general y contra antígenos del donador en particular está influida por el código genético HLA del receptor; de esta manera, las moléculas del HLA se identifican como los blancos principales de la respuesta inmune en contra de aloinjertos, el reconocimiento de aloantígenos por parte de las células T marca el inicio del rechazo al trasplante. Se conoce que el grado de compatibilidad en los antígenos HLA representa un efecto positivo en el trasplante renal y en la disminución del número de episodios de rechazo. Los péptidos HLA y otros antígenos del donador se procesan y presentan a las células T del receptor mediante las moléculas HLA expresadas en la superficie de las CPA (incluyendo macrófagos y células dendríticas) del receptor, a partir de ahí, el repertorio del receptor de las células T moldea el proceso de selección positiva y negativa determinado por el fenotipo HLA del paciente [10].

En el trasplante renal el reconocimiento de aloantígenos ocurre a través de dos vías distintas: la vía directa y la vía indirecta (**figura 6**). La directa describe la capacidad de las células T para reconocer moléculas MHC intactas no propias presentes en la superficie de las células del donante; en tanto que la vía indirecta describe la capacidad de las células T para reconocer el MHC del donante y en consecuencia las moléculas son procesadas por las CPA y posteriormente presentadas como péptidos unidos a las moléculas MHC del receptor [16].

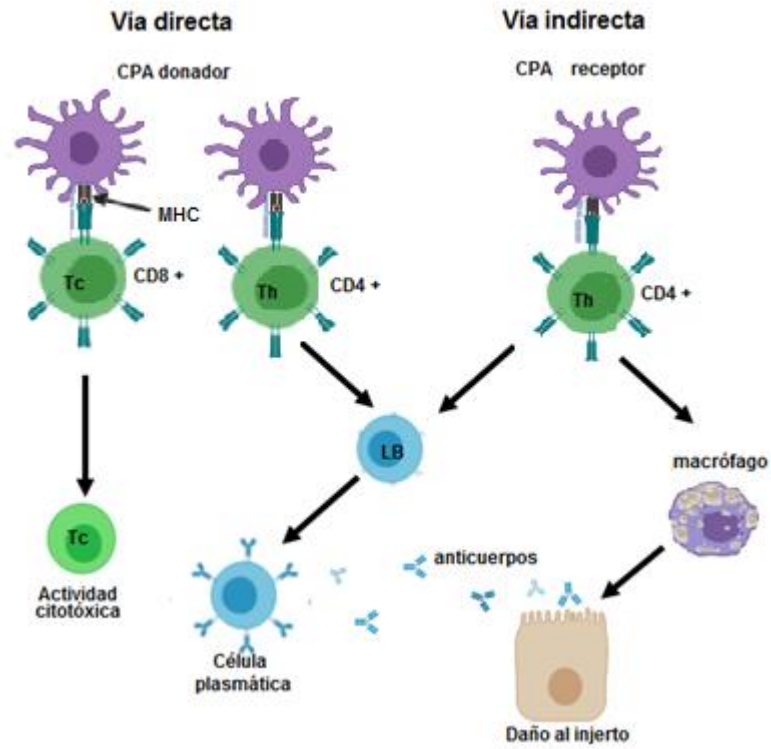
La vía directa se considera la principal fuerza de acción en el mecanismo de rechazo agudo. En esta vía la respuesta de las células T al aloantígeno depende de las diferencias o similitudes de las moléculas del MHC entre donador y receptor. Si las moléculas son similares, la respuesta se adscribe al reconocimiento de péptidos nunca antes encontrados por las células del receptor en tanto estén unidos a las moléculas del donador. Es posible que en el entorno donde el MHC donante es estructuralmente muy diferente al MHC receptor, el reconocimiento pueda ocurrir independientemente de la unión del



---

péptido por lo que el reconocimiento del péptido no necesariamente inicia el mecanismo de rechazo. La evidencia sostiene la necesidad de unión del péptido al MHC para que ocurra el reconocimiento alogénico [10], [16].

Múltiples estudios indican que la vía indirecta de aloreconocimiento ocurre durante el rechazo de injertos. Para la vía indirecta es necesario el procesamiento de aloantígenos del donador por parte de células presentadoras del receptor. Para esto, es necesario que los aloantígenos del donador sean captados por las CPA y presentados a las células T del receptor. Existen tres mecanismos de reconocimiento del antígeno que pueden postularse a través de esta vía de reconocimiento. Primero, los antígenos del injerto pueden ingresar a la circulación y captados por las células dendríticas del receptor dentro del tejido linfoide secundario. Segundo, las células del donante pueden migrar a un tejido linfoide secundario donde son captados por las CPA del receptor. Tercero, las CPA pueden migrar al injerto, recoger antígenos y luego migrar a un tejido linfoide secundario. Esta última vía puede ser importante en el fenómeno de rechazo crónico.



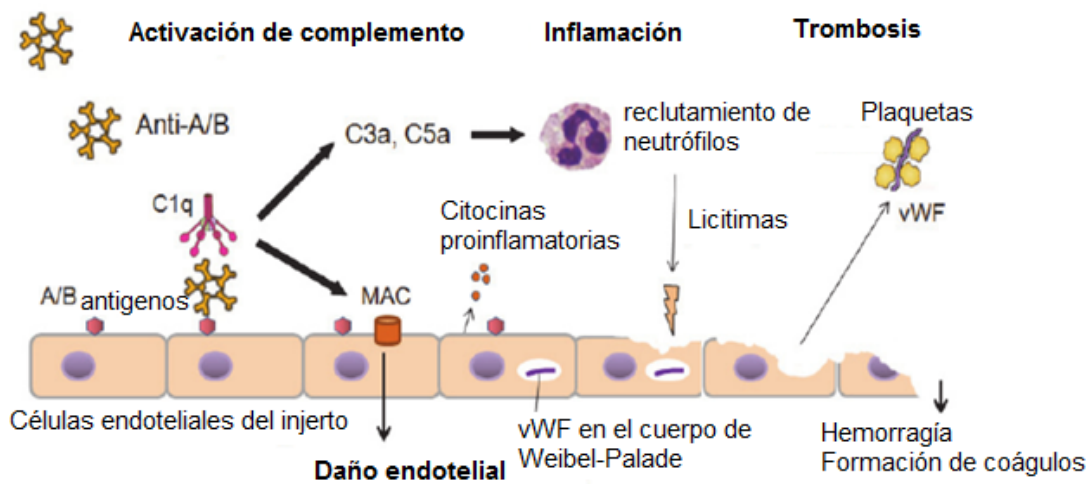
**Figura 6.** Vías de reconocimiento de la molécula HLA implicadas en el trasplante. En la vía directa las células T reconocen moléculas MHC intactas no propias presentes en la superficie de las células del donante; en tanto que la vía indirecta las células T reconocen el MHC del donante, las moléculas son procesadas por las células presentadoras de antígenos (CPA) y posteriormente presentadas como péptidos unidos a las moléculas MHC del receptor.



### 3.2 Tipos de rechazo de tejido.

El rechazo de aloinjertos de órganos sólidos es el resultado de una serie de interacciones que implican la coordinación entre el sistema inmune innato y el adaptativo [16]. Se han descrito tres tipos de rechazo según el curso temporal: hiperagudo, agudo y crónico.

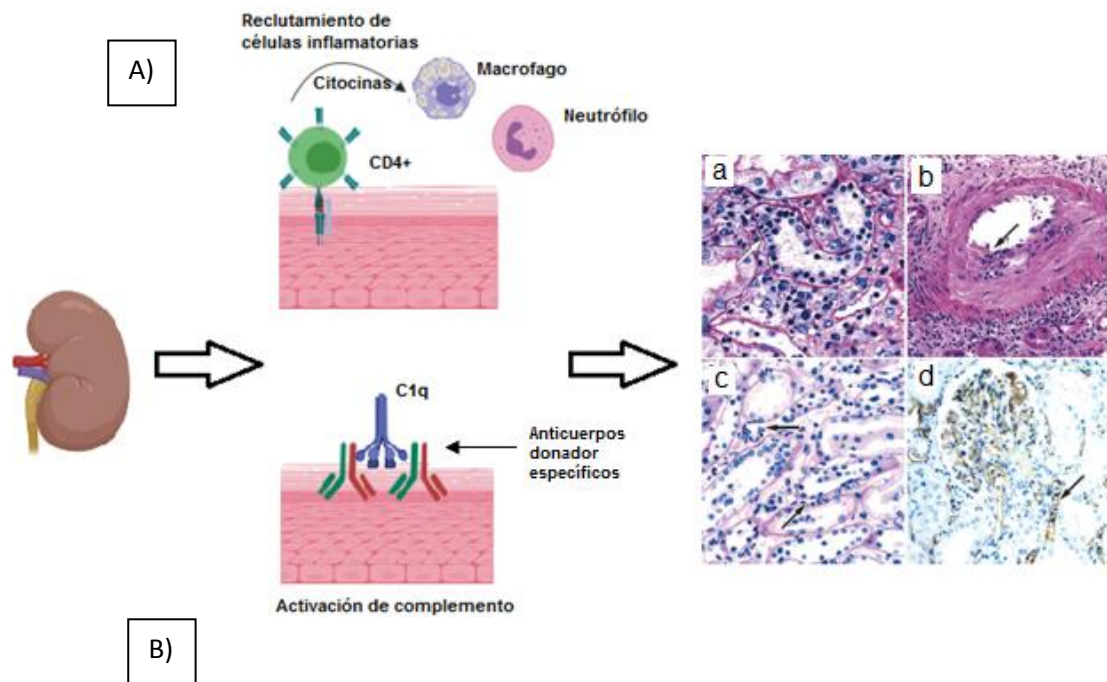
El rechazo hiperagudo, ocurre minutos u horas después del trasplante y es causado por la preexistencia en el receptor de anticuerpos de isotipo IgG los cuales coinciden con los antígenos del donante, con ello se desencadena una respuesta inmune contra el trasplante. Estos anticuerpos pudieron surgir como resultado de transfusiones previas de sangre, trasplantes previos o embarazos múltiples. Los anticuerpos reaccionan con las células de los vasos sanguíneos del injerto formando coágulos y trombosis lo que provoca el rechazo inmediato del trasplante, ver **figura 7**.



**Figura 7.** Mecanismo de rechazo hiperagudo.  
Imagen modificada de Abbas inmunología celular y molecular 6ª edición.



El rechazo agudo ocurre dentro de los primeros 6 meses después del trasplante. Algún grado de rechazo agudo ocurrirá en todos los trasplantes, excepto entre gemelos idénticos. Se corre mayor riesgo en los primeros 3 meses, pero el peligro de rechazo continúa latente aún en etapas posteriores. El mecanismo es causado por la formación de anticuerpos después de la detección de antígenos extraños presentes en el injerto donado (**figura 8**). El diagnóstico temprano permite tratarse mediante la supresión del sistema inmune y con ello evitar el daño permanente al injerto [17].

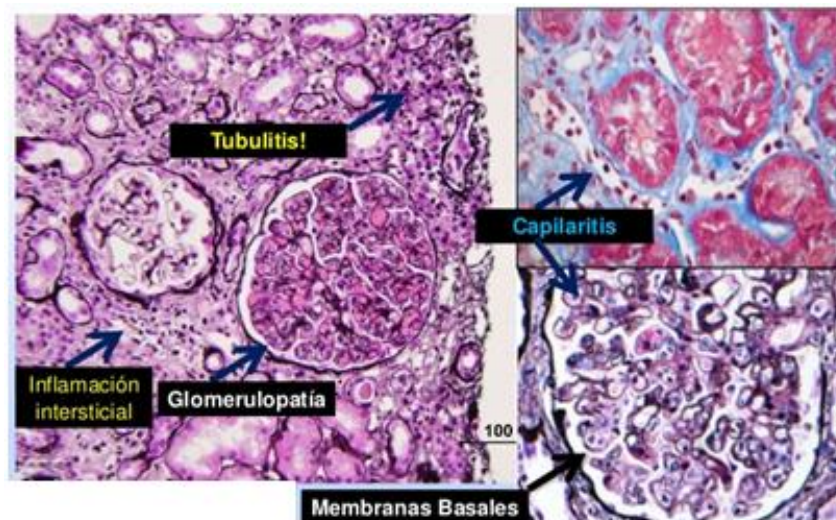


**Figura 8.** Rechazo agudo: A) mediado por células y B) mediado por anticuerpos. En la biopsia renal se observan; a) Rechazo celular (RC) con tubulitis (flechas) y filtrado intersticial mononuclear, b) RC con endarteritis superpuesta a la fibroelastosis intimal crónica, c) Rechazo mediado por anticuerpos con neutrófilos prominentes en los capilares peritubulares (flechas) y d) Depósitos de C4d (tinción marrón) la cual suele estar muy extendida en los capilares peritubulares (flecha). Imagen de biopsia tomada de Williams et al. 2012 [18]



Los episodios repetidos de rechazo agudo pueden conducir finalmente al rechazo crónico del injerto y al fracaso del trasplante.

Finalmente, el daño crónico del injerto ocurre en todos los trasplantes de órganos sólidos y el mecanismo involucra causas inmunes y también causas no inmunes. Las respuestas inmunológicas crónicas de bajo nivel se combinan con la hipertensión, la toxicidad derivada de la terapia inmunosupresora, la hipercolesterolemia, la comorbilidad en el donador e incluso enfermedad subyacente del donante no detectadas durante el protocolo de selección del donante además cambios estructurales (fibrosis) relacionados con la edad del donador y del receptor, todo lo cual causa disfunción del injerto lenta y progresiva. Las características histológicas en los trasplantes de riñón incluyen fibrosis intersticial, atrofia tubular y engrosamiento de vasos sanguíneos pequeños (hiperplasia fibrointimal) **figura 9**. Por otro lado, cada vez se sustenta mejor el rechazo crónico mediado por anticuerpos [6].



**Figura 9.** Mecanismo de rechazo crónico. Imagen modificada <https://image.slidesharecdn.com/fnmecanismoderechazo2014-140624113854-phpapp02/95/fn-mecanismo-de-rechazo-2014-32-638.jpg>





---

Recientemente se ha reconocido que la pérdida del injerto renal está mediada principalmente por la presencia de anticuerpos donador específico (ADES) dirigidos tanto en contra de antígenos HLA como también contra antígenos no HLA [19]. Se sabe que los anticuerpos HLA donador específico preformados que no fueron detectados en las pruebas de histocompatibilidad, llevan al paciente al rechazo hiperagudo; por otro lado, también se sabe que la presencia de anticuerpos HLA DE generados de *novo* pos-trasplante se asocian a su vez con rechazo agudo y que además pueden llevar al rechazo crónico si no son detectados a tiempo.

### **3.2.1. Diagnóstico de rechazo: clasificación de Banff**

El diagnóstico de rechazo de acuerdo se basa en la clínica y en criterios histopatológicos utilizando los criterios de Banff. [20]. Se reconocen 2 categorías histológicas: el rechazo mediado por células y el rechazo mediado por anticuerpos, agregando el término rechazo mixto cuando coexisten ambos.

El rechazo mediado por células T se caracteriza por infiltración fundamentalmente de macrófagos y linfocitos en el túbulo-intersticio. De acuerdo con la clasificación de Banff, las principales lesiones de rechazo agudo mediado por células T incluyen la inflamación intersticial (i), la tubulitis (t) y la arteritis de la íntima (v), cuya definición se realizó de forma arbitraria y por consenso en 1997, según se observa en la **tabla 1**. Dentro de la categoría de rechazo mediado por células T están el rechazo agudo y el rechazo crónico [21], [22].





**Tabla 1 – Principales lesiones diagnósticas de rechazo agudo celular y categorías de la clasificación de rechazo mediado por células T [22]**

Principales lesiones diagnósticas de rechazo agudo celular	
Inflamación intersticial (i): % de inflamación en regiones no escleróticas	0: < 10 1: 10-25 2: 26-50 3: > 50
Tubulitis (t): células mononucleadas por túbulo	0: 0 1: 1-4 2: 5-10 3: > 10
Arteritis de la íntima (v): % de la luz con inflamación	0: 0 1: < 25 2: ≥ 25 3: Transmural o necrosis
Categorías de la clasificación de rechazo mediado por células T	
Categorías de rechazo mediado por células T agudo	IA Inflamación intersticial (> 25% en áreas no escleróticas i2 o i3) con tubulitis moderada (t2) IB Inflamación intersticial (> 25% en áreas no escleróticas i2 o i3) con tubulitis severa (t3) IIA Leve a moderada arteritis intimal (v1) con o sin inflamación intersticial y tubulitis IIB Arteritis severa intimal > 25% del área luminal con o sin inflamación intersticial y tubulitis III Arteritis transmural y/o necrosis de la media con infiltrado linfoplasmocitario
Cambios <i>borderline</i>	Cualquier nivel de tubulitis con infiltrado entre 10 a 25% o cualquier infiltrado con tubulitis de una a 4 células que no llegan al diagnóstico de rechazo
Rechazo mediado por células T crónico	Arteriopatía crónica del injerto (fibrosis intimal arterial con infiltración mononuclear y formación de neointima) estas lesiones se pueden observar en el rechazo mediado por células T y anticuerpos (Banff 2007 y 2015)
Consiguar: inflamación en áreas de esclerosis: i-IFTA	Se recomienda valorar no solo la inflamación intersticial en las áreas no escleróticas. Se debe cuantificar la inflamación en las áreas escleróticas (Banff 2015)



---

En el rechazo mediado por anticuerpos, existen 3 categorías de cambios: la presencia de depósitos de C4d sin rechazo, el rechazo mediado por anticuerpos agudo y el rechazo mediado por anticuerpos crónico [22].

Dentro del rechazo agudo/activo mediado por anticuerpos, se requiere la presencia de 2 de 3 puntos de clasificación que se mencionan a continuación [22]:

Lesiones histológicas (agudas o activas). La lesión histológica fundamental es la inflamación de la microcirculación manifestada por glomerulitis (g), capilaritis peritubular (ptc) y microangiopatía trombótica. También puede observarse frecuentemente necrosis tubular aguda y más raramente arteritis intimal. La *glomerulitis* es la oclusión completa o parcial de al menos un capilar glomerular por infiltración de leucocitos y/o tumefacción de las células endoteliales, y se representa como g y se gradúa de 0 a 3 (**tabla 2**). La *capilaritis peritubular* se define por la presencia de células inflamatorias en más del 10% de los capilares peritubulares corticales, se representa como ptg y se gradúa de 0 a 3, como se ve en la **tabla 2**. La *microangiopatía trombótica* se manifiesta como trombos intracapilares, edema endotelial, ensanchamiento subendotelial, glomérulos isquémicos y mesangiólisis.

Interacción actual o reciente de los anticuerpos con el endotelio. Es el segundo pilar diagnóstico e incluye la presencia de depósitos de C4d en capilares peritubulares, la inflamación microvascular moderada dada por la suma de glomerulitis y capilaritis con una puntuación mayor a 2 ( $g + cpt \geq 2$ ) además de la expresión aumentada de transcritos de activación endotelial u otro marcador de activación endotelial. El depósito de C4d es característico del rechazo mediado por anticuerpos, es producto de la activación de la fracción C4 del sistema del complemento el cual requiere inhibirse una vez concluida su función, esta inhibición requiere la intervención de dos proteínas reguladoras llamadas factor H y Factor I las cuales convierten al fragmento C4b en C4c y C4d, éste último no tiene acción biológica conocida. Puede ser activado por la vía clásica y también por la vía de las lectinas, sirve como evidencia de la reacción antígeno-anticuerpo en la superficie del endotelio. En la interpretación



---

de los criterios de la clasificación de Banff del 2013 se establece como equivalente al C4d la presencia de inflamación de la microcirculación moderada ( $g + ptg > 2$ ) y se añadió una nueva categoría que es el rechazo mediado por anticuerpos C4d negativo, permitiendo aumentar el diagnóstico positivo de rechazo mediado por anticuerpos y disminuir la sospecha del mismo [21].

Anticuerpos donante específico. Los anticuerpos donante específico (ADE) pueden estar dirigidos contra moléculas HLA o también contra moléculas no HLA del endotelio. Los anticuerpos HLA donante específico constituyen el 90% de los ADE responsables de los rechazos mediados por anticuerpos [19]. Estos deben determinarse al momento del diagnóstico. Los ADE pueden estar dirigidos contra moléculas de HLA clase I (A, B y C) o HLA de clase II (DP, DQ y DR). La tecnología para la detección de anticuerpos anti-HLA es el ensayo en fase sólida que utiliza la plataforma Luminex® [22]. La determinación de anticuerpos no HLA no ha sido validada en la clínica, como lo son los anticuerpos MICA, los MICA (cadena A relacionada a MHC clase I) son un grupo de genes MHC no clásicos, ubicados dentro de la región MHC clase 1 del cromosoma 6 y también contra el receptor de angiotensina tipo I. La presencia de ADE se asocia con mal pronóstico de los injertos, también con el desarrollo de rechazo mediado por anticuerpos subclínico tanto agudo como crónico [23]. Sin embargo, no todos los ADE producen daño directo al injerto [19].

Para mejorar la capacidad de predicción de daño al injerto de los ADE se utiliza la medida del *mean fluorescent intensity* (MFI) o intensidad de fluorescencia media por el Luminex se ha postulado como medida de fuerza o títulos de los anticuerpos. Sin embargo no es lineal la relación entre el título de anticuerpos y la intensidad de fluorescencia, por lo que dicho ensayo no se considera cuantitativo, sino *que* es un ensayo cualitativo y a lo sumo semicuantitativo. Existen pacientes con niveles elevados de MFI que no desarrollan rechazo agudo mediado por anticuerpos y viceversa. La tecnología Luminex® nos permite identificar los pacientes en riesgo.



---

El rechazo agudo/activo subclínico. Este rechazo hace referencia al hallazgo en las biopsias de seguimiento de la histología característica de rechazo agudo, en ausencia de disfunción del injerto. El conocimiento de los mecanismos y el posible tratamiento es aún objeto de estudio.

Rechazo mediado por anticuerpos crónico activo. Este rechazo constituye una de las causas principales de pérdida de los injertos y se asocia con mal pronóstico [24]. La característica que permite el diagnóstico es el hallazgo histológico de la glomerulopatía del trasplante (GT) [25]. La GT se diagnostica en etapas avanzadas por microscopia óptica por la aparición de dobles contornos y expansión de la matriz mesangial. Los cambios leves en la microscopia de luz están asociados con cambios avanzados en microscopia electrónica (ME) y mal pronóstico. Los cambios preceden a cualquier manifestación clínica. En la microscopia electrónica se aprecia la multilaminación de la membrana basal capilar y/o engrosamiento y duplicación de la membrana basal glomerular.



**Tabla 2-** Graduación de las principales lesiones histológicas asociadas al rechazo mediado por anticuerpos [26]

Clasificación de la glomerulitis: oclusión completa o parcial de uno o más capilares glomerulares por infiltración de leucocitos y tumefacción de las células endoteliales
go Sin glomerulitis g1 Glomerulitis menos del 25% de los glomérulos g2 Glomerulitis en el 25% a 75% de los glomérulos g3 Glomerulitis en más del 75% de los glomérulos
<i>Clasificación de la arteritis intimal: % de la luz con inflamación</i> vo Sin arteritis intimal v1 Leve a moderada arteritis intimal al menos en un área de sección de una arteria v2 Severa arteritis intimal, con al menos 25% del área perdida, en al menos un área de sección transversal de la arteria v3 Arteritis transmural y/o cambios fibrinoides arteriales y necrosis de la muscular media, con infiltrado linfocítico en el vaso
<i>Clasificación de la capilaritis peritubular: células inflamatorias en más del 10% de los capilares peritubulares</i> ptc 0 Menos del 10% de los capilares peritubulares (CPT) con inflamación con 1 a 3 leucocitos ptc 1 Más 10% de los capilares peritubulares (CPT) con capilaritis, con 3 o 4 células inflamatorias lumbales ptc 2 Más 10% de los capilares peritubulares (CPT) con capilaritis, con 5 a 10 células inflamatorias lumbales ptc 3 Más 10% de los capilares peritubulares (CPT) con capilaritis, con más de 10 células inflamatorias lumbales
<i>Clasificación de la glomerulopatía del trasplante</i> cg 0 No dobles contornos ni en la microscopia electrónica, ni en la óptica cg 1 cg1a: no dobles contornos en la microscopia óptica Microscopia electrónica con dobles contornos (incompletos o circunferenciales) en al menos 3 capilares glomerulares con edema endotelial y/o aumento del espacio electrón lúcido subendotelial cg1b: uno o más capilares glomerulares con doble contorno en la MBG en uno o más glomérulos no escleróticos por microscopia óptica (que implica menos del 25% de bucles capilares periféricos) cg 2 Dobles contornos que afectan entre el 26% y el 50% de la asas capilares en los glomérulos más afectados no escleróticos cg 3 Dobles contornos que afectan a más del 50% de las asas capilares en los glomérulos más afectados no escleróticos



---

#### **4. Justificación**

La insuficiencia renal crónica (IRC) es un problema de salud pública a nivel mundial; por otro lado, el trasplante renal es la mejor alternativa para el paciente con IRC. Sin embargo, uno de los problemas al que se enfrentan los pacientes trasplantados es el rechazo del injerto renal.

Se ha demostrado que los anticuerpos anti-HLA son mediadores del rechazo, por lo que la determinación de estos anticuerpos será de utilidad en la predicción de la supervivencia del injerto.

#### **5. Hipótesis.**

La presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico (ADE) en pacientes pre y pos-trasplante renal son predictores del rechazo del injerto renal.

#### **6. Objetivos**

##### **6.1 Objetivo general**

- Determinar la presencia de anticuerpos donador específico (ADE) anti-HLA en pacientes con rechazo de trasplante del injerto renal.

##### **6.2 Objetivos particulares.**

- Realizar un estudio clínico (retrolectivo y prospectivo) pacientes que presentan rechazo de aloinjerto renal.
- Determinar los anticuerpos anti-HLA donador específico (ADE) en pacientes que presentan rechazo del injerto renal.
- Evaluar la función renal, mediante la determinación de creatinina sérica y la estimación de la velocidad de filtración glomerular en pacientes que presentan rechazo del injerto renal.



---

## 7. Material y métodos

Se realizó un estudio clínico retrolectivo y prospectivo en el laboratorio de histocompatibilidad del departamento de trasplantes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se revisaron 73 expedientes de pacientes en quienes se practicó trasplante de riñón, de los cuales 24 de ellos presentaron rechazo del injerto al menos en el primer año pos-trasplante entre 2015 al 2017. La recolección de datos se realizó en la base de datos *online* Labsis®.

Los datos obtenidos para este proyecto de investigación fueron protegidos conforme la protección de datos personales.

### 7.1 Criterios de inclusión

Pacientes que presentaron alteración en el funcionamiento renal

- Creatinina en suero > 1.3mg/dl,
- Tasa de filtración glomerular estimada < 60 ml/min.
- La presencia de biopsia renal que presente depósitos de C4d, o que cumpla con los criterios de Banff para el diagnóstico de rechazo.

Pacientes cuyos estudios de pruebas de histocompatibilidad hayan sido realizados en INCMNSZ.

### 7.2 Detección de anticuerpos anti-HLA donador-específico (ADE).

La determinación de anticuerpos anti-HLA donador específico se realizó mediante un ensayo basado en fluorescencia, utilizando la plataforma Luminex®. Los sueros de los receptores fueron examinados para la búsqueda de anticuerpos del tipo IgG anti-HLA de clase I y clase II con microperlas recubiertas de antígenos específicos de clase I y clase II (LABScreen® Single Antigen HLA Class I-combi y LABScreen® Single Antigen HLA Class II, One Lambda Inc., Canoga Park, California USA).



---

### **7.3 Análisis estadístico**

Para comparar la proporción de pacientes que presentaron rechazo del injerto entre los grupos con anticuerpos y sin anticuerpos, con solo un tipo de anticuerpo o con ambos anticuerpos, se utilizó estadística no paramétrica que incluyó la prueba de Chi cuadrada ( $X^2$ ) el valor de “p” requirió la corrección de Yates y para las pruebas de función renal, se realizó como método estadístico la prueba de t de Student de dos colas considerando un valor de significancia de  $p \leq 0.05$ .





---

## 8. Resultados

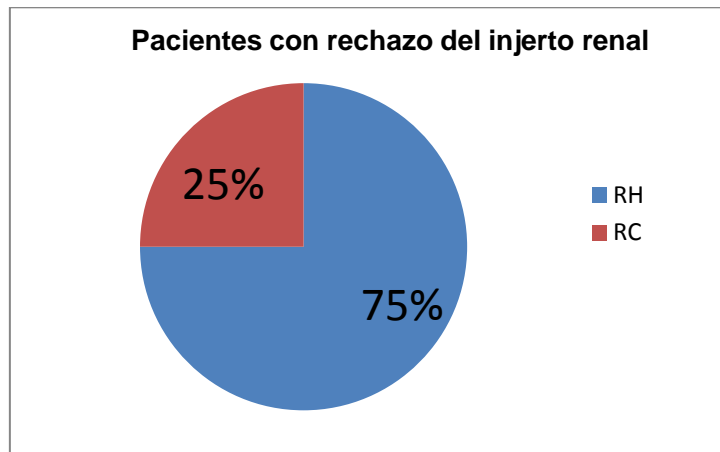
En este estudio se revisaron los expedientes de 73 receptores de trasplante renal, de los cuales el 30.2% lo recibieron de donantes fallecidos, del total de 73 trasplantes, veinticuatro presentaron rechazo del injerto renal (32.8%) en el primer año pos-trasplante; del grupo que rechazó, la edad media fue de  $32.1 \pm 11.6$  años, el resto de la demografía se muestra en la **Tabla 3**. Como puede verse, quince pacientes son del sexo femenino y nueve del sexo masculino. Respecto al origen de la donación, nueve recibieron el órgano de donador vivo relacionado, siete de donador vivo no relacionado y ocho de donador fallecido. En cuanto al tipo de rechazo del injerto, seis pacientes (25%) se diagnosticaron como rechazo celular y dieciocho (75%) como rechazo agudo mediado por anticuerpos (humoral) (**Figura 10**).



**Tabla 3.** Características demográficas de los pacientes con rechazo del injerto.

<b>Características de los pacientes N=24</b>	<b>Rechazo humoral n=18</b>	<b>Rechazo celular n=6</b>
Edad (años)	32.9 ± 11.8	29.8 ± 12
<b>Genero</b>		
Femenino	13 (72%)	2 (33%)
Masculino	5 (28%)	4 (67%)
<b>Fuente del injerto</b>		
DVR	7	2
DVNR	5	2
DC	6	2
<b>Haplotipos que comparten</b>		
0 Haplotipos	12	4
1 Haplotipos	4	1
2 Haplotipos	2	1
<b>Trasplante</b>		
1er	16	5
2do	2	1
<b>Eventos de aloinmunización</b>		
1 Trasfusión sanguínea	5	2
Más de 1 trasfusión sanguínea	6	1
Embarazos (en mujeres)	2	0
Presencia de ADES anti-HLA (%)	12(66,66%)	3(50%)

DRV: donador vivo relacionado, DVNR: donador vivo no relacionado, DC: donador cadavérico, ADES: anticuerpos donador específicos.



**Figura 10.** Distribución de los pacientes (n=24) que presentaron rechazo del injerto renal. Seis pacientes (25%), fueron diagnosticados como rechazo agudo celular (RC) y dieciocho (75%) como rechazo agudo mediado por anticuerpos (RH)



### 8.1 Anticuerpos anti-HLA donador específico (ADES) en pacientes con rechazo y sin rechazo del injerto.

De los 73 pacientes que se estudiaron; veinticuatro pacientes presentaron rechazo del injerto renal, de los cuales 15 pacientes (62.5%) se encontraron anticuerpos anti-HLA donador específicos (ADES anti-HLA), y 49 no presentaron rechazo del injerto pero en 13 de ellos (26.5%) se detectó la presencia de ADES anti-HLA en el primer año pos-trasplante, los datos obtenidos pueden verse en la **tabla 4**. Los ADES anti-HLA se presentaron con mayor frecuencia en los pacientes con rechazo del injerto (15/24) que en aquéllos que no presentaron rechazo (13/49), esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p=0.006$ ).

**Tabla 4.** Presencia de ADES en pacientes con rechazo y sin rechazo del injerto

Total de pacientes N=73	ADES anti-HLA	SIN ADES Anti-HLA
Rechazo del injerto n=24	15 (62.5%)	9 (37.5%)
Rechazo sin rechazo n=49	13 (26.5%)	36 (73.5%)

ADES: anticuerpos donador específico:  
 $X^2$  donde  $pC= 0.006$ ,  $OR=4.62$  y  $IC= 1.45-15.06$

### 8.2 Anticuerpos anti-HLA donador-especifico en pacientes con rechazo.

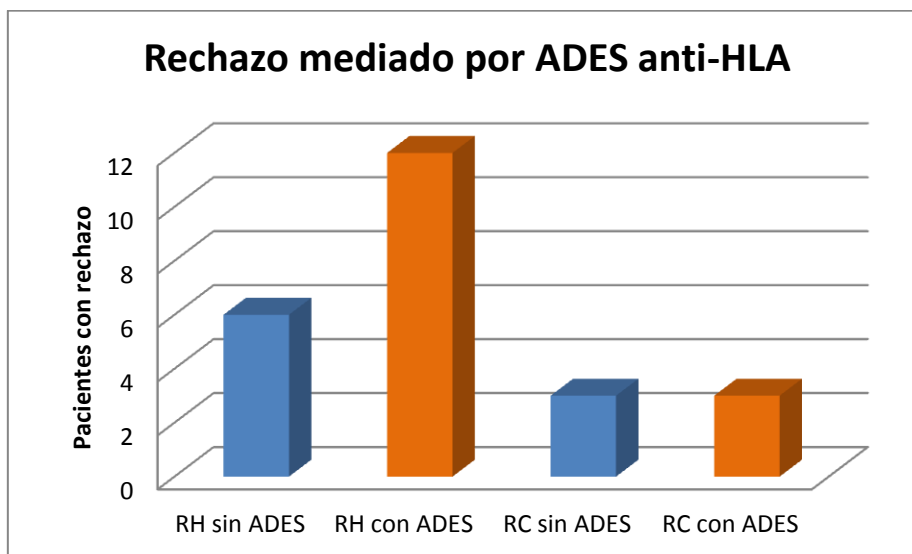
El tipo de rechazo más frecuente fue el rechazo agudo mediado por anticuerpos (18/24), en este grupo el 66% de los pacientes (12/18) presentaron anticuerpos anti-HLA específicos contra el donador (ADES anti-HLA) en tanto que el 44% (6/18) resultó negativo para ADES. De los pacientes que presentaron rechazo agudo celular (6/24), la mitad presentó ADES (**Tabla 5 y Figura 11**). No se encontró diferencia significativa al comparar el grupo con ADES anti-HLA y rechazo humoral con el de rechazo celular lo que sugiere que los ADES anti-HLA no son exclusivos de alguno tipo de rechazo.



**Tabla 5.** Presencia de ADES anti-HLA en el rechazo celular y humoral

Tipo de rechazo N=24	Sin ADES Anti-HLA (%)	Con ADES Anti-HLA (%)
Rechazo humoral (RH)	6 (44%)	12 (66%)
Rechazo celular (RC)	3 (50%)	3 (50%)

ADES: anticuerpos donador específico:  
 $\chi^2$  donde  $pC= 0.80$ ,  $OR=2$  y  $IC95%= 0.31-13.06$



**Figura 11.** Distribución de los pacientes que presentaron rechazo humoral (RH) y celular (RC). En azul pacientes que no presentaron ADES y en naranja pacientes con presentaron ADES.



---

De los 24 pacientes con rechazo, quince de ellos presentaron anticuerpos anti-HLA donador específico (ADES anti-HLA) según se observa en la **tabla 5**. Por otra parte, la **tabla 6** detalla la fuente del injerto para cada trasplante, las especificidades de los anticuerpos anti-HLA encontrados, el tipo de rechazo agudo presentado, la presencia o no de depósitos de C4d en el tejido renal. Como puede verse, ocho pacientes recibieron el injerto proveniente de donador cadavérico (DC), cuatro de donador vivo no relacionado (DVNR) y tres de donador vivo relacionado (DVR).

La determinación de ADES anti-HLA, se realizó en el equipo Luminex, y se tomaron valores de fluorescencia (intensidad media de fluorescencia MFI) establecidos con el objeto de detectar la presencia de ADES utilizando los siguientes criterios:

1. Para pre-trasplante de donador de cadavérico, se toman en cuenta la presencia de anticuerpos anti-HLA con  $MFI \geq 1000$
2. Pos-trasplante pacientes con evidencia de rechazo y seguimiento, se toman en cuenta anticuerpos anti-HLA valores de  $MFI \geq 500$



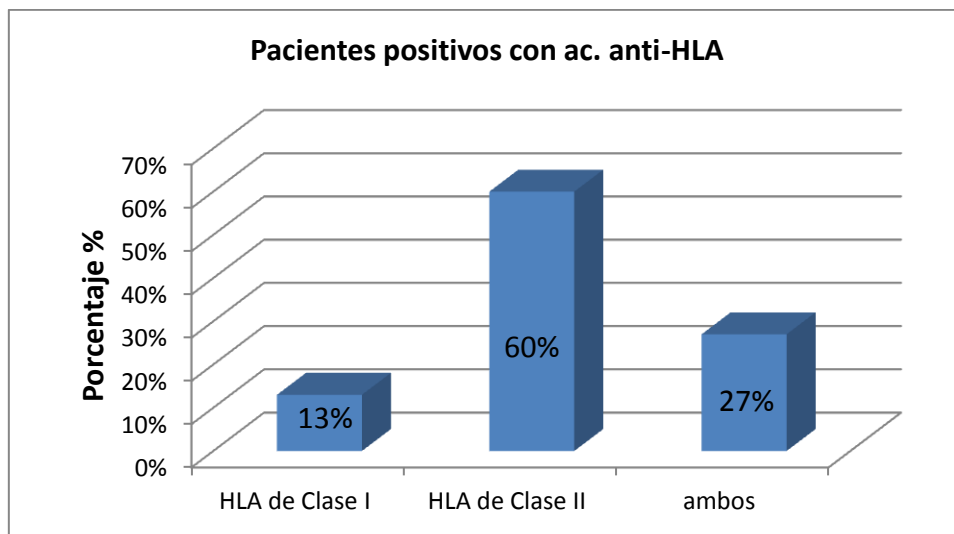
**Tabla 6.** Fuente de injerto, especificidades de los anticuerpos anti-HLA, tipo de rechazo y C4d en biopsia renal en cada uno de los pacientes del estudio

Pacientes	Fuente del injerto	ADES anti-HLA pretrasplante	ADES anti-HLA postrasplante	Tipo de rechazo	Depósito de C4D
1	DC	NO ADES	DQ5, DQ8 y DR53	HUMORAL	negativo
2	DVNR	DQ8	Cw10 y DQ8	CELULAR	
3	DVNR	NO ADES	DR7 y DQ2	HUMORAL G1, PTC1	negativo
4	DC	Cw4, DR53, DR4	DR53	CELULAR ,G1, T3, 12	sin reporte
5	DVNR	NO ADES	DQ5	HUMORAL G1, PTC1	negativo
6	DC	Cw8	NO ADES	HUMORAL, G2	negativo
7	DC	DQ8	DQ8	HUMORAL, G1	negativo
8	DC	NO ADES	Cw7 y DR52	HUMORAL, G1	negativo
9	DVNR	NO ADES	B44, DR7, DQ2 Y DR3	HUMORAL, G3	negativo
10	DC	DQ2, DQ4	DQ2, DQ4 y DP1	HUMORAL G1, PTC1	negativo
11	DC	DQ7, Cw6	Cw6, DR16, DQ5, DQ7 y DR51	CELULAR G1A, I2,T2	sin reporte
12	DC	DQ7, DR16	NO ADES	HUMORAL G2 PTC2	negativo
13	DVR	NO ADES	DQ8	CELULAR G1A,I1,T2,V0 HUMORAL G1	negativo
14	DVR	DR52	NO ADES	HUMORAL	negativo
15	DVR	Cw1	NO ADES	HUMORAL, PTC3	negativo

DRV: donador vivo relacionado, DVNR: donador vivo no relacionado, DC: donador cadavérico, ADES: anticuerpos donador específico



De los 15 pacientes que tuvieron rechazo del injerto en presencia de ADES anti-HLA, el 13% (2/15) presentó anticuerpos contra antígenos HLA clase I, el 60% (9/15) contra antígenos HLA clase II y el 27% (4/15) presentaron anticuerpos contra ambos tipos de antígenos (**Figura 12**).



**Figura 12.** Distribución de los pacientes (n=15) que presentaron anticuerpos anti-HLA de clase I y clase II. Dos fueron positivos para HLA de clase I, 9 para clase II y 4 pacientes tenían clase I y clase II.





Al comparar la frecuencia del tipo de anticuerpos ya sea de clase I o de clase II, Se observó que los ADES anti-HLA de clase II se encontraron con mayor frecuencia en los pacientes con rechazo del injerto renal (13/24) que en los pacientes sin rechazo (7/49) con una  $p=0.00004$ . Los ADES anti-HLA de clase I están presentes en pacientes con rechazo y sin rechazo sin diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 7.** Rechazo del injerto renal mediado por anticuerpos anti-HLA donador específico.

Pacientes positivos con anticuerpos anti-HLA	Rechazo n=24	Sin Rechazo n=49	pC< 0.05	OR	IC95%
Ac. anti-HLA de Clase I	6 (25%)	9 (18%)	0.056	4.44	1.16-17.02
Ac. anti-HLA de Clase II	13 (54%)	7(14%)	0.00004	13.00	3.70-45.62

Ac = anticuerpos

Se clasificaron a los pacientes con rechazo renal que presentaron ADES anti-HLA para saber si los ADES estuvieron presentes antes del trasplante (preformados) o posterior al trasplante (de *novo*). Cuatro pacientes tuvieron ADES pre-trasplante (4/15), en tanto que seis presentaron ADES de *novo* (6/15) y dos pacientes presentaron ADES pre y pos-trasplante (5/12) (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Presencia de ADES pre-trasplante y pos-trasplante

Pacientes con RH por ADES	n=15
ADES pre-Tx	4 (27%)
ADES pos-Tx	6 (40%)
Ambos	5 (33%)

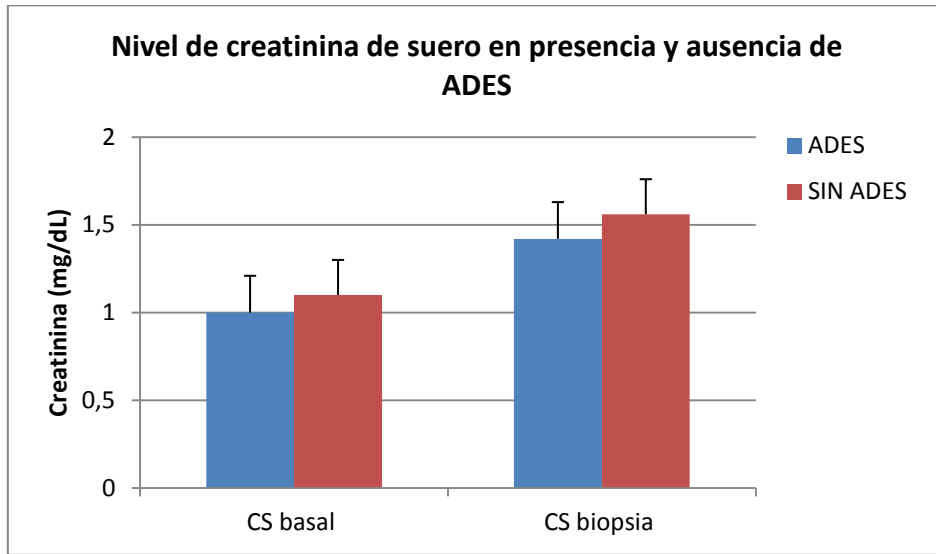


### 8.3 Función del injerto renal en pacientes con rechazo del injerto.

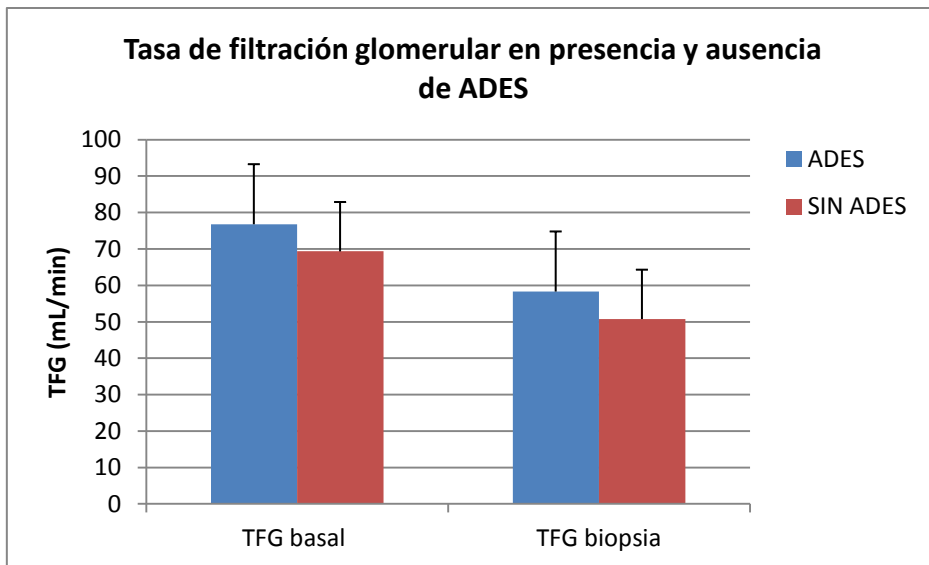
Para medir la función renal de los pacientes que presentaron rechazo del injerto renal, se midió la creatinina sérica basal (CS basal) y los valores de creatinina al momento de evaluación de ADES, así como también la tasa de filtración glomerular (TFG). En general, no se observó diferencia significativa en la función renal, según la presencia o ausencia de **anticuerpos anti-HLA** (**Tabla 9**). Los parámetros de función renal incluyeron los niveles de creatinina sérica y la tasa de filtración glomerular (TFG) (Levey) según se muestra en las figuras **13 y 14**.

**Tabla 9.** Función renal en pacientes con rechazo y estado de ADES.

	Rechazo con ADES (n=15)	Rechazo sin ADES (n=9)	<i>p</i>
C. en suero basal	1,00 ± 0.20	1.10 ± 0.22	0,284
C. en suero a evaluación de anticuerpos	1,42 ± 0.50	1.56 ± 0.61	0,583
TFG basal	76,8 ± 16,50	69,35 ± 21,26	0,413
TFG a evaluación de anticuerpos	58,33 ± 13,56	50,77 ± 20,08	0,346



**Figura 13.** Función renal en pacientes con ADES anti-HLA positivos (n=15) y ADES anti-HLA negativos (n=6) tomando los niveles de creatinina en suero basal y al momento de la biopsia. Prueba t Student con valores estadísticamente no significativos.



**Figura 14.** Función renal en pacientes con ac. anti-HLA positivos (n=12) y ac. anti-HLA negativos (n=6) tomando la tasa de filtración glomerular basal y al momento de la biopsia. Prueba t Student con valores estadísticamente no significativos.

La TFG se calculó con la fórmula de Levey al momento del estudio:

$MDRD = (186 \times Cr \text{ sérica} - 1.154 \times \text{edad} - 0.203) \times 0.742$  si es mujer  $\times 1.212$  si es de ascendencia africana.



---

## 9. Discusión

En este estudio de los 73 pacientes que se revisaron, 24 receptores presentaron rechazo renal del injerto en el primer año, en quince de los destinatarios se detectó la presencia de anticuerpos anti-HLA específicos contra el donador (ADES), de los cuales doce presentaron rechazo mediado por anticuerpos (RH) y tres rechazo celular (RC). Al revisar si había presencia de ADES anti-HLA en los receptores con rechazo del injerto y sin rechazo, se observó que los ADES anti-HLA se presentaron principalmente en los pacientes que tenían rechazo del injerto renal (15/24) este dato es superior al encontrado en pacientes que no presentaron rechazo (13/49) esta diferencia resultó estadísticamente significativa de  $p=0.006$ .

**Anticuerpos donador específico anti-HLA.** Se encontró que de los 24 pacientes con rechazo del injerto 15 reportaron ADES anti-HLA, esto es que el 62% de estos pacientes presentaron anticuerpo anti-HLA ya sea de clase I o clase II. Por lo que la formación de anticuerpos donador específicos contra antígenos HLA de clase I y clase II, podrían estar relacionados con el rechazo del injerto, sin importar el tipo de rechazo que presenten sea este humoral (RH) o celular (RC) los resultados de este trabajo (**tabla 5**) mostraron que los ADES anti-HLA no son exclusivos de alguno tipo de rechazo; sin embargo, la formación de anticuerpos donador específico contra antígenos HLA de clase I y clase II posterior al trasplante (*De novo*) se relaciona con el rechazo humoral mediado por anticuerpos, con el rechazo crónico y con la disminución de sobrevida del injerto [27].

De acuerdo con los resultados de anticuerpos anti-HLA de clase II (**tabla 7**) se muestra asociación con rechazo renal agudo ( $p=0.00004$ ), seguido de la positividad para ambos anticuerpos (clase I y clase II) y en menor grado con ADES anti-HLA de clase I (**figura 12**). Morales–Buenrostro y cols., reportaron en un grupo de 196 pacientes mexicanos con TR y con injerto funcional, de los cuales 44 de ellos (22%) presentó anticuerpos anti-HLA, 23 de los cuales (52%) fueron positivos para anticuerpos de clase II, 10 para anticuerpos clase I



---

y 11 para ambos (clase I y clase II), aunque se requiere saber si eran donador específico, la presencia de ellos impactó negativamente la sobrevida del injerto. Los anticuerpos anti-HLA donador específico que aparecieron con mayor frecuencia de clase II fueron contra los antígenos HLA-DQ8 y HLA-DR53, este último se presentó en un paciente después de 12 meses post trasplante y no estaba presente en el momento del rechazo, lo que podría indicar que estos dos alelos son más susceptibles a generar anticuerpos contra el injerto y por lo tanto llevar al rechazo agudo mediado por anticuerpos.

De la misma manera, en este trabajo se mostró que todos los pacientes que recibieron el injerto proveniente de donador cadavérico (DC), presentaron rechazo agudo del injerto renal mediado por ADES anti-HLA (8/24), indicando que la mayor frecuencia de rechazo se debe a injerto proveniente de DC que cabe resaltar no comparte haplotipo alguno con el receptor (**tabla 6**), se tiene conocimiento que el grado de compatibilidad HLA entre el receptor y donador representa un efecto positivo en el trasplante renal y también en la disminución de los episodios de rechazo. Un estudio realizado entre en 2007 y 2011 en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), mostró que la mayor incidencia de rechazo agudo en el primer año es en pacientes trasplantados de DC (17.4% de incidencia) seguida de 11.8% para DVR [28].

Además se sabe que los pacientes con ADES anti-HLA pre-existente detectado mediante ensayos en fase sólida, Luminex®, tienen mayor riesgo de rechazo agudo mediado por anticuerpo (RH) y mayor riesgo de falla del injerto [29]. En la etapa pos-trasplante, el desarrollo de ADES anti-HLA *de novo* aumenta el riesgo de RH y la pérdida de aloinjerto. Wiebe y col. [30] encontraron una tasa de supervivencia del aloinjerto a 10 años del 57% en pacientes con ADES anti-HLA *de novo* en comparación con el 96% en pacientes negativos para estos anticuerpos. En otro estudio realizado en el población pediátrica del hospital infantil de México, se sugiere que la presencia de anticuerpos anti-HLA clase I y clase II, tanto donador específicos como no



---

específicos, se relacionan con el rechazo agudo y con la menor supervivencia del injerto [31].

Los anticuerpos anti-HLA se presentaron tanto en la etapa pretrasplante (preformados) como en la etapa postrasplante (de *novo*) incluso éstos últimos con mayor frecuencia (**tabla 8**) lo que permite asignarlos como biomarcadores predictores de malos desenlaces del trasplante, incluyendo alta incidencia de rechazo mediado por anticuerpos [19].

**Función del injerto renal en pacientes con rechazo del injerto.** La presencia de ADES anti-HLA no perjudicó la función renal, ya que no se observaron diferencias significativas en la función del injerto, tampoco en los niveles de creatinina ni en la tasa de filtración (**figura 13 y 14**). La hipótesis original suponía que la peor función renal ocurriría en pacientes con ADES anti-HLA, pero no ocurrió así, cabe señalar sin embargo que los niveles de creatinina y la tasa de filtración formaron parte de los criterios de inclusión para la toma de decisión en caso de presentarse rechazo. Otro dato relevante fue que los pacientes que presentaron rechazo agudo celular o humoral resultaron negativos a los depósitos en riñón de la molécula C4d, ver **tabla 5**, de acuerdo con los criterios de Banff se establece como equivalente al C4d la presencia de inflamación de la microcirculación moderada (g + ptg >2) por lo que el rechazo mediado por anticuerpos la molécula C4d es negativo [20]. Este cambio permitió aumentar el diagnóstico positivo de rechazo mediado por anticuerpos y disminuir la sospecha del mismo [32]. El rechazo mediado por ADES anti-HLA C4d negativo puede estar mediado por mecanismos independientes del complemento, que son de naturaleza subclínica o crónica y conducen a un rechazo tardío con disfunción y eventualmente pérdida del injerto [19].

El rechazo agudo mediado por anticuerpos está asociado con el desarrollo de altos niveles de ADES anti-HLA después del trasplante y los protocolos dirigidos a mantener los ADES en niveles más bajos pueden disminuir la incidencia de rechazo agudo mediado por anticuerpos [33]. La técnica de fase sólida, Luminex, permite detectar los títulos de anticuerpos y también si la



---

especificidad está dirigida contra antígenos HLA donador-especifico. La detección de estos ADES anti-HLA ya sea pre-trasplante o pos-trasplante permite tomar decisiones tanto en la dosis como en el tipo de tratamiento inmunosupresor con el propósito de revertir el rechazo del injerto y con ello aumentar la sobrevida del mismo.



---

## 10. Conclusiones

- Este estudio demostró que el rechazo del injerto renal está asociado principalmente con la presencia de anticuerpos anti-HLA donador específico (ADES); además, mostró que los anticuerpos anti-HLA de clase II los que con mayor frecuencia (60%) muestran rechazo  $p=0.00004$ .
- La técnica de fase sólida Luminex, permite detectar los títulos de anticuerpos anti-HLA donador específico. La detección de estos ADES anti-HLA ya sea pre-trasplante o pos-trasplante es útil en la toma de decisiones para asignar el tipo y dosis de medicamentos inmunosupresores en el manejo del rechazo del injerto y con ello aumentar la sobrevida del mismo.



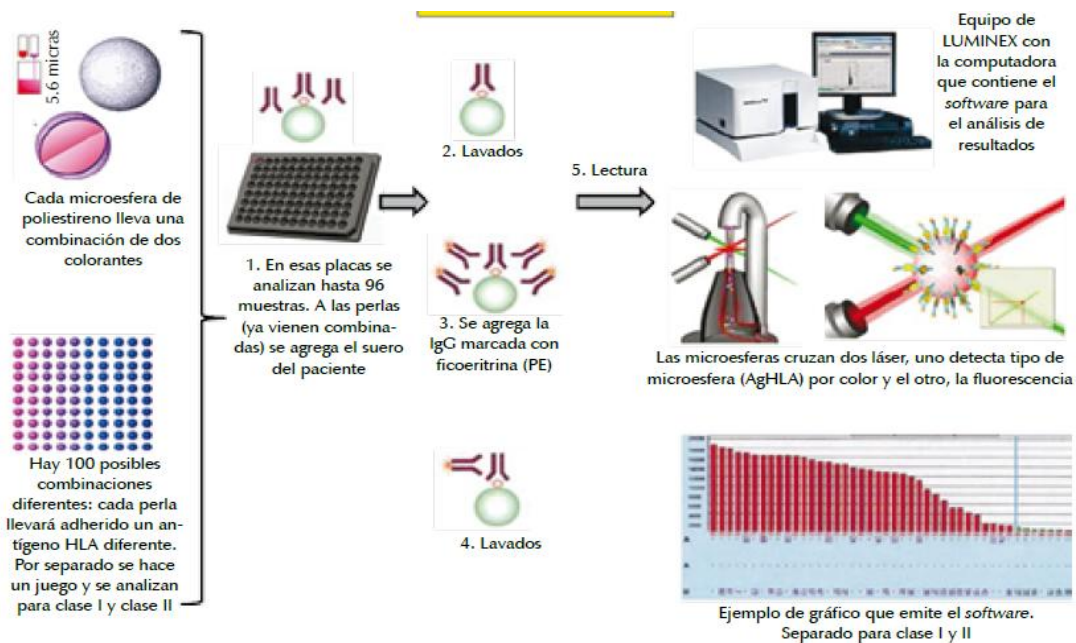


## Anexo

### Ensayo para la determinación Antígeno Específico (SA) anti-HLA

Cada reacción antígenos-anticuerpo se realizó por pozo en una placa blanca de 96 pozos.

A un pozo se añadió 5 $\mu$ L de microperlas de clase I y 20  $\mu$ L de suero del receptor, se realizó el mismo procedimiento para clase II, se incubó a temperatura ambiente en agitación constante por 30min. Una vez pasado en tiempo se realizó el primer lavado con 150 $\mu$ L buffer a 1X (incluido en el Kit) a cada pozo. Se centrifugo a 3100rpm por 6 min, posteriormente se retiró el exceso de buffer por flick. Se realizó 2 lavados más. Después se realizó el marcaje de anticuerpos con ficoeritrina, se realizó la incubación a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se realizaron 2 lavados con buffer de fosfato. Se realizó el análisis de las muestras para la búsqueda de ADES.



**Figura 13.** Descripción de la técnica de Luminex. Imagen tomada de “Riesgo inmunológico y terapia de inducción de trasplante”. Morales-Buenrostro [34].



## REFERENCIAS

- [1] K/DOQI, "Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Kidney Disease Outcome Quality Initiative," *Am J Kidney Dis*, vol. 39 (S1), pp. 1–266, 2002.
- [2] Aida and V. Estrada, "Insuficiencia renal crónica," *facmed. UNAM*, pp. 1–31, 2009.
- [3] Ocegueda Silva., Sanabria Cortés., Ayala Cortés., García Calderón, "Retos y perspectivas de la enfermedad renal crónica en México: a propósito del día mundial del riñón , 2017," *RevSalJal*, vol. 4, no. 1, p. 4, 2017.
- [4] ONT, "<http://www.ont.es/Documents/29%2008%202018%20NP%20DATOS%20REGISTRO%20MUNDIAL%20DE%20TRASPLANTES.pdf>," 2018.
- [5] CENATRA "[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/427652/Presentacion\\_anual\\_2018.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/427652/Presentacion_anual_2018.pdf)." .
- [6] C. Callaghan, "The immunology of organ transplantation," *Surgery*, vol. 32, no. 7, pp. 325–332, 2014.
- [7] N. Plant, "Transplantation , ABO incompatibility and immunology," *Anaesth. Intensive Care Med.*, vol. 10, no. 5, pp. 227–230, 2009.
- [8] S. Article, "Humoral Theory of Transplantation," *Am. J. Transplant.*, no. 3, pp. 665–673, 2003.
- [9] S. Hunde and S. B. Onwu, "Major histocompatibility complex," vol. 1, no. 1, 2013.
- [10] A. López-Martínez, C. Chávez-Muñoz, and J. Granados, "Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad," *Rev. Investig. Clin.*, vol. 57, no. 2, pp. 132–141, 2005.
- [11] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik, "Immunobiology: The Immune System In Health And Disease," *Immuno Biol.* 5, p. 892, 2001.
- [12] J. H. Brown *et al.*, "Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1.," *Nature*, 1993.
- [13] Owen Judith A. and Punt Junni., *kuby inmunologia*, 7th ed. 7a, 2013.
- [14] J. Parkin and B. Cohen, "An overview of the immune system," *Lancet*, vol. 357, pp. 1777–1789, 2001.
- [15] M. Koyama and G. R. Hill, "Alloantigen presentation and graft-versus-host disease: fuel for the fire," *blood J.*, vol. 127, no. 24, pp. 2963–2971, 2018.
- [16] E. Ingulli, "Mechanism of cellular rejection in transplantation," *Pediatr. Nephrol.*, vol. 25, no. 1, pp. 61–74, 2010.
- [17] P. Briefing, "Transplant Immunology," *Br. Soc. Immunol.*, 2017.
- [18] W. W. Williams, D. Taheri, N. Tolkoff-rubin, and R. B. Colvin, "Clinical role of the renal transplant biopsy," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 8, no. 2, pp. 110–121, 2012.
- [19] R. Zhang, "Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients," pp. 1–11, 2017.
- [20] M. Haas *et al.*, "Banff 2013 meeting report: Inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions," in



- American Journal of Transplantation*, 2014.
- [21] J. Gimeno, D. Redondo, M. J. Pérez-Sáez, D. Naranjo-Hans, J. Pascual, and M. Crespo, "Impact of the Banff 2013 classification on the diagnosis of suspicious versus conclusive late antibody-mediated rejection in allografts without acute dysfunction," *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2016.
- [22] K. Solez and L. C. Racusen, "The Banff classification revisited," *Kidney International*. 2013.
- [23] A. Loupy, G. S. Hill, and S. C. Jordan, "The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure," *Nature Reviews Nephrology*. 2012.
- [24] R. John, A. Konvalinka, A. Tobar, S. J. Kim, H. N. Reich, and A. M. Herzenberg, "Determinants of long-term graft outcome in transplant glomerulopathy," *Transplantation*, 2010.
- [25] M. D. Wavamunno *et al.*, "Transplant glomerulopathy: Ultrastructural abnormalities occur early in longitudinal analysis of protocol biopsies," *Am. J. Transplant.*, 2007.
- [26] M. Seija *et al.*, "Rechazo agudo del trasplante renal: diagnóstico y alternativas terapéuticas," *Nefrol. Latinoam.*, vol. 14, no. 4, pp. 119–130, 2017.
- [27] P. C. Lee, L. Zhu, P. I. Terasaki, and M. J. Everly, "HLA-specific antibodies developed in the first year posttransplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss," *Transplantation*, 2009.
- [28] E. A. Hernández-Méndez *et al.*, "Incidencia de rechazo agudo en pacientes con disfunción del injerto renal," *Rev. Investig. Clin.*, vol. 65, no. 5, pp. 412–419, 2013.
- [29] C. Lefaucheur, D. Viglietti, M. Mangiola, A. Loupy, and A. Zeevi, "From Humoral Theory to Performant Risk Stratification in Kidney Transplantation," *Journal of Immunology Research*, vol. 2017. Hindawi Publishing Corporation, 2017.
- [30] C. Wiebe *et al.*, "Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant," *Am. J. Transplant.*, 2012.
- [31] R. A. Galeas *et al.*, "Anticuerpos anti-HLA y rechazo agudo del injerto renal en los niños.," *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, vol. Vol.67, N., pp. 492–502, 2010.
- [32] B. Sis, G. S. Jhangri, S. Bunnag, K. Allanach, B. Kaplan, and P. F. Halloran, "Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates Antibody-mediated damage despite lack of C4d staining," *Am. J. Transplant.*, 2009.
- [33] J. M. Burns *et al.*, "Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation," *Am. J. Transplant.*, vol. 8, no. 12, pp. 2684–2694, 2008.
- [34] L. E. Morales-Buenrostro, *Evaluación del riesgo inmunológico y terapia de inducción en trasplante renal*. 2016.