

Estudio inmunológico de la pareja donante-receptor

M.^a Guadalupe Ercilla, Jaime Martorell

Servicio de Inmunología (CDB). Hospital Clínic de Barcelona

Nefrología 2010;30(Supl. 2):60-70

doi:10.3265/Nefrologia.pre2010.Nov.10692

RESUMEN

El objetivo del estudio consiste en evaluar el riesgo de pérdida del injerto.

Deben identificarse en el receptor los aloanticuerpos donante-específicos y determinarse las incompatibilidades HLA entre receptor y donante.

Para determinar los aloanticuerpos existen diferentes métodos que tienen diferente sensibilidad y diferente valor pronóstico, unos determinan un alto riesgo de rechazo hiperagudo, otros un aumento en el riesgo de pérdida de injerto en trasplantes.

Determinaciones en la primera fase del estudio pretrasplante:

- Tipificación HLA del receptor y de los posibles donantes.
- Aloanticuerpos por citotoxicidad dependiente de complemento frente a panel (PRA-CDC) y cribado de aloanticuerpos anti-HLA por fase sólida.
- En enfermos sensibilizados, puede ser útil identificar las incompatibilidades aceptables mediante una determinación de antígeno aislado en fase sólida y la evaluación del «crossmatch virtual» (VCM).

Estudio pretrasplante inmediato (10 días):

- Prueba cruzada linfocitaria por citotoxicidad (CM-CDC) entre receptor y donante.
- Prueba cruzada linfocitaria por citometría de flujo entre receptor y donante (FCCM) especialmente indicada en el trasplante. Permite también descartar autoanticuerpos IgM.

Desensibilización de los receptores: evaluar la necesidad real y las posibilidades de éxito antes de iniciar un tratamiento.

Monitorización inmunológica postrasplante:

Determinación de aloanticuerpos si es necesario para:

- Diagnóstico diferencial de episodio de rechazo corticorresistente con componente humoral.
- Como marcador de probabilidad de la reducción de supervivencia a largo plazo.

Epílogo: Debe valorarse la historia de alosensibilización del receptor. El *crossmatch* por citotoxicidad pronostica un alto riesgo de rechazo hiperagudo y se considera una contraindicación. El *crossmatch* por citometría indica un aumento de riesgo de pérdida al año del injerto, bajo en el primer trasplante (>10%), pero mayor en el retrasplante (>30%). El VCM por fase sólida positivo indica un incremento del riesgo de un episodio de rechazo mediado por anticuerpos (del 5 al 55%), pero no contraindica necesariamente el trasplante.

Immunological study of the donor-recipient pair

ABSTRACT

The objective of the study is to evaluate the risk of graft failure.

The presence of donor specific alloantibodies and the HLA incompatibilities between donor and recipient must be identified.

There are several methods to identify alloantibodies that has different sensitivity and different Prognostic Value. Some define a high risk of hyperacute rejection, others an increase in the risk to loss the graft in defined subgroups.

First steps of the pretransplant study identify:

- HLA typing of the recipient and available donors.*
- Alloantibodies by Complement Dependent Cytotoxicity against Panel (PRA-CDC) and screening of alloantibodies against HLA by Solid Phase.*
- In sensitized recipients it can be useful to identify acceptable incompatibilities using Single Antigen Solid Phase technique and to evaluate the «Virtual Crossmatch».*

Pretransplant study (10 days):

- Crossmatch by Cytotoxicity (CM-CDC) between recipient and donor.*
- Crossmatch by Flow-Cytometry (FCCM) between recipient and donor specially indicated in the retransplant. Useful also to discard IgM auto-antibodies.*

Recipients desensitization: *the necessity and success probability of desensitization should be evaluated before treatment.*

Post-Transplant Monitoring:

Identify alloantibodies for:

- The differential diagnostic of corticorresistant rejection episodes with humoral component.*

Correspondencia: M.^a Guadalupe Ercilla
Servicio de Inmunología (CDB).
Hospital Clínic de Barcelona.
Villarroel, 170. 08036. Barcelona.
gercilla@clinic.ub.es

b) As a marker of long term reduced graft survival probability in the long term.

Final remarks: Evaluation should consider the allosensibilization history of the recipient. The cytotoxicity crossmatch indicates a high risk of hyperacute rejection and is considered a contraindication. The Flow Cytometry crossmatch indicates an increase in the probability to lose the graft in the first year that is low for first transplants (>10%) but higher for retransplantation (>30%). The virtual crossmatch by solid phase indicates an increase in the probability to have an antibody mediated rejection (from 5% to 55%) but did not contraindicate always the transplant.

INTRODUCCIÓN

El estudio inmunológico de la pareja donante-receptor pretende cuantificar y minimizar la probabilidad de pérdida del injerto a corto y largo plazo. El riesgo de pérdida del injerto puede pronosticarse pretrasplante y postrasplante mediante el uso de diversas determinaciones inmunológicas. El resultado de estas determinaciones permite no sólo evitar los trasplantes de muy alto riesgo sino también ofrecer el tipo de tratamiento inmunosupresor adecuado a cada nivel de riesgo.

La clásica prueba cruzada linfocitaria por citotoxicidad o *crossmatch*-CDC tiene un alto valor pronóstico positivo (VPP) sobre la pérdida del injerto (80%) y su positividad clásicamente contraindica el trasplante renal. Otras pruebas poseen un valor pronóstico menos rotundo y su positividad indica aumentos en el riesgo de pérdida del injerto que oscilan entre el 10 y el 30% al año.

La decisión de llevar a cabo un determinado trasplante dependerá de: 1) el nivel de riesgo que se considere asumible; 2) las alternativas existentes para un determinado paciente, y 3) las herramientas diagnósticas y terapéuticas de las que se dispone.

La elección del tipo e intensidad del tratamiento inmunosupresor más adecuado deberá hacerse evaluando conjuntamente los datos actuales y la historia de alorrespuesta del paciente.

El éxito de los trasplantes depende de evitar la alorrespuesta del receptor frente a las diferencias en los antígenos mayores de histocompatibilidad del órgano trasplantado, principalmente del sistema HLA. La alorrespuesta será más intensa cuanto mayor sea la diferencia entre donante y receptor.

La mayoría de los inmunosupresores disponibles pueden inducir la aceptación del injerto, pero en general son poco eficaces sobre las células plasmáticas productoras de aloanticuerpos.

ELECCIÓN DE LAS TÉCNICAS

Los objetivos de la mayoría de las técnicas utilizadas son:

1. Evaluar las incompatibilidades que el receptor va a detectar en las células del donante.
2. Identificar la presencia en un receptor de aloanticuerpos dirigidos contra polimorfismos HLA de posibles donantes.
3. Identificar si los aloanticuerpos del receptor reaccionan contra los polimorfismos expresados en el donante propuesto.
4. Identificar el tipo de inmunoglobulina (IgM o IgG) y la diana (HLA-I, HLA-II, o no HLA).

Las distintas técnicas que identifican aloanticuerpos coinciden en su mayoría, pero no absolutamente; las dianas de cada técnica son diferentes (células viables o antígenos HLA purificados). Se evidencian por métodos distintos (capacidad citotóxica o marcadores de IgG) y tienen, además, diferentes niveles de sensibilidad, y son interferidas por elementos diferentes (v. anexo I).

En la práctica cada método sirve para pronosticar eventos distintos y/o con diferentes valores pronósticos. Es la evaluación conjunta de las distintas pruebas lo que nos permitirá evaluar el riesgo real.

En cada técnica debemos considerar el tipo de evento que pretendemos pronosticar y el valor pronóstico positivo (VPP) o negativo (VPN) de su resultado.

Los estudios prospectivos para evaluar el valor pronóstico de las pruebas de más reciente introducción, respecto de eventos clínicos bien definidos, son escasos. Su evaluación respecto de técnicas de referencia puede inducir a cierta confusión por cuanto las nuevas técnicas postulan una mayor sensibilidad. Todo indica que este *plus* de sensibilidad no tiene el mismo valor pronóstico que la técnica de referencia (p. ej., citotoxicidad) y puede incluso pronosticar eventos distintos a los de esta técnica de referencia.

La elección de las técnicas que deben utilizarse debe fundamentarse en la utilidad clínica de la información proporcionada, pero también deben considerarse el coste económico y las dificultades logísticas y de personal, evitando en lo posible el consumo innecesario de recursos.

Para asegurar la eficiencia y la fiabilidad de las pruebas, el laboratorio debe mantener un control de sus procesos y de sus resultados. Una garantía de este control es la acreditación de los procesos y el control de calidad de los resultados evaluados por organismos externos expertos en histocompatibilidad (p. ej., *Programa de Acreditación de la European Federation of Immunoge-*

ANEXO 1. Descripción de las técnicas disponibles para el estudio de aloanticuerpos**1 Cribado de aloanticuerpos, identificación de aloanticuerpos anti-HLA o PRA de «Panel Reacting Antibodies»:****1.1 Aloanticuerpos por citotoxicidad dependiente de complemento (PRA-CDC)**

La técnica se basa en el efecto citolítico del complemento sobre los linfocitos en cuya superficie tiene lugar una reacción antígeno (de la células) con un anticuerpo (sérico). Esta reacción se realiza con un panel de células de diferentes donantes (30-60) portadores de antígenos HLA distintos. Esta técnica detecta la presencia en suero de anticuerpos citotóxicos de clase IgG1, IgG3 e IgM.

La asignación de especificidad se realiza por correlación matemática entre la presencia de un determinado antígeno en los linfocitos y las reacciones positivas y negativas del suero. La asignación de especificidad es especialmente fiable si se ha repetido en varias ocasiones con suero de fechas distintas. En los receptores con múltiples aloanticuerpos la definición de los alelos aceptables por técnicas de citotoxicidad es imprecisa dado que cada célula expresa 6 alelos.

1.2 Cribado aloanticuerpos anti-HLA por fase sólida

Se fundamenta en la unión a una «fase sólida» de antígenos HLA purificados a partir de células de múltiples individuos. Esta base sólida puede ser: 1) placa de ELISA de poliestireno; 2) microesferas de poliestireno con marcaje fluorescente interno identificable por citometría (Flow-PRA/ citómetro de flujo, Luminex), o 3) matrices de distribución puntual en diferentes tipos de soporte (*Microarrays*). La reacción se revela con un anticuerpo secundario generalmente anti-IgG-humana marcado con enzimas o fluorocromos, por lo que no se detectan anticuerpos de tipo IgM (excepto que se utilice una anti-IgM), ni aquellos dirigidos contra antígenos no HLA (p. ej., autoanticuerpos).

1.3 Asignación de especificidad anti-HLA con técnicas de fase sólida

Puede hacerse por dos sistemas:

1) Dianas multialélicas de un individuo único: cada microesfera está rebozada de los antígenos purificados procedentes de una línea celular (en general dos alelos) de clase I locus 2A + 2B + 2C, o bien clase II 2DR y/o 2DQ y/o 2DP; se utilizan diversas microesferas con antígenos de diferentes líneas celulares. La asignación de especificidad se realiza por correlación matemática entre la presencia de un determinado alelo en la microesfera y las reacciones positivas y negativas con las distintas dianas.

2) Dianas con antígenos aislados (o «single antigen»): cada microesfera está rebozada con un solo alelo HLA clase I o de HLA clase II. El sistema de antígeno aislado es más preciso para la identificación de las incompatibilidades aceptables, es decir, aquellos alelos contra los que el receptor no tiene aloanticuerpos.

Cuando se utilizan como dianas las técnicas de microesferas (Luminex) el resultado se expresa en MFI (*Median Fluorescence Intensity*) y es una media de la lectura de decenas (50-100) de microesferas que poseen el mismo alelo, por lo que el resultado es más fiable que el estudio de uno o dos pocillos de una placa de ELISA.

Por el momento el antígeno aislado no está disponible en forma de *Microarrays*.

Los métodos de fase sólida tienen la ventaja que no detectan anticuerpos contra antígenos no HLA. Sin embargo, existe la posibilidad teórica de que en el proceso de obtención y unión a la fase sólida las moléculas HLA puedan sufrir cambios conformacionales que interfieran con la unión a algunos aloanticuerpos o que den lugar a reacciones inespecíficas.

2. Prueba cruzada linfocitaria (o Crossmatch o X-Match)**2.1 Prueba cruzada linfocitaria por CDC entre donante y receptor**

Basada en la técnica CDC, hace reaccionar el suero del receptor con los linfocitos del donante en presencia de complemento. La positividad de la reacción se visualiza con ayuda de un colorante vital, que penetra a través de la membrana celular si ha sido permeabilizada por el complemento. Detecta anticuerpos de clase IgG1, IgG3 e IgM.

Se puede realizar a partir de linfocitos totales o de subpoblaciones celulares. Si se separan las subpoblaciones de linfocitos T y B es posible diferenciar los anticuerpos anti-HLA-I de los anti-HLA-II (tabla 1).

Se puede realizar un tratamiento con DTT (que destruye las IgM) para diferenciar anticuerpos linfocitotóxicos de tipo IgM (generalmente autoanticuerpos) de los de tipo IgG (tabla 2).

Tabla 1. Identificación de anticuerpos anti-HLA-I y HLA-II

Tipo de linfocitos	Anti- HLA I	Anti- HLA II
CDC linfocitos totales	Pos.	Neg. (10-40% mortalidad)
CDC linfocitos T	Pos.	Neg.
CDC linfocitos B	Pos.	Pos.

Tabla 2. Identificación de tipo de inmunoglobulina en CDC

Tratamiento del suero	IgG	IgM
Sin DTT (pre-DTT)	Pos.	Pos.
Con DTT (post-DTT)	Pos.	Neg.

[Continúa en página siguiente>](#)

ANEXO 1. Descripción de las técnicas disponibles para el estudio de aloanticuerpos. (Continuación)

Para conocer de forma aproximada la «cantidad» de aloanticuerpos anti-HLA en el receptor se pueden detectar la citotoxicidad del suero a diferentes diluciones (desde 1/1 a 1/512). Este análisis tiene interés en caso de pretender desensibilizar al receptor.

2.2 Prueba cruzada linfocitaria por citometría de flujo entre donante y receptor

La unión de los anticuerpos del suero del receptor a los antígenos de membrana de los linfocitos del donante se identifica con una antiinmoglobulina humana (generalmente un Fab2-anti-IgG) marcada con un fluorocromo detectable por citometría de flujo.

Para identificar los subtipos de linfocitos con los que reacciona el suero, éstos se identifican con anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo distinto del de la anti-IgG. Habitualmente se utiliza anti-CD3 para identificar los linfocitos T y anti-CD19 o anti-CD20 para identificar los linfocitos B. Las células T (sin activar) expresan sólo HLA-I, mientras que las células B expresan HLA-I + HLA-II. Los anticuerpos anti-HLA-I reaccionarían con las células T y B. Los anticuerpos anti-HLA-II sólo reconocerían los linfocitos B (tabla 3).

La identificación de los linfocitos T y B permite, además, minimizar la interferencia derivada de la presencia fisiológica de inmunoglobulinas humanas en la membrana de los linfocitos B.

La positividad se calcula generalmente basándose en el cambio en el canal medio de fluorescencia (= [canal medio del suero problema] – [canal medio del control negativo]).

El dintel de positividad debe establecerse en cada laboratorio. Los valores de corte habituales oscilan entre 10 y 40 y pueden ser distintos para linfocitos T (CD3+) y para linfocitos B (CD19+)¹. Unos dinteles conservadores podrían ser: Para T: SMCF <10 = negativo; SMCF >10 y <20 = positivo débil; SMCF >20 = positivo. Para B: SMCF <30 = negativo; SMCF >30 y <40 = positivo débil; SMCF >40 = positivo.

3. Otras pruebas en fase de evaluación

Existen otras pruebas en fase de evaluación aún sin la suficiente evidencia científica para desaconsejar un trasplante o pronosticar su evolución de una forma estadísticamente significativa. Entre ellas se encuentran:

3.1 Anticuerpos anti-MICA

Se han descrito como relacionados con el rechazo del injerto, pero su valor pronóstico pretrasplante no está bien definido. Por inferencia podríamos sospechar su participación en pacientes que han perdido un injerto previo con evidencias de rechazo humoral (p. ej., depósitos de C4d), sin que haya sido posible demostrar anticuerpos anti-HLA. En estos casos es coherente buscar otros anticuerpos que justifiquen el rechazo. En caso de ser positivos se pueden determinar los alelos MICA del donante, e intentar evitar en un nuevo donante los antígenos MICA contra los que existen anticuerpos².

3.2 Crossmatch utilizando precursores endoteliales

Con la misma indicación que los anticuerpos anti-MICA pero específico de donante se encontraría el llamado *crossmatch* con precursores endoteliales enriquecidos a partir de sangre periférica. El resultado sólo sirve para un donante concreto y tiene un coste de reactivo elevado.

3.3 Crossmatch por captación de aloantígenos solubilizados del donante sobre fase sólida

Se puede realizar en soporte de microesferas de Luminex o placas de ELISA.

Existe la posibilidad de utilizar microesferas de poliestireno recubiertas de un monoclonal anti-HLA clase I o clase II que captura los aloantígenos HLA a partir de las membranas solubilizadas de las células de los donantes. Después de incubar las esferas con el suero del receptor pueden identificarse aloanticuerpos mediante una anti-IgG (o anti-IgM) fluorescente y un citómetro tipo Luminex. El valor pronóstico de esta técnica, en el pretrasplante, está en fase de evaluación. Puede ser especialmente útil en el seguimiento de los aloanticuerpos *de novo* en el postrasplante, ya que permite utilizar células del donante almacenadas en un con-

Tabla 3. Clase anti-HLA y tipo de inmunoglobulina por citometría (con anti-IgG)

Subpoblación	IgG anti-HLA I	IgG anti-HLA II	IgM
Anti-CD3+ (T)	Pos.	Neg.	Neg.
Anti-CD19+ (B)	Pos.	Pos.	Neg.

Tabla 4. Interpretación de diferencias entre citotoxicidad y fase sólida

	IgG-anti-HLA	Anti-HLA no citotóxicos (o débiles)	Citotóxicos no anti-HLA Posibles autoanticuerpos IgM
Cribaje Fase sólida PRA	Pos.	Pos.	Neg.
Citotoxicidad	Pos.	Neg.	Pos.

[Continúa en página siguiente>](#)

ANEXO 1. Descripción de las técnicas disponibles para el estudio de aloanticuerpos. (Continuación)

gelador (-70 °C) utilizando un detergente especial sin necesidad de disponer células viables conservadas en nitrógeno líquido. El mismo fundamento se aplica usando como soporte de los anticuerpos monoclonales placas de ELISA.

3.4 Anticuerpos anti-GSTT1

Si bien descritos inicialmente como no patogénicos en el riñón³, se han asociado con depósitos de C4d⁴. Su valor pronóstico pretrasplante no ha sido definido.

3.5 AloElispot

Es una técnica que cuantifica el número de linfocitos T del receptor capaces de reconocer aloantígenos del donante y activarse. Es una medida estimativa de la presencia de células T alorreactivas. Metodológicamente se valora la secreción de una citocina (p. ej., IFN gamma como valoración) después de un cocultivo de células del receptor con células/ antígenos del donante. Después de una incubación de unas 18 h se cuenta el número de células secretoras de la interleucina. Como todas las técnicas de respuesta a células tiene el inconveniente de la reproductividad y la necesidad de incluir controles que validen los resultados, pero constituye uno de los pocos instrumentos disponibles para evaluar la reactividad celular⁵ y su resultado posiblemente esté relacionado con la memoria inmunológica del receptor.

4. Elementos que pueden interferir en las determinaciones

4.1 Citotoxicidad dependiente de complemento PRA y *crossmatch*

Autoanticuerpos linfocitotóxicos. Más frecuentes en pacientes con enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico; artritis reumatoide, cirrosis biliar primaria, etc.). La frecuencia de autoanticuerpos en pacientes sensibilizados en lista de espera es de aproximadamente el 4%.

Tratamiento reciente con suero antilinfocitario. Falsos positivos muy frecuentes o con algunos anticuerpos monoclonales.

4.2 Aloanticuerpos por fase sólida

Tratamientos recientes con inmunoglobulina intravenosa. Inciden sobre el resultado y los controles, debe conocerse para la validación del resultado.

4.3 *Crossmatch* por citometría

Tratamientos con monoclonales humanizados. Por ejemplo anti-CD20: falsos positivos para linfocitos B muy frecuentemente.

Tratamientos recientes con inmunoglobulina intravenosa. Puede incidir sobre el resultado, debe conocerse para la validación de éste.

1. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003;3:1488-500.
2. Amézaga N, Crespo M, López-Cobos M, Millán MA, Viñas O, et al. Relevance of MICA antibodies in acute humoral rejection in renal transplant patients. *Transpl Immunol* 2006;17:39-42.
3. Aguilera I, Wichmann I, Gentil MA, González-Escribano F, Núñez-Roldán A. Alloimmune response against donor glutathione S-transferase T1 antigen in renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2005;46:345-50.
4. Álvarez-Márquez A, Aguilera I, Gentil MA, Caro JL, Bernal G, et al. Donor-specific antibodies against HLA, MICA, and GSTT1 in patients with allograft rejection and C4d deposition in renal biopsies. *Transplantation* 2009;87:94-9.
5. Bestard O, Nickel P, Cruzado JM, Schoenemann C, Boenisch O, et al. Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1419-29.

netics [EFI] o American Society of Histocompatibility and Immunogenetics [ASHI]).

INDICACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LAS DIFERENTES PRUEBAS EN EL TRASPLANTE DE VIVO

El proceso de selección de un donante inmunológicamente compatible con un receptor renal es progresivo. En función de los resultados de las pruebas previas se adoptará el proceso a seguir (figura 1).

Primera fase del estudio pretrasplante

Tipificación HLA del receptor y de los posibles donantes

Deben tipificarse el receptor y el donante por lo menos en HLA-A, B y HLA-DRB1 a nivel antigénico (2 o 3 primeros dígitos). Las técnicas de tipificación HLA por ADN son altamente recomendables por su fiabilidad y reproducibilidad. Para la tipificación HLA-A y HLA-B puede ser aceptable la serología.

Si se han identificado en el receptor anticuerpos anti-HLA-C o HLA-DQ o DP puede resultar conveniente ampliar la tipificación del donante a estos locus (v. *crossmatch* virtual).

La tipificación alélica del donante (cuatro o más dígitos) puede estar indicada en casos especiales en los que existan anticuerpos sólo contra algunos alelos (4 dígitos) de un mismo grupo antigénico (2 dígitos) (p. ej., A2402 positivo, A2403 negativo).

Utilidad de la tipificación HLA

1. Permite conocer la probabilidad de supervivencia del injerto a largo plazo. Supervivencia a 10 años de los injertos HLA idénticos: 73%; supervivencia de injertos no idénticos del 64% (una incompatibilidad) a 53% (seis incompatibilidades)¹.
2. Permite evaluar las probabilidades de que una prueba cruzada resulte negativa, conociendo el porcentaje de PRA-CDC y la especificidad de los anticuerpos del receptor. En pacientes altamente sensibilizados disponer de un hermano HLA idéntico es, en ocasiones, una de las pocas oportunidades de trasplante para estos pacientes.
3. Hace posible el evaluar el llamado *crossmatch* virtual (VCM o virtual *Crossmatch*).
4. Facilita la identificación de aloanticuerpos donante-específicos en el postrasplante utilizando técnicas de fase sólida.
5. Hace posible evitar la repetición de las mismas incompatibilidades de trasplantes previos o futuros.

Aloanticuerpos por citotoxicidad dependiente de complemento frente a panel (PRA-CDC)

La determinación de aloanticuerpos debe realizarse en todos los pacientes susceptibles de ser trasplantados cada 3 meses².

También debe realizarse 15 días después de cada evento sensibilizante (transfusión, pérdida de injerto o después de un embarazo).

Este estudio secuencial permite conocer anticuerpos identificados en el pasado que pueden no ser detectables en el momento del trasplante, pero que pueden haber generado linfocitos memoria, fácilmente reactivables, por lo que habrá que adaptar la inmunosupresión a esta circunstancia.

Mediante la prueba PRA-CDC se obtienen tres tipos de información:

1. Si el receptor tiene o no tiene aloanticuerpos.
2. El porcentaje de reactividad, que permite predecir la probabilidad de una prueba cruzada linfocitaria positiva.
3. Identificar, en algunos casos, contra qué antígenos reaccionan estos aloanticuerpos. Este conocimiento permite pronosticar para los donantes que tienen estos antígenos una muy alta probabilidad de prueba cruzada linfocitaria positiva por citotoxicidad.

Cribado de aloanticuerpos anti-HLA por fase sólida

Debe realizarse: 1) cuando han existido o no pueden descartarse elementos sensibilizantes antiguos no controlados; 2) ante la sospecha de autoanticuerpos y la necesidad de descartarlos en un paciente con PRA-CDC positivo (figura 1).

Indica ausencia o presencia (negativo/positivo) de anticuerpos anti-HLA de tipo IgG contra alelos anti-HLA-I (HLA-A, B, C) y/o anti-HLA-II (DR, DQ, DP) y en algunos *kits* también anti-MICA.

Tiene mayor sensibilidad que PRA por citotoxicidad (CDC)^{3,4}.

Si se usa una anti-IgG como anticuerpo secundario no se detectan anticuerpos de tipo IgM.

Al utilizar antígenos HLA purificados, no identifican anticuerpos no anti-HLA.

Si se detectan anticuerpos anti-HLA no evidenciables por citotoxicidad, pero sí por fase sólida, es muy aconsejable utilizar las técnicas de *crossmatch* de mayor sensibilidad, como las de citometría de flujo o el *crossmatch* virtual (VCM) para definir mejor el riesgo de estos pacientes.

Los autoanticuerpos IgM no contraindican un trasplante, siempre y cuando sea posible descartar que no se trata de anticuerpos anti-HLA de tipo IgM inducidos por una transfusión reciente, que sí pueden afectar a la supervivencia del injerto.

Prueba cruzada linfocitaria virtual (o VCM)

Esta prueba está indicada en pacientes candidatos a retrasplante, en mujeres con embarazos previos y en caso de resultados positivos en el cribado por fase sólida pero negativos por CDC.

Esta técnica permite conocer con precisión y con alta sensibilidad si un receptor posee anticuerpos IgG contra cada uno de los antígenos del sistema HLA.

Se pueden identificar anticuerpos contra moléculas HLA de clase I (A, B, C) y contra moléculas HLA de clase II (DR, DP y DQ). Los reactivos tienen un coste elevado.

Conociendo la tipificación del donante puede realizarse una estimación muy aproximada de los donantes que no reaccionarán con los anticuerpos del receptor. A esta aproximación se la conoce como VCM.

El VCM permite definir, incluso en los pacientes con anticuerpos contra muchos alelos, las llamadas «incompatibilidades aceptables», siendo un valioso instrumento para identificar posibles donantes para receptores altamente sensibilizados.

Dado que el resultado de esta prueba es un valor numérico (semicuantitativo), es importante distinguir lo que es el dintel inferior de sensibilidad de la técnica, del dintel que pronostica un determinado evento clínico. La fijación de estos dinteles está en fase de evaluación, por esta razón si los anticuerpos son detectables también por otras técnicas mejor evaluadas, *crossmatch* por citotoxicidad o citometría, el valor pronóstico de éstas prevalece.

En el caso de que la única positividad sea la del VCM positivo, siendo negativo por otras técnicas, indica una probabilidad del 55% de padecer un episodio de rechazo mediado por anticuerpos en el primer año frente a una probabilidad del 5% en caso de VCM negativo. El 45% de receptores que no sufran un episodio de rechazo tendrán una supervivencia semejante a los de VCM negativo, sólo los que lo sufran verán su supervivencia reducida en un 20% a 5 años⁵.

Anticuerpos Anti-HLA-C⁶, anti-HLA-DQ⁷ y también anti-HLA-DP⁸ han sido relacionados con el rechazo. Si el receptor tiene anticuerpos contra estos antígenos, puede estar indicado conocer los alelos del donante en estos locus, si bien el valor pronóstico pretrasplante de estos anticuerpos no está bien definido.

El VCM tiene un alto valor predictivo negativo sobre el *crossmatch* por citotoxicidad. Su VPP es menor (es decir, detecta anticuerpos no evidenciables por citotoxicidad)⁹.

De lo anterior se deduce que un VCM positivo, aislado, no implica que un trasplante esté necesariamente contraindicado, significa una señal de alarma para realizar una evaluación concienzuda, un seguimiento cuidadoso y un tratamiento inmunosupresor más orientado al control de la producción de aloanticuerpos.

Utilidad e interpretación de la prueba cruzada preliminar

Está indicada en receptores con riesgo de *crossmatch* positivo. La finalidad de este estudio preliminar es evitar costosos

estudios en donantes que corren un alto riesgo de ser rechazados, por motivos inmunológicos, en las pruebas de pretrasplante inmediato (10 días).

Debe incluir las pruebas cruzadas que se utilizarán para el estudio pretrasplante inmediato.

Se consideran receptores con riesgo de prueba cruzada linfocitaria positiva: 1) PRA-CDC o PRA fase sólida positivo; 2) trasplantes, incluso sin aloanticuerpos detectados por PRA-CDC, y 3) mujeres con embarazos previos del candidato a donante (figura 1).

Estudio pretrasplante inmediato (10 días)

Prueba cruzada linfocitaria por CDC entre donante y receptor

Esta prueba debe realizarse antes de cualquier trasplante renal.

Una prueba cruzada por citotoxicidad (CDC) sobre linfocitos T o totales positiva a 22 ± 5 °C tiene un VPP sobre la pérdida del injerto en las primeras 48 h del 80%, por tanto, contraindica el trasplante.

El trasplante puede no estar contraindicado si existen evidencias de que la positividad se debe a autoanticuerpos anti-IgM. Para ello es preciso que: 1) la positividad se negativice después del tratamiento del suero con DTT; 2) no exista evidencia de evento sensibilizante en los últimos 15 días, y 3) la determinación de cribado de aloanticuerpos anti-HLA en fase sólida (Luminex) sea negativa en un suero que haya sido PRA-CDC positivo. Pueden ayudar a confirmar la autorreactividad evidencias de enfermedad autoinmune (LES, AR, CBP, etc.), o la determinación previa o simultánea de un *crossmatch* autólogo positivo por CDC, que se negativice después del tratamiento del suero con DTT.

Debe incluir por lo menos los sueros con porcentaje de PRA-CDC más elevado de los últimos 2 años y los posteriores a elementos sensibilizantes. El suero actual debe estudiarse por duplicado sin diluir ni tratar, y por lo menos a una dilución (estándares EFI).

El hallazgo de un *crossmatch* B positivo T negativo puede estar ocasionado por tres circunstancias: a) presencia de anticuerpos anti-HLA-II; b) presencia de anticuerpos anti-HLA-I de bajo título detectables sólo en linfocitos B debido a que éstos expresan mayor cantidad de HLA-I que los T, y c) presencia de autoanticuerpos específicos de B.

Criterio de temporalidad: *crossmatch* previo positivo-actual negativo. Los criterios de contraindicación descritos se apli-

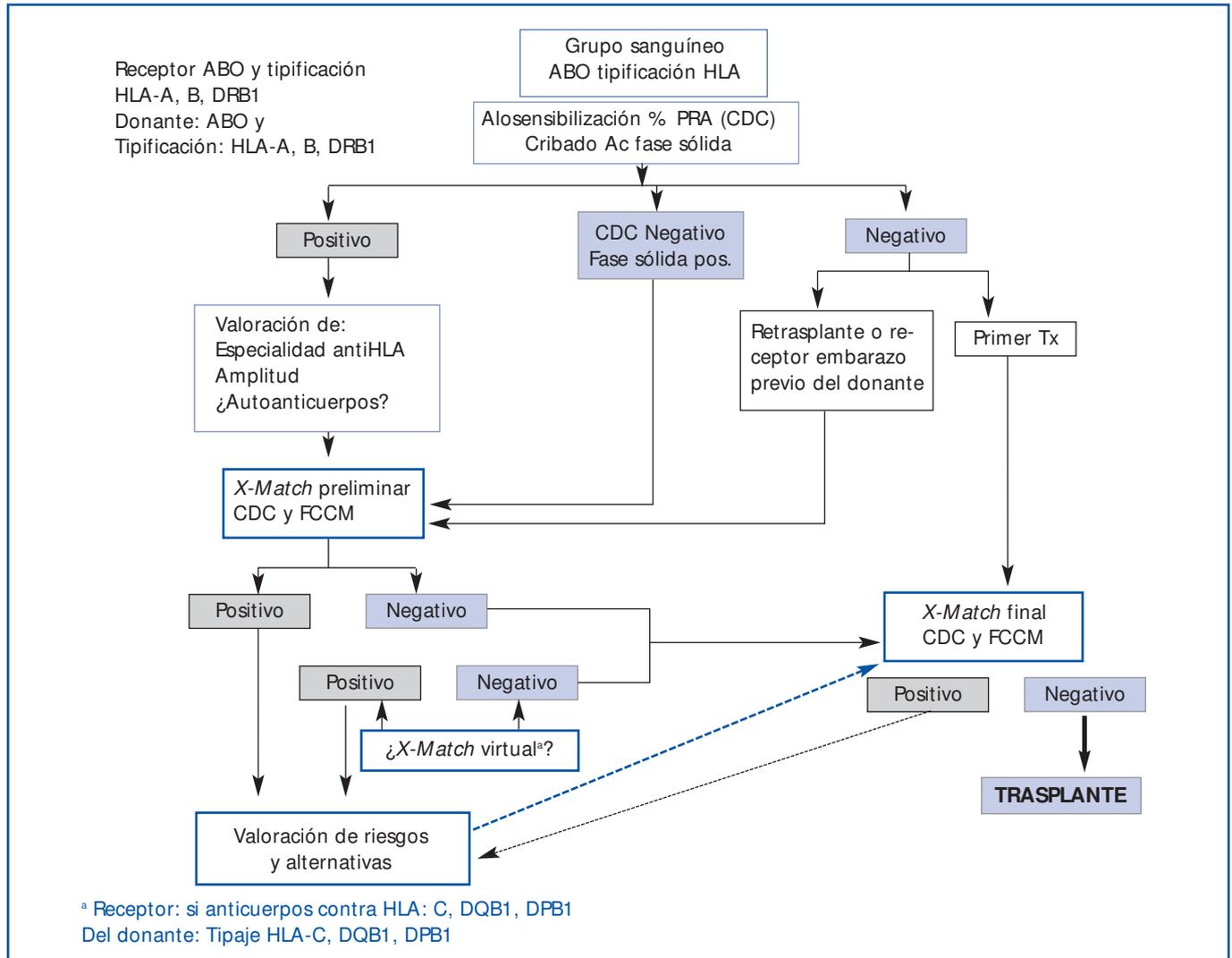


Figura 1. Algoritmo de evaluación inmunológica.

can por regla general al suero del día del trasplante y a los de los últimos 2 años. Para sueros de más de 2 años pretrasplante existen indicios de que los pacientes con PRA >80% corren un riesgo de pérdida adicional del 20% sobre la de los pacientes con sueros históricos negativos¹⁰.

Prueba cruzada linfocitaria por citometría de flujo entre donante y receptor (FCCM)

Esta prueba debe realizarse en pacientes candidatos a retrasplante, en mujeres con embarazos previos y en caso de resultados positivos en el cribado por fase sólida pero negativos por CDC y es recomendable en todo trasplante de donante vivo.

Permite precisar el riesgo de pérdida del injerto al año, especialmente en los retrasplantes.

Permite descartar positividades de la prueba cruzada CDC que no contraindican el trasplante (p. ej., autoanticuerpos IgM).

Proporciona valores semicuantitativos de la cantidad de anticuerpos existentes evaluando el cambio en el canal medio de fluorescencia, y es una forma fácil, completa y precisa de identificar aloanticuerpos contra todos los antígenos HLA-II del donante.

Está muy especialmente indicado si se detectan aloanticuerpos no evidenciados por citotoxicidad pero sí por fase sólida.

Si la prueba cruzada por citotoxicidad (CDC) simultánea es positiva se aplicará el criterio correspondiente a la prueba de citotoxicidad.

Si la prueba cruzada por citotoxicidad (CDC) es negativa y la prueba cruzada por citometría es positiva, la probabilidad de supervivencia del injerto al año es un poco inferior a la de injertos con prueba cruzada negativa por citometría (puede

ser igual en algunos centros)¹¹: a) primer trasplante: 10% inferior, y b) retrasplantes: 30% inferior.

Así pues, la detección de anticuerpos no detectables por fijación de complemento no pronostica un rechazo hiperagudo, pero sí pronostica una menor supervivencia del injerto, especialmente en los retrasplantes.

La valoración un *crossmatch* B positivo T negativo sigue siendo motivo de controversia. La positividad para B por citotoxicidad no se ha considerado históricamente una contraindicación para primeros trasplantes en muchos centros. No debe olvidarse que una parte de los anticuerpos anti-B por citotoxicidad son realmente autoanticuerpos de tipo IgM que no dan reacciones positivas en citometría. Sin embargo, los anticuerpos IgG anti-HLA-II consecuencia de un injerto previo sí se han relacionado con episodios de rechazo y se han considerado un factor de mal pronóstico relativo para el retrasplante¹². Tanto la IgG anti-HLA-DR como los anti-HLA-DQ como los anti-anti-HLA-DP han sido relacionados con el rechazo. Por ello ante un *crossmatch* por citometría positivo para linfocitos B, la decisión de trasplantar debe ser individualizada valorando todas las fuentes de información en su conjunto.

Desensibilización de los receptores

Existen evidencias de que en algunos pacientes es posible reducir los aloanticuerpos circulantes preexistentes hasta niveles que no sean capaces de desencadenar un rechazo hiperagudo. Esto no implica que no existan linfocitos B con capacidad de reiniciar la producción de aloanticuerpos, pero la supervivencia de los injertos realizados en estas condiciones a corto plazo en algunos centros es aceptable.

No entraremos aquí a analizar ni las indicaciones ni las diferentes técnicas de desensibilización que, en cualquier caso, deben ser hechas por un equipo con experiencia. Sin embargo, es importante conocer y valorar los marcadores inmunológicos que la justificarían o indicarían sus posibilidades de éxito y que han sido recientemente revisados¹³. Hay que recordar que no todos los pacientes sensibilizados son candidatos a desensibilización. Es preciso plantearse dos tipos de preguntas:

1. ¿Quiénes son posibles candidatos a desensibilización?
2. ¿En quiénes la desensibilización tiene probabilidades de ser exitosa?

¿Quiénes son posibles candidatos a desensibilización?

Los receptores con *crossmatch* positivo por citotoxicidad (una vez excluidos los autoanticuerpos) son posibles candidatos a desensibilización pretrasplante.

Los candidatos a receptores de un retrasplante con *crossmatch* por citometría positivo-citotoxicidad negativo son posibles candidatos.

En los receptores de un primer trasplante con *crossmatch* por citometría positivo, pero por citotoxicidad negativo, la desensibilización puede no ser necesaria.

En los pacientes que presentan sólo positividad en el VCM, con *crossmatch* negativos por citotoxicidad y citometría, no existen en la actualidad suficientes datos que apoyen la conveniencia de sean sometidos a desensibilización.

En cualquier caso, debe valorarse en su conjunto toda la información disponible por parte de un equipo experimentado: 1) historia de los niveles de sensibilización y de los elementos sensibilizantes; 2) si la positividad afecta a linfocitos T y B o sólo a B; 3) valor del cambio en el canal medio de fluorescencia del *crossmatch* por citometría, y 4) número de positividades y valor del MFI en el VCM.

¿En quiénes la desensibilización tiene probabilidades de ser exitosa?

En primer lugar, es necesario definir qué se considerará una desensibilización exitosa: ¿pretenderemos negativizar el *crossmatch* por citotoxicidad y citometría o sólo por citotoxicidad? Aquí será fundamental considerar la experiencia previa del laboratorio y los niveles de sensibilidad evidenciados para cada técnica en los controles externos de calidad (p. ej., Taller Ibérico de Histocompatibilidad).

En términos generales se utilizan dos parámetros para predecir las probabilidades de éxito de una desensibilización: a) la última dilución del suero que resulta positiva en el *crossmatch* por citotoxicidad, y b) el cambio en el canal medio de fluorescencia del *crossmatch* por citometría.

Con respecto al *crossmatch* por citotoxicidad muchos laboratorios consideran que títulos iguales o superiores a 1/128 tienen escasas o nulas posibilidades de desensibilización; por otra parte, títulos inferiores o iguales a 1/32 son susceptibles de ser desensibilizados, siendo el título 1/64 motivo de controversia.

Con respecto al *crossmatch* por citometría, la bibliografía es escasa, pero podría decirse que cambios en el canal medio de fluorescencia inferiores a 70 tienen probabilidad de éxito en la desensibilización, mientras que por encima de este nivel es poco probable. En ambos casos el nivel de corte depende de la sensibilidad de la técnica en cada laboratorio.

Monitorización inmunológica postrasplante

El deterioro del funcionalismo renal es frecuentemente la primera evidencia de rechazo. Adelantarse a esta evidencia utilizando pruebas inmunológicas es difícil, por varias razones: 1) se precisaría una alta frecuencia de determinaciones para realmente adelantarse a los marcadores de deterioro renal, y 2) si las pruebas no son antígeno-específicas, frecuentemente se modifican también por episodios infecciosos. Sin embargo, las determinaciones de aloanticuerpos son de utilidad en dos circunstancias:

Diagnóstico diferencial del rechazo corticorresistente con componente humoral

Ante un episodio de rechazo agudo, es importante determinar si el episodio tiene o no un componente humoral. Los rechazos con un componente celular son mayoritariamente sensibles a corticoides. La resistencia al tratamiento con corticoides constituye *de facto* la primera sospecha de un componente mediado por aloanticuerpos. Los rechazos con componente humoral requieren tratamientos específicos, tales como recambios plasmáticos e intervenciones sobre los linfocitos productores de inmunoglobulinas.

El diagnóstico de un rechazo humoral se realiza, además de, por el tipo y distribución de las células infiltrantes, por la determinación de anticuerpos circulantes donante específicos DSA (*Donor Specific Antibodies*). La presencia de depósitos de C4d en los capilares peritubulares tiene, al parecer, un valor pronóstico positivo inferior al de los anticuerpos.

Identificar inequívocamente la reactividad de los anticuerpos con el donante es logísticamente complicado, dado que requiere células del donante. Estas células pueden guardarse congeladas en nitrógeno líquido o debe citarse al donante vivo en cada determinación.

La prueba más concluyente de los DSA es el *crossmatch* por citometría de flujo. Las técnicas de citotoxicidad, aunque pueden usarse, son menos sensibles que la citometría. La permanencia *in situ* del injerto secuestra parte de aloanticuerpos reduciendo los circulantes, por ello es recomendable utilizar las técnicas más sensibles disponibles: citometría y/o fase sólida.

La secuencia de pruebas debe equilibrar la información necesaria para tomar decisiones y los recursos disponibles. Ante la sospecha de un rechazo corticorresistente en un:

1. Paciente sin aloanticuerpos previos: *a)* cribado de aloanticuerpos por fase sólida para HLA-I y HLA-II; *b)* si son negativos indica que no hay anticuerpos anti-HLA detectados

y en principio no procede un *crossmatch* donante específico, y *c)* si son positivos debe valorarse si es lógico asumir que los anticuerpos han sido inducidos por el donante, o por el contrario es estrictamente necesario comprobar que son donante específicos por *crossmatch* por citometría (p. ej., si se sospecha que los aloanticuerpos pueden haber sido inducidos por otras fuentes de sensibilización).

2. Pacientes con aloanticuerpos previos por fase sólida: *a)* si se pretende monitorizar su desaparición un cribado de aloanticuerpos por fase sólida para HLA-I y HLA-II puede ser útil; *b)* si se dispone de células del donante puede estar indicado un *crossmatch* donante específico por citometría.

En ambas situaciones, y en caso de que el *crossmatch* no pueda realizarse por falta de células del donante, puede considerarse una determinación por fase sólida con antígeno aislado.

Es conveniente considerar que sólo es posible identificar los aloanticuerpos contra los alelos que tengamos identificados en el donante. Dicho de otra forma, si el donante no ha sido tipificado para HLA-C o HLA-DQ o HLADP y el receptor tiene anticuerpos contra estos alelos el resultado del VCM sólo será concluyente en el caso de ser positivo, pero no será concluyente si es negativo, dado que una parte de las dianas presentes en el injerto no son conocidas.

El reactivo de antígenos aislado tiene un coste considerable y su solicitud indiscriminada puede alterar significativamente el presupuesto económico del programa de trasplantes.

La participación de aloanticuerpos en el rechazo hace recomendable un tratamiento dirigido a reducirlos (recambios plasmáticos, administración de inmunoglobulinas intravenosas, anti-CD20, etc.).

La monitorización del tratamiento puede hacerse valorando el descenso de aloanticuerpos: 1) por cambios en el canal medio de fluorescencia del *crossmatch* por citometría; 2) por disminución del título del *crossmatch* dependiente de complemento si era positivo (p. ej., de 1/128 a 1/32), y 3) valorando el cambio de MFI de los alelos del donante en las pruebas en fase sólida que utilizan antígeno aislado.

Aloanticuerpos como marcador de mal pronóstico

Existen cada vez mayores evidencias de que no sólo la probabilidad de rechazo humoral agudo sino también la fibrosis intersticial y la atrofia glomerular del rechazo crónico son más frecuentes en los receptores que han desarrollado aloanticuerpos *ex novo* postrasplante. Por ello, antes de realizar una

reducción o un cambio significativos en la inmunosupresión, puede estar indicado evaluar la probabilidad de pérdida del injerto. En el cálculo de esta probabilidad la determinación de aloanticuerpos constituye uno de los marcadores más aceptados¹⁴. No debe olvidarse, sin embargo, que se trata de un aumento de riesgo de pérdida del injerto, pero es posible encontrar numerosos pacientes con aloanticuerpos donante específicos sin síntomas clínicos y que probablemente no van a perder su injerto a medio plazo¹⁵.

La presencia de anticuerpos anti-HLA-clase I postrasplante precede, incluso años, al desarrollo de la glomerulopatía¹⁶. La presencia de anticuerpos anticlase II se asocia fuertemente a rechazo crónico en receptores renales de donante vivo, pero parece que el peor pronóstico se asocia con la detección simultánea de anticuerpos anti-HLA-I más anti-HLA-II^{17,18}. Para este cribado, evidentemente, la determinación por fase sólida es la técnica indicada. Una posterior identificación de la reactividad con el donante puede o no ser necesaria según las circunstancias del receptor (historia transfusional, aloanticuerpos previos, etc.).

EPÍLOGO

Los datos de alosensibilización deben evaluarse en su conjunto, considerando también la historia de alosensibilización del receptor. El *crossmatch* por citotoxicidad entre donante y receptor, en el momento del trasplante, pronostica un alto riesgo de rechazo hiperagudo y se considera una contraindicación. El *crossmatch* por citometría indica un aumento de riesgo de pérdida del injerto al año bajo en el primer trasplante (>10%), pero mayor en el retrasplante (>30%). El VCM por fase sólida indica un incremento del riesgo de episodio de rechazo mediado por anticuerpos (del 5 al 55%), pero no contraindica necesariamente el trasplante. Estos riesgos deben ser evaluados en el contexto de la situación general del paciente y en el de los recursos diagnósticos y terapéuticos disponibles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OPTN/SRTR Data as of May 1, 2008. http://www.ustransplant.org/annual_Reports/current/510d_rec-mm_ki.htm
2. EFi. European Federation for Immunogenetics. Standards for histocompatibility testing. <http://www.efiweb.eu/>. Último acceso: mayo de 2010.
3. Eckels DD. Solid phase testing in the HLA laboratory: implications for organ allocation. *Int J Immunogenet* 2008;35:265-74.
4. Bray RA, Gebel HM. Strategies for human leukocyte antigen antibody detection. *Curr Opin Org Transpl* 2009;14:392-7.
5. Amico P, Hönger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, et al. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. *Transplantation* 2009;87(11):1681-8
6. Chapman JR, Taylor C, Ting A, Morris PJ. Hyperacute rejection of a renal allograft in the presence of anti-HLA-Cw5. antibody. *Transplantation* 1986;42(1):91-3
7. Proust B, Kennel A, Ladrière M, Kessler M, Perrier P. Unexpected anti-HLA-DR and -DQ alloantibodies after nephrectomy of an HLA-DR and -DQ identical first renal transplant. *Transpl Immunol* 2009;21:166-8
8. Billen EV, Christiaans MH, Doxiadis II, Voorter CE, Van den Berg-Loonen EM. HLA-DP antibodies before and after renal transplantation. *Tissue Antigens* 2010;75:278-85
9. Morris GP, Phelan DL, Jendrisak MD, Mohanakumar T. Virtual cross-match by identification of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies by solid-phase immunoassay: a 30-month analysis in living donor kidney transplantation. *Hum Immunol* 2010;71:268-73
11. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003;3:1488-500
12. Pollinger HS, Stegall MD, Gloor JM, Moore SB, DeGoeij SR, et al. Kidney transplantation in patients with antibodies against donor HLA class II. *Am J Transplant* 2007;7:857-63
13. Lefell MS, Zachary AA. The role of the histocompatibility laboratory in desensitization for transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14:398-402
14. Gloor J, Cosio F, Lager DJ, Stegall MD. The spectrum of antibody-mediated renal allograft injury: implications for treatment. *Am J Transplant* 2008; 8:1367-73.
15. Sawitzki B, Schlickeiser S, Reinke P, Volk HD. Pretransplant immune risk assessment. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14:650-55
16. Mizutani K, Terasaki P, Rosen A. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant* 2005;5:2265-72.
17. Proust B, Kennel A, Ladrière M, Kessler M, Perrier P. Unexpected anti-HLA-DR and -DQ alloantibodies after nephrectomy of an HLA-DR and -DQ identical first renal transplant. *Transpl Immunol* 2009;21:166-8
18. Terasaki PI, Cai J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation* 2008;86:377-83