

Caracterización de los anticuerpos linfocitotóxicos por DTT en pacientes sensibilizados pretrasplante renal

S. Bustabad, T. González, M. Gantes, B. Rodríguez-Lozano y J. A. Hernández-Beriáin

Unidad de Histocompatibilidad e Inmunorreumatología (Servicio de Reumatología). Hospital Universitario de Canarias. Tenerife.

RESUMEN

En pacientes sensibilizados en lista de espera pretrasplante podría ser de interés estudiar la modificación de la citotoxicidad poliespecífica del suero frente a los linfocitos del panel utilizando el dithiothreitol (DTT), inactivador de los anticuerpos IgM. En este estudio se consideró a los pacientes sensibilizados con reactividad superior al 50 % del panel. De 21 pacientes sensibilizados en espera de un primer trasplante renal, en cinco disminuyó la linfocitotoxicidad, pudiéndose determinar las monoespecificidades antigénicas anti-HLA de clase IgG en cuatro casos, y en el otro caso la linfocitotoxicidad podría estar medida por autoanticuerpos. En 17 pacientes sensibilizados en espera de un segundo trasplante se pudieron concretar los antígenos HLA frente a los que estaban dirigidos los anticuerpos antilinfocitotóxicos IgG, que eran monoespecificidades HLA clase I de los respectivos donantes.

Así, este procedimiento, utilizando el DTT, permitiría reclasificar en algunos casos a pacientes sensibilizados poliespecíficos, que se comportarían como probables receptores no poliespecíficos, teniendo en cuenta que los anticuerpos linfocitotóxicos IgM no parecen influenciar la supervivencia del trasplante.

Palabras clave: **Anticuerpos linfocitotóxicos. DTT. Trasplante renal.**

DTT-CHARACTERIZATION OF LYMPHOCYTOTOXIC ANTIBODIES IN HIGHLY SENSITIZED PATIENTS

SUMMARY

In sensitized patients in waiting list to be subjects of a kidney transplant it might be of interest to study the modification of the polyspecific cytotoxicity of the serum against the lymphocytes of the panel using the dithiothreitol (DTT), inactivator of the IgM antibodies. In this study we considered sensitized patients with a reactivity higher than 50 % of the panel. In the 21 sensitized patients in the waiting list to the subjects of a first renal transplant, the lymphocytotoxicity diminished in 5 of them and we could determine the antigenic monospecific anti-HLA of IgG class in 4 cases and in the other one the lymphocytotoxicity could be mediated by autoantibodies. In the 17 sensitized patients in

Recibido: 14-IX-92.
En versión definitiva: 2-I-93.
Aceptado: 5-I-93.

Correspondencia: Dra. Sagrario Bustabad.
Servicio de Reumatología.
Hospital Universitario de Canarias.
Tenerife.

waiting for a second transplant we could specify the HLA antigens against which the antilymphocytotoxic IgG antibodies were directed, which were HLA monospecificities of class I of the respective donors.

So, this procedure, using DTT, will allow to classify again polyspecific sensitized patients in some cases, that would act as possible no polyspecific receptors if we take into account that the IgM lymphocytotoxic antibodies do not seem to influence the transplant survival.

Key words: **Lymphocytotoxic antibodies. DTT. Renal transplantation.**

Introducción

En el trasplante renal los anticuerpos linfocitotóxicos (ALC) anti-HLA representan una de las principales barreras en la selección donante-receptor, por lo que en la lista de espera los pacientes sensibilizados por ALC tienen menos oportunidades de ser trasplantados. En este estudio se programó la caracterización de los ALC en pacientes sensibilizados con respecto a la clase de los anticuerpos y la citotoxicidad frente a poblaciones linfocitarias, intentando la selección inmunológica ante la posibilidad de ser receptores de injerto renal.

Pacientes y métodos

En una lista de espera para trasplante renal de 178 pacientes, 38 estaban sensibilizados con reactividad de ALC superior al 50 % de un panel de linfocitos representativo de los antígenos HLA, durante un período mínimo de seis meses; se estudiaron cuatro sueros de cada paciente. Pertenecían a la categoría H3 (sensibilizados pretrasplante) 21 pacientes (fig. 1) y 17 (fig. 2) a la categoría RTH3 (sensibilizados en lista de espera para un segundo trasplante).

El tipaje HLA-A, B, C, DR se realizó según técnica de microlinfocitotoxicidad NIH¹. Para investigar la linfocitotoxicidad del suero se enfrentó una muestra de éste a un panel de 35 células con los antígenos de histocompatibilidad reconocidos (Workshop HLA, Hakone, 1991). Los sueros se enfrentaron a linfocitos totales y a linfocitos T y B.

El dithiothreitol (DTT) es un compuesto sulfidrilo que inactiva los anticuerpos IgM. El ensayo de la citotoxicidad frente a los linfocitos del panel se modificó utilizando el DTT y la globulina antihumana. El suero a estudiar se incubó con igual volumen de 0,01 M de DTT o PBS, como control, durante 30 minutos a 37° C, para posteriormente añadirle una lambda de linfocitos e incubarlo a temperatura ambiente durante 30 minutos, tras los cuales se añadieron cinco lambdas de complemento y se incubó de nuevo durante 60 minutos; transcurrido este tiempo se colocaron tres lambdas de eosina y siete de formol y se procedió a la lectura². La globulina antihumana se utilizó como facilitadora de la citotoxicidad según el procedimiento de Fuller y cols.³. Si un suero con ALC negativizaba su citotoxicidad después del tratamiento con DTT, los anticuerpos eran de clase IgM, y, por el contrario, si la citotoxicidad no variaba, los anticuerpos eran IgG. Cuando la citotoxicidad disminuyó más del 25 % frente al número

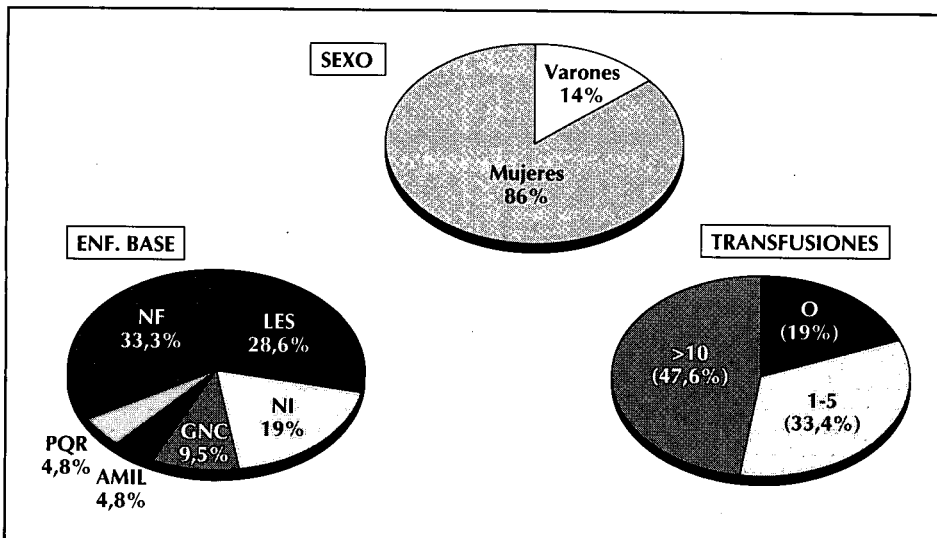


Fig. 1.—Pacientes en categoría H3 (sensibilizados pretrasplante).

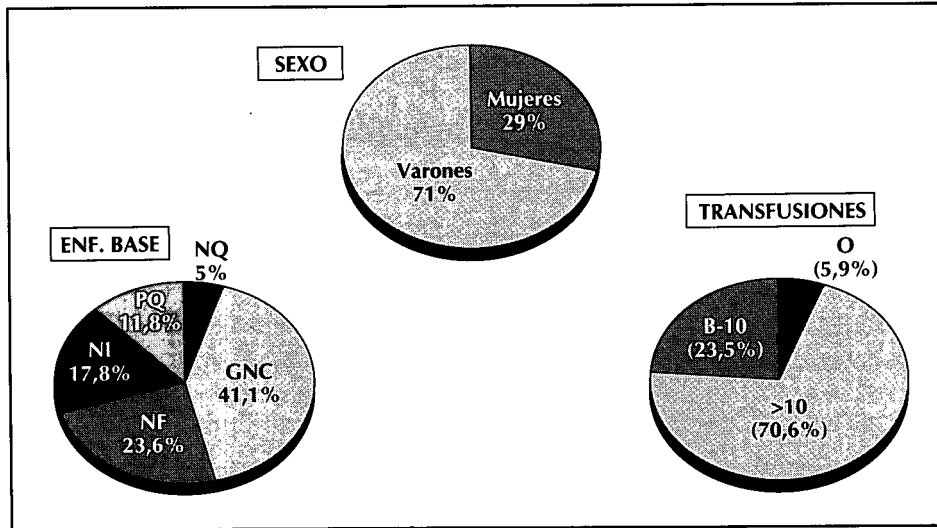


Fig. 2.—Pacientes en categoría RTH3 (sensibilizados en lista de espera para un segundo trasplante).

de células del panel de linfocitos se consideró⁴ que existían en el suero ambas clases de anticuerpos (IgG + IgM).

En el cálculo de la significación estadística se siguió el método de Mantel-Cox y Breslow.

Resultados

En los 21 pacientes sensibilizados categoría H3 (tabla I) se obtuvieron los siguientes resultados: en 16 casos

(76,2 %) se mantuvo el grado de reactividad (los ALC eran IgG), en cinco casos (23,8 %) disminuyó la citotoxicidad (IgG + IgM) y ningún suero se negativizó. Los cinco pacientes que eran DTT-sensibles (IgG + IgM) presentaban citotoxicidad frente a células T y B en tres casos, y en dos sólo a células B. Al disminuir la reactividad al panel se pudo determinar en cuatro casos la especificidad antigénica de los ALC, siendo anti-HLA clase I (A2 + A9, A3, B5, B8, respectivamente). En el suero DTT-sensible, el auto-crossmatch fue positivo con y sin DTT.

Los 17 pacientes con categoría RTH3 (tabla II) se sensibilizaron con posterioridad al implante del injerto. Todos tenían anticuerpos anti-T y anti-B; en ocho casos la citotoxicidad fue similar para ambas poblaciones celulares y en nueve casos fue superior para las células B. Se obser-

Tabla I. Linfocitotoxicidad en pacientes H3 *

| Caso | Sin DTT (%) | Con DTT (%) | | Anti HLA |
|------|-------------|-------------|-----------|------------------------------------------|
| | | Clase IgG | Clase IgM | |
| 1 | 83 | 33 | 50 | A2+A9 |
| 2 | 95 | 95 | 0 | Poliespecífico |
| 3 | 92 | 92 | 0 | Poliespecífico |
| 4 | 83 | 81 | 2 | Poliespecífico |
| 5 | 95 | 70 | 25 | A3 |
| 6 | 67 | 55 | 12 | Poliespecífico |
| 7 | 67 | 67 | 0 | Poliespecífico |
| 8 | 92 | 90 | 2 | Poliespecífico |
| 9 | 75 | 70 | 5 | Poliespecífico |
| 10 | 60 | 50 | 10 | Poliespecífico |
| 11 | 75 | 70 | 5 | Poliespecífico |
| 12 | 100 | 90 | 10 | Poliespecífico |
| 13 | 67 | 63 | 4 | Poliespecífico |
| 14 | 70 | 43 | 27 | B8 |
| 15 | 58 | 33 | 25 | B5 |
| 16 | 100 | 90 | 10 | Poliespecífico |
| 17 | 60 | 48 | 12 | Poliespecífico |
| 18 | 60 | 57 | 3 | Poliespecífico |
| 19 | 60 | 48 | 12 | Poliespecífico |
| 20 | 55 | 55 | 0 | Poliespecífico |
| 21 | 65 | 40 | 25 | Poliespecífico (autocrossmatch positivo) |

* Sensibilizados pretrasplante.

Tabla II. Linfocitotoxicidad en pacientes RTH3 *

| Caso | Sin DTT (%) | Con DTT (%) | | Anti HLA |
|------|-------------|-------------|-----------|----------------|
| | | Clase IgG | Clase IgM | |
| 1 | 100 | 90 | 10 | Poliespecífico |
| 2 | 55 | 40 | 15 | Poliespecífico |
| 3 | 55 | 55 | 0 | Poliespecífico |
| 4 | 67 | 57 | 10 | Poliespecífico |
| 5 | 62 | 62 | 0 | Poliespecífico |
| 6 | 55 | 50 | 5 | Poliespecífico |
| 7 | 80 | 80 | 0 | Poliespecífico |
| 8 | 85 | 60 | 25 | A2+A9 |
| 9 | 95 | 95 | 0 | Poliespecífico |
| 10 | 80 | 70 | 10 | Poliespecífico |
| 11 | 60 | 52 | 12 | Poliespecífico |
| 12 | 100 | 100 | 0 | Poliespecífico |
| 13 | 80 | 43 | 37 | A9 |
| 14 | 95 | 95 | 0 | Poliespecífico |
| 15 | 75 | 40 | 35 | B5+B35 |
| 16 | 100 | 90 | 10 | Poliespecífico |
| 17 | 82 | 76 | 6 | Poliespecífico |

* Sensibilizados en lista de espera para un segundo trasplante.

vó que en tres casos (17,6 %) había una disminución de la reactividad con el DTT, pudiéndose determinar entonces la especificidad antigénica (anti-HLA clase I: A2 + A9, A9, B5 + 35, respectivamente); estos anticuerpos desarrollados en el postrasplante estaban dirigidos contra antígenos del donante.

Al comparar la linfocitotoxicidad frente a células T y B en las dos categorías (H3 y RTH3) se observó que la citotoxicidad frente a las células B era superior en el 11,7 % de los pacientes de categoría H3 y en el 53 % de los que estaban en categoría RTH3 ($p < 0,01$).

Discusión

Se consideró en este estudio como sensibilización del receptor potencial de riñón una tasa mantenida de ALC dirigida a más del 50 % de linfocitos de un panel representativo de las diferentes especificidades HLA. En esta situación, la prueba cruzada, enfrentando el suero del receptor sensibilizado con los linfocitos de los posibles donantes, es con frecuencia positiva. De aquí que se planteen en la lista de espera pretrasplante la «desigualdad de oportunidades» de estos receptores sensibilizados para recibir un injerto. Es un objetivo de los centros investigar las posibilidades de trasplante de estos pacientes modificando las condiciones aceptadas para la práctica habitual del trasplante renal. Así se ha planteado la investigación diferenciada de una prueba cruzada positiva en relación con la supervivencia del injerto. Otra línea de investigación es la seguida en este trabajo: el estudio del comportamiento de los sueros considerados sensibilizados con objeto de su caracterización reactiva que permita una valoración discriminatoria de su potencial capacidad citotóxica en el trasplante. A este respecto hemos considerado dos situaciones estándares en la «lista de espera» pretrasplante: los pacientes sensibilizados que esperan un primer injerto y los pacientes que rechazarán el primer injerto y esperan el segundo.

El DTT es un compuesto sulfidrido que inactiva los anticuerpos IgM reduciendo los puentes disulfuros, mientras que las otras clases de inmunoglobulinas no modifican su capacidad de unión al antígeno. Si un suero con ALC después del tratamiento con DTT da resultado negativo, se considera que los anticuerpos son IgM. Cuando la reducción de la citotoxicidad es incompleta se interpreta que existen en el suero ALC IgG + IgM. La linfocitotoxicidad causada por autoanticuerpos es generalmente de clase IgM y se considera⁵⁻²⁰ que no influencia la supervivencia del injerto, aunque algunas reservas se plantean²¹⁻²⁴ en relación con la actuación de autoanticuerpos IgM.

La citotoxicidad frente a linfocitos T y B no aportó diferencias en cuanto a la reclasificación de los pacientes sensibilizados en lista de espera. Aunque los anticuerpos anti-HLA de clase I reaccionan frente a células T y B, en ocasiones, como en dos casos de esta serie del subgrupo H3, la citotoxicidad puede expresarse sólo en linfocitos

B en razón de la mayor densidad antigénica de las moléculas HLA clase I en la membrana de estas células²⁵. Los autoanticuerpos tienen reactividad¹³ frente a las dos poblaciones linfocitarias o sólo frente a linfocitos B. Como la linfocitotoxicidad en la categoría RTH3 fue superior, con significación estadística, frente a células B, es posible que en esta situación inmunológica la respuesta de ALC sea más marcada frente a moléculas HLA de clase II que en la situación H3; es factible, sin embargo, que este grupo de pacientes tengan títulos bajos de anticuerpos de clase I que puedan ser detectados sólo sobre los linfocitos B.

En nuestros resultados destaca que cuando se trató a los sueros sensibilizados con DTT, cinco casos eran DTT parcialmente sensibles (IgG + IgM). Cuando, después de tratados con DTT, se probó la reactividad de dichos sueros frente al panel, se halló que estos cinco casos previamente poliespecíficos se comportaban en cuatro casos con reactividad de ALC de clase IgG sólo a especificidades concretas anti-HLA clase I y en uno los ALC eran positivos frente al panel y frente a los propios linfocitos, con y sin DTT, por lo que podrían ser autoanticuerpos con actuación no nociva para el injerto.

Se podría, pues, reclasificar en algunos casos la caracterización específica de la reactividad del suero y conforme a esta reclasificación considerar a posibles receptores como no poliespecíficos, teniendo en cuenta que los ALC de clase IgM no parecen influenciar la supervivencia del injerto.

Bibliografía

1. Terasaki PI y McClelland JD: Microdropped assay of humans serum cytotoxins. *Nature*, 204:998-1000, 1964.
2. Okuno T y Kondelis N: Evaluation of dithiothreitol (DTT) for inactivation of IgM antibodies. *J Clin Pathol*, 31:1152-1155, 1978.
3. Fuller TC, Phelan D, Gebel HM y Rodey GE: Antigenic specificity of antibody reactive in the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity tests. *Transplantation*, 34:24-28, 1982.
4. Crowe DO, Gilpatrick BL y Green WF: DTT-sensitive samples found on regional organ procurement trays. *Transplantation*, 48:705-708, 1989.
5. Reekers P, Lucassen-Hermans R, Koene RAP y Kunst VAJM: Autolymphocytotoxic antibodies and kidney transplantation. *Lancet*, 1:1063-1065, 1977.
6. Ting A y Morris PJ: Renal transplantation and B-cell cross-matches with autoantibodies and alloantibodies. *Lancet*, 2:1095-1097, 1977.
7. Ting A y Morris PJ: Successful transplantation with a positive T and B cell crossmatch due to autoreactive antibodies. *Tissue Antigens*, 21:219-222, 1983.
8. Ettenberg RB, Jordan SC y Fine RN: Cadaver renal transplant outcome in recipients with autolymphocytotoxic antibodies. *Transplantation*, 35:429-431, 1983.
9. Chapman JR, Taylor CJ, Ting A y Morris PJ: Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches. *Transplantation*, 42:608-613, 1986.
10. Rudy T y Opelz G: Dithiothreitol treatment of crossmatch sera in highly immunized transplant recipients. *Transplant Proc*, 19:800-802, 1987.
11. Vaidya S y Ruth J: Contributions and clinical significance of IgM and autoantibodies in highly sensitized renal allograft recipients. *Transplantation*, 47:956-958, 1989.
12. Taylor CJ, Chapman JR, Ting A y Morris PJ: Characterization of

S. BUSTABAD y cols.

- lymphocytotoxic antibodies causing a positive crossmatch in renal transplantation. *Transplantation*, 48:953-958, 1989.
13. Ting A: Positive crossmatches - when is it safe to transplant. *Transplant Int*, 2:2-7, 1989.
 14. Tellis VA, Matas AJ, Senitzer D, Louis P, Glicklich D, Soberman R y Veith FJ: Successful transplantation after conversion of positive crossmatch to negative by dissociation of IgM antibody. *Transplantation*, 47:127-129, 1989.
 15. Alarif L, Snyder T y Light JA: Transplantation of highly sensitized patients based on crossmatches using DTT-treated sera. *Transplant Proc*, 21:742-744, 1989.
 16. Louis P, Senitzer D, Tellis VA y Matas AJ: Successful transplantation after conversion of a positive crossmatch to negative by dissociation of IgM antibody. *Transplant Proc*, 21:764-765, 1989.
 17. Karuppan SS, Lindholm A y Moller E: Characterization and significance of donor-reactive B cell antibodies in current sera of kidney transplant patients. *Transplantation*, 49:510-515, 1990.
 18. Ettenger R y Robertson L: The evaluation and relevance of autolymphotoxic antibody in the highly presensitized patient. *Transplantation*, 42:302-304, 1986.
 19. Roy R, Belles-Isles M, Pare M, Lachance JG y Noel Real: The importance of serum dithiothreitol treatment in crossmatching selection of presensitized kidney transplant recipients. *Transplantation*, 50:532-534, 1990.
 20. Gómez RA, Menchaca EM, Way DN, Freeman TM y Ward WW: Dithiothreitol reduction of IgM antibody and autoabsorption of non-HLA antibodies using autologous lymphocytes: working to give every potential organ transplant recipient the chance of a lifetime. *Hum Immunol* (abstract), 34:85, 1992.
 21. Wetzsteon PJ, Head MA, Fletcher LA, Barry JM y Norman DJ: Successful transplantation across positive crossmatches: a result of detailed pretransplant antibody analysis. *Transplant Proc*, 21:714-715, 1989.
 22. Barger B, Shroyer TW, Hudson SL, Deierboi MH, Barber WH, Curtis JJ, Julian BA, Luke RG y Diethelm AG: Successful renal allografts in recipients with crossmatch-positive, dithiothreitol-treated negative sera. *Transplantation*, 47:240-245, 1989.
 23. Spees E y McCalmon R: Successful kidney transplantation with a positive IgM crossmatch. *Transplant Proc*, 22:1887-1888, 1990.
 24. Barocci S, Valente U, Gusmano R, Perfumo F, Cantarella S, Leprini A, Icardi A y Nocera A: Autoreactive lymphocytotoxic IgM antibodies in highly sensitized dialysis patients waiting for a kidney transplant: identification and clinical relevance. *Clinical Nephrology*, 36:12-20, 1991.
 25. Pellegrino M, Belverede M, Pellegrino AG y Ferrone S: B peripheral lymphocytes express more HLA antigens than T peripheral lymphocytes. *Transplantation*, 25:93-95, 1978.