



 ARTÍCULO ESPECIAL

Pruebas de Histocompatibilidad en el Programa de Trasplantes

Claudia de-Leo-Cervantes*

* Laboratorio de Histocompatibilidad,
Departamento de Trasplantes. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

***Histocompatibility tasting
provides data to evaluate the
immunological risk for transplantation***

ABSTRACT

The importance of the role of the histocompatibility laboratory in solid organ transplantation is to perform HLA typing and determine the degree of HLA matching between recipient/donor. It is a useful tool to increase graft survival and decrease chronic rejection. HLA matching has a positive effect on kidney transplants and it has variable impact on other organ transplants. The crossmatch procedure is the most important test in a solid organ transplantation to evaluate the presence of recipient antibodies to antigens expressed on donor white cells. This test decreases the risk of hyperacute humoral rejection or early graft loss. Positive crossmatch is a contraindication for transplantation because it represents the existence of IgG recipient antibodies that will react against donor antigens. Antibody evaluation is important in donor-recipient selection and the responsibility of the histocompatibility laboratory is to identify clinically relevant anti-donor HLA antibodies. This detection is useful to determine the degree of humoral alloimmunization, expressed as a percent panel reactive antibody (%PRA). This test also provides information about the antibody specificity and can be used for evaluate a patient's immune status providing a significant correlation in selecting donors.

Key words. Human leucosyte antigens (HLA). Panel reactive antibody (PRA).

RESUMEN

La importancia del laboratorio de histocompatibilidad en los programas de trasplante de órganos sólidos es llevar a cabo la tipificación HLA para determinar el grado de compatibilidad que exhibe la pareja receptor/donador para el trasplante. Se tiene conocimiento que el grado de compatibilidad HLA representa un efecto positivo en el trasplante renal y en la disminución de los episodios de rechazo. Su impacto en la sobrevida de los injertos es variable en otros órganos. El procedimiento más importante para evaluar la presencia de anticuerpos preformados presentes en el suero del receptor en contra de los antígenos expresados en los linfocitos del donador es la prueba cruzada. Esta prueba permite disminuir el riesgo de un rechazo hiperagudo o la pérdida temprana del injerto. Una prueba cruzada positiva se considera como contraindicación para el trasplante por presencia de anticuerpos preformados detectables en el suero del receptor del tipo IgG en contra de los antígenos del donador en estudio. Parte de la responsabilidad del laboratorio de histocompatibilidad es la detección en el receptor de anticuerpos anti-HLA clínicamente relevantes dirigidos en contra de las especificidades antigenicas de su potencial donador. Esta evaluación es útil para conocer el grado de aloinmunización humoral del paciente (sensibilización) y se expresa como un porcentaje de reactividad de anticuerpos (%PRA). Esta prueba también permite conocer la especificidad del anticuerpo anti HLA presente, y así evaluar el estatus inmunológico del paciente y la selección del donador.

Palabras clave. Antígenos leucocitarios humanos. Panel reactivo de anticuerpos.

UN POCO DE HISTORIA

El trasplante de órganos y tejidos humanos es uno de los avances más importantes de la medicina moderna. Este avance es el resultado de una larga serie de investigaciones de las diversas especialidades

medicobiológicas, las cuales han permitido el éxito de los trasplantes en la actualidad, así como el correcto manejo de los inmunosupresores que hoy día se emplean.

Sin embargo, como parte del camino que llevó al conocimiento de la histocompatibilidad tuvieron que

desarrollarse trabajos como el del cirujano francés Alexis Carrel, quien, por 1914, implantó varias de las técnicas vasculares para trasplantes aún empleadas hasta nuestros días. La intensa investigación de Carrel demostró que el autoinjerto puede sobrevivir indefinidamente, pero el aloinjerto (trabajos realizados en perros) rápidamente cesa en sus funciones y postula que el organismo elimina el tejido extraño mediante el bazo o la médula ósea.

En 1933 se efectuó el primer trasplante renal de humano a humano por el cirujano ucraniano Yu Yu Voronoy.¹ El injerto nunca funcionó y el receptor falleció a los pocos días de la operación. Desde esa época varios intentos fracasaron y desalentaron el interés por este tipo de operaciones.

En 1940 Peter Medawar estableció las bases inmunológicas del rechazo y tolerancia tisular trabajando con implantes de piel sobre grandes áreas de quemaduras cutáneas. Otros investigadores demostraron que los linfocitos eran capaces de atacar el órgano transplantado aun en la ausencia de anticuerpos, y es, en 1952, cuando Jean Dausset (Figura 1) describe el complejo de genes de histocompatibilidad en los humanos (HLA), lo que permitió primeramente avanzar en el tan soñado campo de los trasplantes, posteriormente adentrarse en la investigación genética de las poblaciones y una de las más importantes: el conocimiento para entender el mecanismo molecular individual en el reconocimiento de lo propio y lo extraño.²

Así es como llegamos al primer trasplante renal con éxito absoluto realizado, en 1954, en el Hospital Peter Bent Brigham de Boston, por Joseph Murray *et al.* al transplantar un riñón entre gemelos univitelinos, documentando con esto que el sistema inmunitario era la clave para el trasplante óptimo de órganos y tejidos y, por consiguiente, el aumento en la sobrevida del injerto.



Figura 1. Jean Dausset describe los antígenos de HLA en 1952.

PRUEBAS REQUERIDAS PARA EL TRASPLANTE EN HUMANOS

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

1. Determinación del grupo sanguíneo ABO/Rh.
2. Tipificación de los antígenos HLA clase I – clase II.
3. Realización de pruebas cruzadas linfocitarias.
4. Monitoreo y detección de anticuerpos anti-HLA mediante un panel de linfocitos o antígenos HLA purificados.

Antígenos del sistema ABO de los grupos sanguíneos

Los antígenos de los grupos eritrocitarios humanos ABO (descubiertos por Karl Landsteiner) son antígenos potentes en los trasplantes de órganos y tejidos, debido a que los seres humanos presentan de manera natural anticuerpos (Acs) contra los antígenos del sistema mencionado. Su importancia estriba en que están presentes en los endotelios vasculares de diversos órganos. Si se trasplanta un órgano a un individuo ABO incompatible, los Acs naturales llamados isoaglutininas Anti A y/o Anti B del receptor producen una lesión tisular en el órgano transplantado, lo que conduce al rechazo. En consecuencia, el grupo sanguíneo del receptor y el donador debe ser establecido antes de realizar cualquier trasplante del mismo modo que se investiga antes de cualquier transfusión sanguínea.

Cabe mencionar que en programas de trasplante renal y de corazón se siguen las reglas que regulan a la transfusión sanguínea. Sin embargo, ahora hay evidencias de órganos sólidos transplantados 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 plasmaférésis o inmunoabsorción, más la utilización de fármacos inmunosupresores de inducción. El cruzar esta barrera permite que pacientes con tiempos prolongados en listas de espera para trasplante se vean beneficiados, de igual manera donantes vivos con HLA idénticos, pero con grupo sanguíneo incompatible con el receptor no tendrán que descartarse de entrada.³

Antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

También conocidos como antígenos HLA (por sus siglas en inglés human leukocyte antigens), son aquellos que al ser expresados por las células marcan la diferencia entre lo propio y lo extraño, e inducen en el receptor de un trasplante una respuesta inmunitaria, la cual dependiendo de la intensidad determina el tipo de rechazo. Este complejo está constituido por un grupo de genes que se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6 humano (segmento 6p21.3) normalmente heredados como un bloque llamado haplotipo, de manera mendeliana y codominante, constituyendo el fenotipo HLA de cada individuo. Los HLA se pueden agrupar en tres clases. Los de clase I que se denominan HLA-A, -B y -C, son expresados en la mayoría de las células nucleadas y plaquetas, constituyen los blancos mayores para las reacciones inmunes contra tejidos y órganos transplantados, en tanto que los de clase II constituidos por HLA-DP, -DQ y -DR se encuentran solamente en las células propias del sistema inmunológico como macrófagos, linfocitos B y T, células dendríticas y están más relacionados con inmunorregulación. Los antígenos de clase III son un grupo de genes que controlan a un grupo heterogéneo de proteínas como las activadoras del complemento entre otras y que no intervienen propiamente como antígenos de histocompatibilidad en los trasplantes.

La función normal de los antígenos HLA propios es presentar antígenos extraños al linfocito T e iniciar de este modo la respuesta inmune. En el desarrollo de esta respuesta las poblaciones de linfocitos T son específicas tanto para el antígeno como para las diferentes clases de HLA. Este tipo de reconocimiento forma la base para agrupar a los linfocitos T en dos grandes subpoblaciones:

1. CD8(+) citotóxicos que reconocen antígenos en asociación con HLA clase I.
2. CD4(+) que reconocen antígenos en asociación con HLA clase II.

El significado biológico del sistema HLA es especialmente relevante en la respuesta inmune del trasplante, debido a que los antígenos extraños (también fragmentos de HLA distintos) son reconocidos por el linfocito T sólo cuando son presentados en asociación con las moléculas de HLA propias. Los antígenos clase II están relacionados con el reconocimiento inicial y los clase I en el donante son los blancos primarios de la respuesta celular.

Cuando se efectúa un trasplante se están introduciendo en el receptor células del donante con antígenos de histocompatibilidad distintos a los del receptor. Las células presentadoras de antígenos (CPA) del órgano donado, muy probablemente células dendríticas, presentan sus HLA de clase II junto con los péptidos antígenicos correspondientes y ello es reconocido como extraño por los linfocitos T CD4+ del receptor que continuamente están circulando por el organismo. Hay también evidencia de que las propias CPA del huésped pueden procesar Ags del donante y presentarlo con sus propias moléculas HLA de clase II e incluso de que las células T pueden reconocer directamente los HLA clase I y clase II extraños.⁴

Técnicas de tipificación HLA

El método más usado para la tipificación del HLA es la prueba de microlinfocitotoxicidad o test NHI desarrollada en 1964 por el Dr. Paul Terasaki, en el cual los linfocitos viables (T-B) de la persona en estudio son expuestos a un panel de antisueros debidamente caracterizados en donde están incluidos los distintos tipos de HLA. Posteriormente se agrega suero de conejo como fuente de complemento que es capaz de provocar daño de la membrana celular de los linfocitos que han reaccionado con los antisueros y éstos se identifican en microscopía fluorescente. Los resultados se expresan en magnitud de reacción (1 = negativo, 2,4 = débilmente positivo y 6,8 = fuertemente positivo) dependiendo del porcentaje de lisis celular y la asignación de la tipificación se basa en la especificidad de los antisueros que producen reacciones positivas.⁵

Si bien la técnica mencionada sirvió históricamente por más de 30 años a los laboratorios de histocompatibilidad y logró estandarizarse a todo el mundo, actualmente y 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 (se eliminan con ello los errores de 20% en la asignación por serología), facilitando una mayor identificación del grado de compatibilidad entre el receptor y su potencial donador traduciéndose en mejores resultados clínicos.⁶

El tipo de método para la tipificación del DNA (SSP, SSOP, SBT y RSCA) dependerá del grado de resolución (baja, media o alta) que cada programa de trasplante requiera, al igual que la disponibilidad de recursos y experiencia.

Ha quedado perfectamente establecido el efecto benéfico que se alcanza cuando el genotipo HLA entre

el receptor y el donador es idéntico (dos haplotipos), este beneficio se traduce en un aumento en la sobrevida del injerto, disminución de episodios de rechazo, así como reducción en la cantidad de fármacos inmunosupresores.⁷ En el caso de individuos genéticamente no relacionados como el donante cadáverico no es posible identificar haplotipos y se habla de número de antígenos o alelos que comparten, es decir, si se realiza la identificación de los tres pares de alelos del HLA A,B,DR y la identidad entre receptor-donador es de cero disparidades o seis antígenos iguales se habla de una alta compatibilidad, y si el caso es seis disparidades o seis antígenos diferentes la compatibilidad es nula.

En términos generales, a mayor compatibilidad es mejor también la sobrevida esperada del trasplante, aunque para niveles intermedios de compatibilidad esta diferencia es menos importante probablemente como consecuencia de los tratamientos inmunosupresores modernos.

Pruebas cruzadas linfocitarias

Esta prueba sirve para detectar anticuerpos anti-HLA preformados, en contra de las células del donador, presentes en el suero del potencial receptor, con la finalidad de evitar un rechazo hiperagudo o pérdida temprana del injerto. El resultado de una prueba cruzada positiva contraindica la realización del trasplante.

La prueba cruzada es uno de los procedimientos más importantes y necesarios en el trasplante de órganos, sobre todo en el renal. Se utiliza la prueba de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento (descrita previamente) donde los linfocitos del potencial donador sirven como blanco para el suero del receptor. 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 ditiotreitol (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.⁸ Este estudio generalmente constituye una prueba de rutina en el informe del laboratorio de histocompatibilidad.

En la actualidad se han desarrollado también métodos más sensibles que la prueba cruzada conven-

cional. Éstas son las técnicas por citometría de flujo y la prueba cruzada con globulina antihumana (AHG), las cuales permiten detectar niveles muy bajos de anticuerpos circulantes, lo que facilita una mejor evaluación de la pareja receptor/donador para el trasplante. Aunque la prueba por citometría de flujo es muy sensible, su alto costo no permite todavía su uso rutinario, al menos en nuestro medio.

Detección de anticuerpos Anti-HLA (PRA)

El monitorear periódicamente la presencia de anticuerpos anti-HLA en los sueros de los pacientes que se encuentran en lista de espera para trasplante es sin duda alguna uno de los mayores logros clínicos en los laboratorios de histocompatibilidad. La información que se obtiene sirve para conocer el grado de aloinmunización humoral y se expresa como porcentaje de reactividad (%PRA), siendo el máximo 100%. De igual manera esta prueba permite conocer la especificidad de los anticuerpos formados y esta información nos correlaciona con precisión si existe o no incompatibilidad del receptor con el potencial donador en estudio y la posibilidad de desarrollar algún tipo de rechazo. Asimismo, es una herramienta útil para la selección de donadores en pacientes altamente sensibilizados. En términos generales, mientras mayor es el porcentaje de PRA más sensibilizado se encuentra el paciente y son menores las posibilidades de tener una prueba cruzada negativa con un potencial donador.

Las fuentes más comunes de sensibilización son:

- Transfusiones.
- Trasplantes previos.
- Embarazos y/o abortos.

Aproximadamente 33% de los individuos expuestos a eventos sensibilizantes producen anticuerpos anti-HLA,⁹ también otros factores pueden estimular la producción de anticuerpos entre los que se incluyen las vacunas, ciertos procesos infecciosos, pacientes con presencia de enfermedades autoinmunes, lo cual puede complicar la evaluación del paciente y se traduce en respuestas falsas positivas para determinadas pruebas. De aquí la importancia de conocer el perfil histórico de cada paciente candidato a trasplante mediante el monitoreo periódico del suero.

Es común observar que los pacientes que conforman las listas de espera para trasplante de donador cadáverico con un tiempo prolongado en las mismas, exhiban un alto porcentaje en sus PRA's, y por ende

disminuye su oportunidad de obtener un donador compatible.

Dentro de las técnicas empleadas para medir y detectar estos anticuerpos circulantes tenemos:

- Ensayo de linfocitotoxicidad dependiente de complemento CDC con aumento de AHG.
- Métodos por ELISA.
- Ensayo basado en técnicas de equipo fluoroanalizador (Luminex).
- Citometría de flujo (método de elección por sensibilidad y especificidad).

Ciertamente en nuestros días se cuenta con alta tecnología para el monitoreo de los anticuerpos anti-HLA y la responsabilidad de los laboratorios de histocompatibilidad es identificar en el receptor de trasplante estos anticuerpos anti-HLA clínicamente relevantes dirigidos contra el potencial donador en estudio.⁹ Para lograr su identificación es conveniente establecer las siguientes estrategias para evaluar la sensibilización de los pacientes candidatos a trasplante:¹⁰

- Identificar primero si el paciente presenta o no aloanticuerpos anti-HLA y si están dirigidos contra antígenos HLA clase I, clase II o ambos.
- Caracterizar la especificidad de los anticuerpos anti-HLA de clase I y clase II.
- Monitorear periódicamente la producción de anticuerpos anti-HLA tanto en pacientes no sensibilizados como en aquellos que ya los presentan para conocer su perfil de anticuerpos y títulos de los mismos.

Estos lineamientos nos permiten tener una mejor interpretación de las pruebas cruzadas linfocitarias y definir el tipo de antígenos HLA a los que el paciente de trasplante puede ser expuesto. Se debe recordar que ni aún el más potente inmunosupresor es efectivo en contra de la respuesta de memoria del sistema inmune, el cual incrementa los niveles de anticuerpos anti-HLA si se le reexpone a esos antígenos HLA presentes en el injerto.

Pacientes transplantados con bajos porcentajes de PRA's < 30% presentan mejores sobrevidas de los injertos comparándolos con los pacientes de PRA's altos, de igual manera pacientes candidatos a retrasplante con presencia de anticuerpos anti-HLA debido al primer trasplante exhiben curvas con disminución en la sobrevida del injerto.¹¹

CONCLUSIÓN

Las pruebas de histocompatibilidad proporcionan los datos necesarios para evaluar el riesgo inmunológico del paciente que será sometido al procedimiento de trasplante. El tipo de pruebas que se requieran dependerá de las necesidades específicas de cada programa, como: tipo de trasplante, tiempo de espera del mismo, eventos aloinmunizantes previos de los pacientes y otras consideraciones que de manera conjunta deberán considerar los laboratorios de histocompatibilidad y los responsables de los programas de trasplantes.

REFERENCIAS

1. Küss R, Bourget P. An Illustrated history of organ transplantation. The great adventure of the century. France: Laboratories Sandoz, Rueil Malmaison; 1992, p. 36.
2. Dausset J. The HLA adventure. In History of HLA: Ten recollections. (ed. Terasaki PI). Los Angeles, CA: UCLA Tissue Typing Laboratory; 1990, p. 3-17.
3. Tanabe K, Takahashi K, et al. Long-Term results of ABO-Incompatible living kidney transplantation. *Transplantation* 1998; 65: 224-8.
4. Lechner R, Warrens A. HLA in health and disease (2a. ed.). London: Academic Press; 2000, p. 73-99.
5. ASHI Laboratory Manual, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (4a. ed.). Lenexa, KS; 2000.
6. Bunce M, Young NT. Molecular HLA typing-the brave New World. *Transplantation* 1997; 64: 1505-13.
7. Ciccarelli JC. HLA typing immunogenetics and transplantation. *Cur Op Org Transplant* 2004; 9: 1-7.
8. Gebel HM, Bray RA, et al. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: Contraindication vs. Risk. *Am J Transplant* 2003; 3(12): 1488-1500.
9. Goggins R, Geiselhart L. Antibody screening beyond tears. *ASHI Quarterly* 2003; 27(2): 70-4.
10. Hubbell C, Kamoun M, et al. Guideline for the development of joint written agreements between histocompatibility laboratories and transplant programs. *ASHI Quarterly* 2004; 28(3): 96-8.
11. Opelz G, Wujciak B, et al. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative transplant study. *Rev Immunogenetics* 1999; 1: 334-42.

Reimpresos:

Claudia de-Leo-Cervantes

Laboratorio de Histocompatibilidad.

Departamento de Trasplantes.

Instituto Nacional de

Ciencias Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

Vasco de Quiroga No. 15

Col. Sección XVI, Tlalpan,

14080, México, D.F.

Tel.: 5487 0900 Ext. 2509

Fax: 5655 9471.

Correo electrónico: cdeleoc@yahoo.com