

ARTÍCULO ORIGINAL

MONITOREO DE ANTICUERPOS ANTI-HLA EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA EN LISTA DE ESPERA PARA TRASPLANTE RENAL EN PARAGUAY*ANTI-HLA ANTIBODIES MONITORING IN PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE ON WAITING LIST FOR RENAL TRANSPLANT IN PARAGUAY*

Fernanda Prieto, Claudia Cabañas, Verónica Villagra

Departamento de Inmunología, Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP), Asunción, Paraguay

Nefrología, Diálisis y Trasplante 2016; 36 (2) Pág. 75-81

RESUMEN

Introducción: El estudio de anticuerpos anti-HLA en el suero del paciente en lista de espera para trasplante renal es fundamental para optimizar la elección de un donante así como el esquema de inmunosupresión de inducción y mantenimiento acorde al riesgo inmunológico. Estos anticuerpos pueden encontrarse de manera preexistente al trasplante como resultado de exposición del individuo a transfusiones sanguíneas, embarazos y trasplantes previos. El objetivo del estudio fue determinar la incidencia de inmunización frente a antígenos de HLA, los factores asociados y su impacto en pacientes en espera de un trasplante renal. **Material y métodos:** En este estudio, observacional retrospectivo de corte transversal, fueron incluidos 254 pacientes en lista de espera para trasplante renal que acudieron al Laboratorio Central de Salud Pública en el período comprendido entre julio de 2013 y julio de 2015. Resultados: De los 254 pacientes estudiados, 30% presentaron anticuerpos anti-HLA. El evento sensibilizante más significativo fue la exposición a un trasplante previo, presentando anticuerpos anti-HLA el 84% de los candidatos a retrasplante ($p < 0,05$). En segundo lugar se encontraron las mujeres multíparas, presentando

un PRA (Panel Reactivo de Anticuerpos) positivo el 69% de ellas ($p < 0,05$). Por último, el 24% de los pacientes poli-transfundidos presentaron anticuerpos anti HLA ($p < 0,05$). **Conclusiones:** En el trascurso de los dos años de estudio, 51 pacientes fueron trasplantados, de los cuales un solo paciente presentaba anticuerpos anti-HLA antes del trasplante. Esto indica claramente que la inmunización frente a antígenos de HLA representa una barrera para el acceso al trasplante.

PALABRAS CLAVES: antígenos leucocitarios humanos; panel reactivo de anticuerpos (PRA); histocompatibilidad; trasplante; insuficiencia renal crónica

ABSTRACT

Introduction: Anti-HLA antibodies determination in the serum of patients on a waiting list for renal transplant is essential to optimize donor selection as well as for the induction and maintenance immunosuppression scheme, according to immunological risk. These antibodies could be present before transplantation as a result of being exposed to blood transfusions, pregnancies and previous transplants. The ob-

jective of the study was to determine immunization against HLA antigens, associated factors and their impact on the waiting list for a renal transplant. **Methods:** In this observational retrospective cross sectional study, 254 patients on the waiting list for renal transplant were included. These patients attended the Public Health central laboratory between July 2013 and July 2015. Results: 30% of the 254 studied patients presented anti-HLA antibodies. The most significant sensitizing event was the exposure to a previous transplant ($p < 0.05$). Multiparous women were in second place, 69% of them presenting positive PRA (panel reactive antibodies) ($p < 0.05$). Finally 24% of poly transfused patients presented anti-HLA antibodies ($p < 0.05$). **Conclusions:** During the 2 year of the study, 51 patients were transplanted, presenting only one of them anti-HLA antibodies before transplantation. This results clearly indicate that the immunization against HLA represents a barrier for transplantation access.

KEYWORDS: human leucocyte antigens; panel reactive antibody (PRA); histocompatibility; transplant; chronic renal failure

INTRODUCCION

El trasplante de riñón es actualmente el mejor tratamiento para la insuficiencia renal crónica en términos de supervivencia del paciente, calidad de vida y costos, gracias a los avances en las terapias inmunosupresoras y en las técnicas de detección de anticuerpos¹⁻³.

El rechazo mediado por anticuerpos (RMA) es actualmente reconocido como uno de los retos más serios e importantes en el escenario del trasplante renal. Los RMA, sean estos de tipo hiperagudo, agudo o crónico, son ocasionados en su gran mayoría por anticuerpos dirigidos contra antígenos leucocitarios humanos (HLA) del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), antígenos que están presentes en el endotelio vascular de los injertos renales⁴⁻⁶.

Los anticuerpos anti-HLA pueden encontrarse de manera pre-existente al trasplante como resultado de exposición del individuo a eventos tales como transfusiones sanguíneas (o sus derivados), embarazos (o abortos) y trasplantes pre-

vios, y condicionar diversos grados de sensibilización en el paciente⁷⁻¹⁰.

El monitorear periódicamente la presencia de anticuerpos anti-HLA en el suero 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 con dicho monitoreo sirve para conocer el grado de sensibilización de cada paciente en lista de espera, que se expresa como porcentaje de reactividad contra el panel (% PRA)¹¹.

El PRA indica el porcentaje de células provenientes de un panel de donantes, contra las cuáles reacciona el suero de un paciente candidato a ser trasplantado. En pacientes con porcentajes elevados de PRA, las probabilidades de trasplante se ven importantemente reducidas, dado que es menor la probabilidad de encontrar un donante con antígenos HLA para los que el receptor no tenga anticuerpos^{9, 11-12}.

En la actualidad existen numerosas técnicas para la determinación del PRA. En el Laboratorio Central de Salud Pública utilizamos la técnica de ELISA para estudiar los anticuerpos anti-HLA de nuestros pacientes en lista de espera para trasplante.

En base a los resultados obtenidos en nuestra anterior investigación acerca de las "características de los pacientes en lista de espera para un trasplante renal"¹³ hemos decidido profundizar en el estudio de la inmunización frente antígenos de HLA, con el objetivo de estudiar el estado de inmunización de pacientes renales en espera de un trasplante, describir los factores asociados a la inmunización y finalmente, estudiar el efecto que tiene la presencia de estos anticuerpos en la posibilidad de acceso a un trasplante en nuestro país.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional retrospectivo de corte trasversal, que incluyó a 254 pacientes en espera de un trasplante renal que acudieron al Laboratorio Central de Salud Pública para realizarse estudios de histocompatibilidad en el periodo comprendido entre julio de 2013 y julio de 2015.

Los datos demográficos y el historial inmunológico de cada paciente fueron obtenidos en el

momento de la toma de muestra, mediante un formulario que recogía datos personales y globales como: nombre del paciente, número de cédula de identidad, teléfono, fecha y lugar de nacimiento, grupo sanguíneo, causa de falla renal, centro de diálisis y médico referente, antecedentes de transfusiones sanguíneas, embarazos y trasplantes previos. La recolección de las muestras para detección de anticuerpos anti-HLA se realizó antes de que el paciente recibiera heparina y fuera dializado.

La técnica utilizada para la detección de anticuerpos anti-HLA fue la de ELISA. Esta técnica de ELISA (One Lambda Inc., CA, USA) se basa en el principio de presentación de antígenos HLA purificados como destino para la unión del anticuerpo del paciente. Esta unión específica del anticuerpo de la muestra del paciente con cualquiera de los antígenos presentes en la placa de ELISA, se detecta mediante una incubación posterior con un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina; que reconoce sólo la IgG humana. Se obtiene una medida cuantitativa del alcance de la reacción mediante determinación espectrofotométrica tras añadir el sustrato de la enzima adecuada para el desarrollo de color. Las placas son leídas con el detector de ELISA ELX-800 (Bio-Tek Instruments Inc., VT, USA) y las densidades ópticas leídas son analizadas por el software HLA Fusion 3.0 (One Lambda Inc., CA, USA)¹⁴.

El Monitoreo Inmunológico realizado en el LCSP consistió primeramente en testar el suero de todos los pacientes con un kit de Screening de Anticuerpos anti-HLA. Este test (LAT-M10X5 One Lambda Inc., CA, USA) determina la presencia o ausencia de anticuerpos anti-HLA en suero del paciente pudiendo obtenerse un resultado positivo o negativo. Posteriormente, a los pacientes con resultado positivo en el test de Screening, se los estudió con un kit que determina el porcentaje de anticuerpos reactivos contra el panel conocido como PRA (LAT1288 One Lambda Inc., CA, USA). El PRA permite predecir el porcentaje de donantes que pueden dar prueba cruzada positiva al ser enfrentados contra el suero del receptor.

Todos los datos recolectados (sexo, transfusiones recibidas, embarazos, trasplantes previos) y los resultados obtenidos de los ELISA fueron

introducidos en una planilla Excel (Microsoft Office, 2013) y luego analizados utilizando herramientas de estadística descriptiva. Para evaluar la asociación entre las variables y la sensibilización contra antígenos de HLA se utilizaron tablas de contingencia de dos por dos, test de chi cuadrado y razón de momios (odds ratio). La razón de momios se calculó para cada factor de sensibilización aislado o combinado en <http://www.samiuc.es/index.php/estadisticas-con-variables-binarias/medidas-de-comparacion/odds-ratio-or.html>. Para todas las pruebas de hipótesis se fijó un nivel de significación de $p < 0,05$.

Para el análisis de las variables estudiadas en este trabajo (trasfusiones sanguíneas, embarazos y trasplantes previos) se tomaron las siguientes consideraciones: se definió como paciente politransfundido a aquel que ha recibido tres o más transfusiones sanguíneas en su vida, y como mujer múltipara a aquella que haya estado embarazada tres o más veces en su vida, independientemente de si el embarazo llegó a término o no. Se consideró como no sensibilizados a los pacientes que presentaban un valor del PRA inferior a los 20 % y sensibilizados a aquellos con valor de PRA mayor o igual a 20 %^{9, 12, 15}.

El protocolo fue revisado por el comité de ética (que cuenta con Certificación Internacional FWA N° FWAOOO2OO88) de la Institución con Código de Aprobación CEI-LSCP N° 61/190515.

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 254 pacientes con un promedio de edad de 40 años (entre 4 y 74 años), de los cuales 59% correspondieron al género masculino.

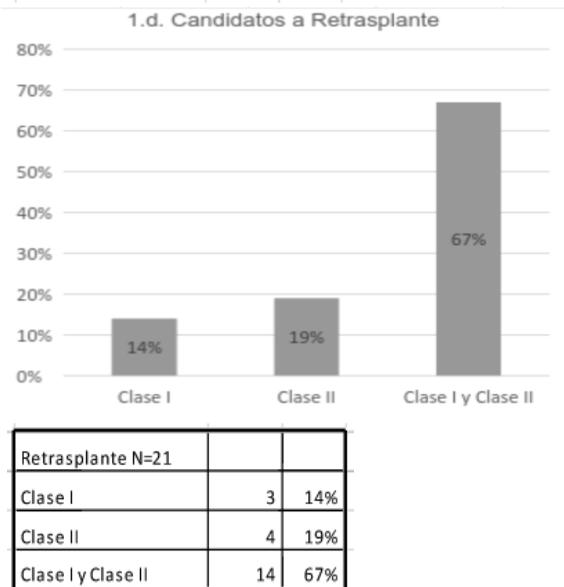
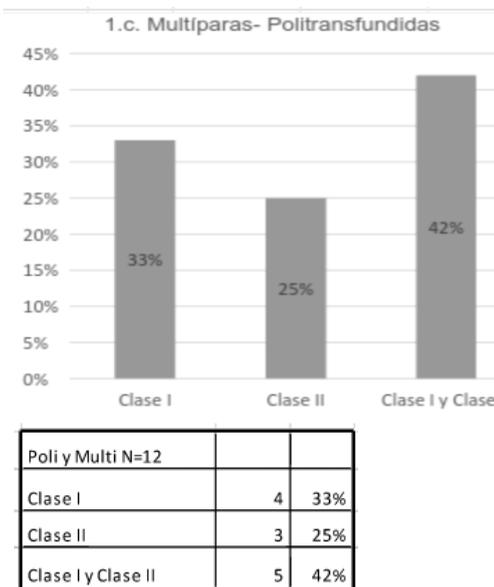
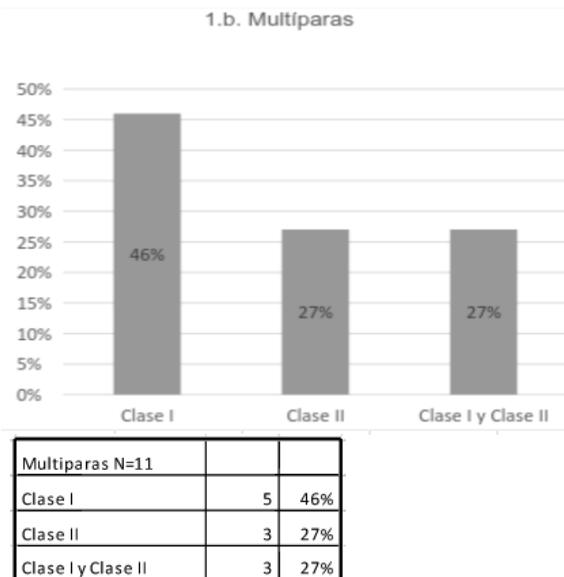
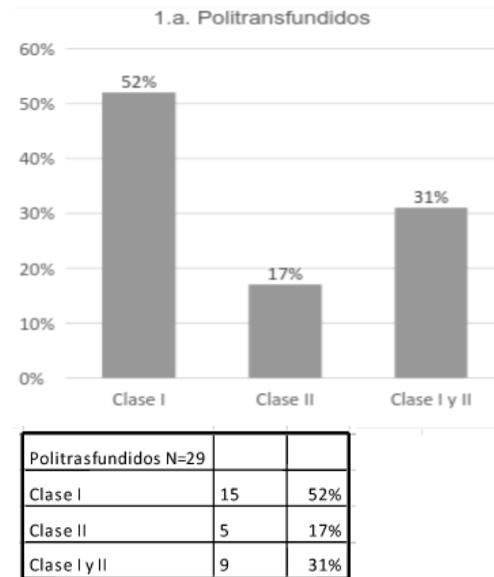
A través de las encuestas realizadas a los pacientes, obtuvimos los siguientes datos: el 63,4% de estos pacientes eran poli-transfundidos, el 33,7% de las pacientes mujeres en la lista eran múltiparas y el 10% de esta lista estaba compuesta por candidatas a un segundo trasplante.

Detectamos anticuerpos anti-HLA en 30% de los pacientes (PRA mayor o igual a 20%) y un tercio de estos (28 pacientes) se encontraban hiperinmunizados (PRA mayor o igual a 80%). En cuanto a las especificidades de los anticuerpos anti-HLA de Clase I, las tres más frecuentes fueron contra antígenos HLA A2, A68 y A69

seguidas por A23 y A24. En el caso de los anticuerpos anti-HLA Clase II las especificidades más frecuentes fueron contra los antígenos HLA DR4, DR7, DR9 y DR53.

Algunos pacientes presentaban solo anticuerpos anti-HLA de Clase I (39%), otros solamente de Clase II (21%) y otros anticuerpos anti-HLA de ambas clases (40%).

predominantes varió según el evento sensibilizante sea transfusiones (**Figura 1.a**), embarazos (**Figura 1.b**), una combinación de transfusiones y embarazos (**Figura 1.c**) o un trasplante previo (**Figura 1.d**). Cabe destacar que aquellos pacientes cuyo evento sensibilizante es un trasplante previo presentan en su mayoría anticuerpos anti-HLA de Clase I y de Clase II.



Por otro lado, si analizamos a los hombres y a las mujeres por separado se puede observar que solo el 16% de los hombres se encuentran inmunizados, mientras que más de la mitad de las mujeres (51%) lo están.

Para estudiar los efectos que tienen las transfusiones, los embarazos y los trasplantes previos sobre la inmunización del paciente frente a an-

tígenos de HLA dividimos a los pacientes en cinco grupos: Grupo Control, Politransfundidos, Multiparas, Multiparas-Politransfundidas y Candidatos a retrasplante. En función a los resultados de los test de Screening de Anticuerpos y de PRA definimos a su vez a los pacientes en inmunizados y no inmunizados (**Tabla 1**).

El evento sensibilizante más significativo

Tabla 1. Pacientes inmunizados y no inmunizados divididos en grupos de acuerdo a los diferentes eventos sensibilizantes

	Pacientes no inmunizados (PRA <20%)	Pacientes inmunizados (PRA ≥ 20%)	Valor de p	Razón de momios	Error relativo de la razón de momios
Control	70	4			
Politransfundidos	92	29	0,023867719	5,5	0,56
multíparas	5	11	1,11697E-07	38,5	0,75
multíparas-Politransfundidas	6	12	1,22012E-07	35	0,72
Candidatos a retrasplante	4	21	1,65988E-12	91,9	0,75

Grupo Control (Paciente no trasplantado, con menos de 3 transfusiones, y con menos de 3 embarazos). Politransfundidos (Paciente no trasplantado, con 3 o más transfusiones, y con menos de 3 embarazos). Multíparas (Paciente no trasplantada, con menos de 3 transfusiones, y con 3 o más embarazos). Multíparas politransfundidas (Paciente no trasplantada, con 3 o más transfusiones, y con 3 o más embarazos). Candidatos a retrasplante (Paciente en espera del segundo o tercer trasplante)

fue la exposición a un trasplante previo, presentando anticuerpos anti-HLA el 84% de los candidatos a retrasplante. En segundo lugar se encuentran las mujeres multíparas, presentando un PRA positivo el 69% de ellas. Por último, solo el 24% de los pacientes poli-transfundidos presentaron anticuerpos anti HLA.

Del total de los 254 pacientes estudiados, 51 pudieron ser trasplantados (20%) y solo uno de este grupo presentaba anticuerpos anti HLA en el suero pre-trasplante (PRA= 37%).

Hubo un total de siete operativos de trasplante rechazados por obtenerse un Crossmatch positivo por la técnica de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En dos de estos pacientes se pudo identificar la especificidad de los anticuerpos siendo estos específicos contra el donante (DSA). En los otros casos no fue posible determinar la especificidad de los anticuerpos ya que el PRA de los pacientes oscilaba entre el 65 y el 96% y no contamos con la tecnología necesaria (Luminex y reactivos con antígenos únicos). El único trasplante realizado a un paciente con PRA positivo, resultó en un Crossmatch negativo y no se demostraron DSA.

DISCUSIÓN

De acuerdo a los estudios realizados en nuestro servicio, 30% de los pacientes en lista de espera para trasplante renal en el Paraguay presentan anticuerpos anti-HLA, y 11% de ellos se encuentran hiperinmunizados. Aunque no contamos con datos regionales, estos datos se corresponden con los de la lista de espera de los Estados Unidos^{2, 7}. Al igual que lo observado en otros estudios¹⁶, nuestra investigación demuestra que los factores que sensibilizan a los pacientes contra estos antígenos son, en primer lugar la exposición a un trasplante, en segundo lugar los embarazos y por último las transfusiones sanguíneas.

Existe una clara diferencia en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-HLA entre hombres y mujeres. Esto podría explicarse en parte por los embarazos a los que se encuentran expuestas las pacientes femeninas. Pero es difícil establecer la verdadera relación entre los embarazos y la sensibilización a antígenos HLA porque la mayoría de las mujeres en nuestra lista han recibido también una o más transfusiones sanguíneas. Es por esta razón que nuestro siguiente estudio se centrará en mujeres multíparas sanas que nunca han reci-

bido transfusiones sanguíneas.

El hecho de que solo el 2% de los pacientes que accedieron a un trasplante renal presentaban anticuerpos anti-HLA, mientras que el 30% de los pacientes en lista de espera están inmunizados, indica claramente que la inmunización frente a estos antígenos es una barrera muy importante para el trasplante en nuestro medio.

Para superar esta dificultad es necesario utilizar todas las estrategias disponibles en la actualidad, para lo cual es indispensable que nuestro país implemente nuevas políticas de asignación de órganos.

Por un lado se debe elegir al receptor teniendo en cuenta el grado de compatibilidad o match de HLA entre este y el donante, para que el trasplante tenga mayores probabilidades de éxito y menor riesgo de rechazo del injerto.

Por otro lado, puesto que la sensibilización frente a antígenos de HLA es una barrera para el trasplante, se debe tener en cuenta el PRA del paciente en la puntuación establecida a los candidatos a trasplante^{15, 17}, para hacer que la distribución de órganos sea lo más equitativa posible.

Además de las estrategias de aproximación biológica (match de HLA), se deben utilizar tácticas farmacológicas en pacientes con anticuerpos donante específicos, como lo son los protocolos de desensibilización con plasmaféresis, inmunoglobulina intravenosa (IvIg), anticuerpos monoclonales (anti-CD20), agentes antitímocíticos, etc.^{3, 7-8, 18}.

Finalmente, si bien es cierto que hemos podido asignar algunas especificidades a los anticuerpos anti-HLA, la técnica de ELISA que utilizamos para la identificación de anticuerpos HLA es limitada y debemos avanzar hacia una técnica más sensible y específica como lo es la tecnología Lumindex¹⁹⁻²².

Conflicto de intereses: Los autores declaran no poseer ningún interés comercial o asociativo que presente un conflicto de intereses con el trabajo presentado.

BIBLIOGRAFÍA

1) Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, et al. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am*

J Transplant. 2011;11(10):2093-109.

2) Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Schnitzler MA, et al. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant.* 2014;14 Suppl 1:11-44.

3) Cicora F, Mos F, Roberti J. Trasplante renal en pacientes con anticuerpos dirigidos contra donante. *Medicina (B. Aires).* 2014; 74(5): 400-3.

4) Puttarajappa C, Shapiro R, Tan HP. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. *J Transplant.* 2012;2012:193724.

5) Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med.* 2013;369(13):1215-26.

6) Galeas RA, Gomezchico-Velasco R, Valverde S, García GR, Velásquez-Jones L, Romero-Navarro B, et al. Anticuerpos anti-HLA y rechazo agudo del injerto renal en los niños. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2010;67(6):492-502.

7) Marfo K, Lu A, Ling M, Akalin E. Desensitization protocols and their outcome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011 Apr;6(4):922-36.

8) Mancilla-Urrea E. El paciente altamente sensibilizado. Alternativas terapéuticas para el trasplante renal. *Rev Invest Clín.* 2005;57(2):206-12.

9) Toledo N, Tiscornia A, Bengochea M, Carrettoá E, Silva E, Cabrera A., et al. Monitoreo de anticuerpos HLA en insuficientes renales crónicos en lista de espera uruguaya para trasplante renal 2005. *Rev Med Uruguay.* 2008;24(1):15-23.

10) Scornik JC, Bromberg JS, Norman DJ, Bhandari M, Gitlin M, Petersen J. An update on the impact of pre-transplant transfusions and allosensitization on time to renal transplant and on allograft survival. *BMC Nephrol.* 2013;14:217.

11) De-Leo-Cervantes C. Pruebas de Histo compatibilidad en el Programa de Trasplantes. *Rev Invest Clín.* 2005; 57(2): 142-6.

12) Brito-García A, Gutiérrez-García F, Trujillo-Álvarez Y, Peña-Fresneda N, Barbería-Torres D, Díaz-Báez N. Anticuerpos anti-HLA en pacientes con insuficiencia renal crónica en espera de trasplante renal. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2012;28(3):275-81.

13) Prieto F, Cabañas C, Villagra V. Características de los pacientes en espera de trasplante renal. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 2015;13(1):49-57.

14) Dmbrasky Osowski L, Gutierrez M, Muth B. HLA Antibody screening and identification by ELISA Methodology. En: Hahn A, Land G, Strothman R ed. American Society for Histocompatibility and Immuno-

genetics Laboratory Manual. 4th ed. Lenexa, KS: ASHI: 2000. Vol. 1, p. I.D.2.1-11.

15) Organ Procurement and Transplantation Network [Internet]. Policy 8: Allocation of Kidneys. En: OPTN Policies, 2016, p. 74-94. Disponible en: <http://optn.transplant.hrsa.gov/ContentDocuments/OPTN_Policies.pdf>

16) Scornik JC, Meier-Kriesche HU. Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implications for prevention. *Am J Transplant.* 2011;11(9):1785-91.

17) Lima BA, Mendes M, Alves H. Hypersensitized candidates to kidney transplantation in Portugal. *Port J Nephrol Hypert.* 2013;27(2):77-81.

18) Jordan SC, Pescovitz MD. Presensitization: the problem and its management. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1(3):421-32.

19) Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, No-

chy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(8):1398-406.

20) Colombo MB, Haworth SE, Poli F, Nocco A, Puglisi G, Innocente A, et al. Luminex technology for anti-HLA antibody screening: evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72(6):465-71.

21) Eng HS, Bennett G, Bardy P, Coghlan P, Russ GR, Coates PT. Clinical significance of anti-HLA antibodies detected by Luminex: enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools. *Hum Immunol.* 2009;70(8):595-9.

22) Worsley CM, Mayne ES, Suchard MS. Luminex-based virtual crossmatching for renal transplantation in South Africa. *S Afr Med J.* 2011;102(1):40-3.

Recibido en su forma original: 21 de marzo de 2016

En su forma corregida: 18 de abril de 2016

Aceptación final: 25 de abril de 2016

Dra. Fernanda Prieto

Departamento de Inmunología, Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP), Asunción, Paraguay

E-mail: histocompatibilidad@lcsp.gov.py