



*Universidad Nacional del Nordeste*  
*Facultad de Ciencias Exactas y*  
*Naturales y Agrimensura*

# *ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE LA PAREJA DONANTE RECEPTOR RENAL POR DIFERENTES METODOLOGÍAS: CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DE COMPLEMENTO Y CITOMETRÍA DE FLUJO*

## Práctica Electiva Bioquímica FaCENA

- Alumna: Estela Rosa Jara
- Directora: Bioq. Silvia Karina Marinic
- Codirectora: Bioq. Jessica Sinchi
- Lugar de trabajo:  
Laboratorio de Genética Molecular e  
Histocompatibilidad del  
Hospital Dr. Julio C.  
Perrando, Resistencia,  
Chaco.
- Año: 2022-2023



FACULTAD DE CIENCIAS  
EXACTAS Y NATURALES  
Y AGRIMENSURA

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	Pág. 2
MARCO CONCEPTUAL	Pág. 3
Sistema antígeno leucocitario humano (HLA)	Pág. 3
Organización génica del sistema HLA	Pág. 4
Estructura de las moléculas HLA de clase I y de clase II	Pág. 4
Expresión de las moléculas HLA de clase I y II en los tejidos	Pág. 6
Función de las moléculas HLA de clase I y II	Pág. 7
Anticuerpos anti HLA de clase I y clase II	Pág. 9
Importancia del sistema HLA en el trasplante renal	Pág. 10
Crossmatch en la pareja donante-receptor	Pág. 13
OBJETIVOS	Pág. 15
MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 16
Técnicas operatorias	Pág. 16
Separación de linfocitos a partir de sangre periférica utilizando Ficoll-Hypaque	Pág. 16
Separación de linfocitos T y B con perlas magnéticas	Pág. 18
Crossmatch por citotoxicidad dependiente del complemento	Pág. 19
Crossmatch por citometría de flujo	Pág. 22
RESULTADOS	Pág. 25
Ensayos de crossmatch donante-receptor	Pág. 25
Análisis retrospectivo	Pág. 27
DISCUSIONES	Pág. 29
Ensayos de crossmatch donante-receptor	Pág. 29
Análisis retrospectivo	Pág. 31
Valor clínico de los resultados del crossmatch	Pág. 32
CONCLUSIONES	Pág. 35
REFERENCIAS	Pág. 37
ANEXO	Pág. 41

## INTRODUCCIÓN

El trasplante de riñón en pacientes con fallo renal irreversible (*e.g.* insuficiencia renal crónica) es reconocido como el mayor avance de la medicina moderna, proporcionando una mayor sobrevida con respecto al tratamiento de diálisis, y mejorando la calidad de la misma. Hace 50 años se consideraba una opción de tratamiento experimental y muy limitada. Hoy, sin embargo, forma parte de la práctica clínica habitual en más de 80 países, y constituye un procedimiento de rutina que transforma vidas en la mayor parte de los mismos (García-García *et.al.*, 2012). Este trasplante fue consolidado gracias a los avances en el conocimiento de los mecanismos que intervienen en el alorreconocimiento y en los elementos efectores de la respuesta inmunitaria, así como de los mecanismos de inmunorregulación. En este contexto, el complejo mayor de histocompatibilidad y la respuesta humoral han adquirido gran relevancia (López-Hoyos *et.al.*, 2021).

En la actualidad, la mayor barrera a superar en la medicina del trasplante lo constituye la incompatibilidad donante – receptor, derivada del grado de disparidad genética entre ambos con respecto a las moléculas de histocompatibilidad. Las secuelas inmunológicas de un trasplante, que resulta incompatible, pueden conducir a una disminución en la supervivencia del injerto en trasplante de órganos sólidos y al desarrollo de enfermedad de injerto contra huésped en trasplante de médula ósea, pudiendo llevar incluso a la muerte del paciente. Además, pueden ocurrir fenómenos de sensibilización mediante la formación de aloanticuerpos que pueden ser lesivos para el órgano implantado y/o un eventual futuro trasplante (Muro *et.al.*, 2008).

Por lo expuesto, 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. Las pruebas cruzadas (Crossmatch) constituyen el estudio inmediato previo al trasplante. Estas pruebas son, la prueba cruzada linfocitaria por citotoxicidad dependiente del complemento (CM-CDC) y la prueba cruzada linfocitaria por citometría de flujo (FCCM) (Ercilla y

Martorell, 2010). En ambos casos, el suero del paciente (receptor) debe enfrentarse con las células del potencial donante, para detectar la presencia de anticuerpos preformados contra los antígenos del donante.

El presente trabajo fue realizado en el contexto de las Prácticas Electivas correspondientes al Plan de Estudio de la carrera de Bioquímica. El objetivo del mismo fue la comparación de las metodologías empleadas en las pruebas cruzadas de la pareja donante receptor en el trasplante renal, por citotoxicidad dependiente del complemento y por citometría de flujo, y sus usos en el manejo clínico del paciente.

## **MARCO CONCEPTUAL**

### **Sistema antígeno leucocitario humano (HLA)**

El reconocimiento de los antígenos, después de transformados y presentados sobre las moléculas de histocompatibilidad constituye uno de los bastiones principales del sistema inmunitario para la defensa del organismo frente a cualquier agresión externa. El sistema de histocompatibilidad, por tanto, juega un papel muy importante en el desarrollo y función del sistema inmunitario, gracias a su capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T y B encargados de la defensa. El sistema más conocido es el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) o sistema antígeno leucocitario humano (HLA) en el hombre. El sistema HLA consta de 4 millones de pares de bases, localizados en la porción distal de la banda 6p21.3, en el brazo corto del cromosoma 6, habiéndose identificado aproximadamente unos 400 genes en el mismo. Las moléculas HLA son altamente polimórficas y se expresan como heterodímeros en la superficie celular. Sus aspectos funcionales están en relación a su capacidad para el procesamiento y la presentación antigénica, interviniendo en el proceso inmunológico de reconocimiento de lo propio y en el desarrollo de una respuesta inmune específica hacia los antígenos no propios. Por tanto, la aloreactividad solamente representa un aspecto de la función de las moléculas HLA, el cual es clínicamente muy relevante en el trasplante (Muro *et. al.*, 2008).

## Organización génica del sistema HLA

El sistema HLA se divide en tres regiones conocidas como clase I, clase II y clase III (Figura 1). La clase I, más cercana al telómero, contiene los loci HLA-A, -B y -C que agrupan genes que codifican la cadena pesada de las moléculas HLA de clase I, conocidos como HLA clásicos (MHCla), para diferenciarlos de los demás genes de clase I, denominados no clásicos (MHC Ib). Entre estos, existen los genes HLA-E, -F, -G, HFE o MIC que codifican moléculas cuyas funciones se han comenzado a conocer. Avanzando hacia el centrómero, se encuentra la región de clase III que originariamente se creía circunscrita a los genes del complemento C4, C2 y Bf, pero actualmente, se sabe que además incluye genes tan importantes como los del factor de necrosis tumoral (TNF), los de la enzima 21-hidroxilasa y los que codifican para tres miembros de la familia de las proteínas de choque térmico (HSP). La región de clase II está situada en una posición más centromérica e incluye los genes HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. (Muro *et. al.*, 2008; Rajalingam *et. al.*, 2015)

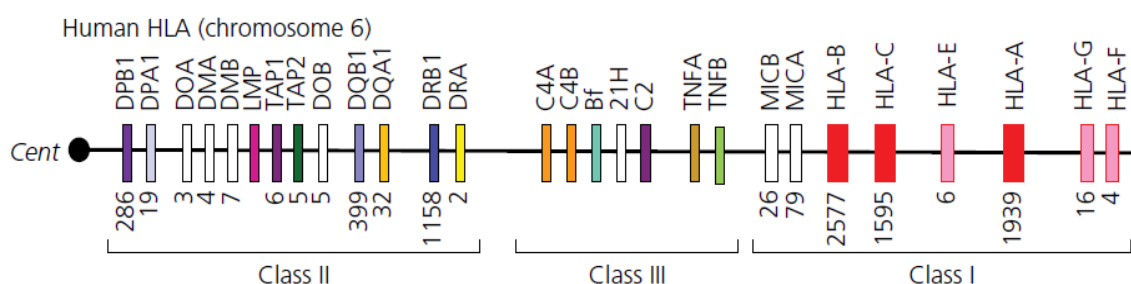


Figura 1: Representación esquemática de las regiones del sistema HLA en el cromosoma 6 humano. El centrómero (círculo negro) y los principales genes HLA se indican en orden. El número de proteínas distintas (alelos) codificadas por cada gen

HLA se indica debajo de cada locus. Fuente: Rajalingam *et. al.*, 2015.

## Estructura de las moléculas HLA de clase I y de clase II

La molécula HLA de clase I, como se observa en la figura 2, es un heterodímero de membrana que está constituido por una cadena pesada,  $\alpha$ , la cual se une de manera no covalente a una cadena ligera denominada  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m). La cadena pesada  $\alpha$  es una glicoproteína de membrana codificada por un gen HLA-A, -B o -C. Su región extracelular posee unos 300 aminoácidos (aa), la porción hidrofóbica transmembrana 25 aa, que es muy parecida a la de otras proteínas expresadas en

membrana, y la región citoplásmica unos 30 aa. Los tres dominios extracelulares se extienden desde la región  $\alpha 3$ , adyacente a la membrana, a las regiones más distales  $\alpha 2$  y  $\alpha 1$ . La mayor cantidad de polimorfismo en la secuencia de estas moléculas se localiza en unas regiones hipervariables dentro de los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . El dominio  $\alpha 3$  tiene un plegamiento del tipo de dominio de las inmunoglobulinas (Igs), es menos polimórfico que los anteriores, y en su estructura se encuentra el sitio de unión a la molécula CD8 del linfocito T. La  $\beta 2m$  es una proteína no polimórfica de 100 aa que presenta una estructura de dominio de Igs y se codifica fuera del complejo HLA, en un gen ubicado en el cromosoma 15. Esta molécula no posee una región transmembrana, se une no covalentemente al dominio  $\alpha 3$  de la cadena pesada. Su principal función es la de estabilizar todo el conjunto para que las moléculas de clase I adquieran la estructura terciaria adecuada. (Muro *et. al.*, 2008; Cruz-Tapias *et. al.*, 2013; Molina *et. al.*, 2018).

La molécula HLA de clase II está compuesta por dos cadenas de glicoproteínas transmembrana,  $\alpha$  (codificada por DRA, DQA1 o DPA1) y  $\beta$  (codificada por DRB, DQB1 o DPB1) (Figura 2). Cada una de ellas consta de una región citoplásmica de 12 a 15 aa, una transmembrana de 20 a 25 aa, y una extracitoplasmática formada por dos dominios de unos 90-100 aa. Los dominios próximos a la membrana de cada cadena,  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ , poseen una estructura del tipo de la superfamilia de las inmunoglobulinas, mientras que los dominios distales,  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ , forman la estructura de unión al péptido. La estructura tridimensional de las moléculas HLA de clase II es similar a la estructura de las moléculas de clase I. Las posiciones más polimórficas de las moléculas se encuentran en las regiones terminales de los dominios extracelulares. (Muro *et. al.*, 2008; Cruz-Tapias *et. al.*, 2013; Molina *et. al.*, 2018).

La principal diferencia entre estas moléculas es que los extremos del surco de unión de péptidos están más abiertos en las moléculas HLA de clase II que en las moléculas de HLA de clase I. Como resultado, el HLA de clase I puede acomodar solo péptidos cortos (9 aa de largo aproximadamente) y los extremos del péptido están sustancialmente enterrados dentro de la molécula de clase I. Por el contrario, el surco de clase II tiene extremos abiertos y puede alojar péptidos

más largos (12 a 20 aa). Además, los péptidos que ligan las moléculas HLA de clase II son principalmente de origen exógeno, mientras que, los de la clase I son de origen endógeno (Cruz-Tapias *et. al.*, 2013; Rajalingam *et. al.*, 2015).

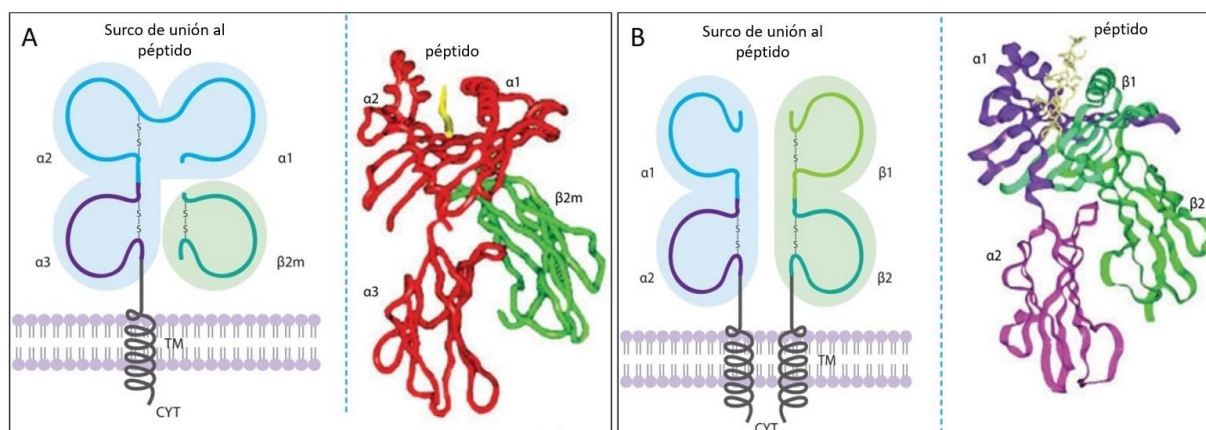


Figura 2: (A). Estructura de la molécula HLA de clase I. (B). Estructura de la molécula HLA de clase II. Abreviaciones: TM: Transmembrana; CYT: Citosólico. Fuente: Cruz-Tapias *et. al.*, 2013.

### Expresión de las moléculas HLA de clase I y II en los tejidos

Las moléculas HLA de clase I se expresan en la mayoría de las células somáticas en el hombre y, presentan niveles variables de tejido a tejido. La expresión de estas moléculas es influenciada por muchos factores, como citoquinas y linfoquinas. En comparación con las moléculas de clase I, el rango de tejidos que expresan moléculas HLA de clase II es más limitado. Constitutivamente, están presentes en la superficie celular de linfocitos B, monocitos, macrófagos y células dendríticas, conocidas como células presentadoras de antígeno (CPA). Además, las moléculas HLA de clase II se encuentran también en determinados endotelios vasculares, ciertos epitelios ductales (senos, tracto gastrointestinal) y glomérulo del riñón. Como en las moléculas HLA de clase I, también se han observado diferencias cuantitativas de expresión para las distintas moléculas HLA de clase II. Por ejemplo, las moléculas HLA-DR están presentes en mayor cantidad que HLA-DQ y -DP (Muro *et. al.*, 2008; Rajalingam *et. al.*, 2015).

La expresión de dichas moléculas puede verse alterada en situaciones de rechazo o tolerancia del trasplante. Por ejemplo, las células endoteliales de los órganos trasplantados pueden alcanzar expresión palpable de HLA de clase II en situaciones de rechazo inmunológico.

## **Función de las moléculas HLA de clase I y II**

La función normal de estas moléculas consiste en presentar antígenos a las células del sistema inmune y son esenciales para la respuesta inmune adaptativa mediada por células T. Los aloantígenos son procesados por las CPA del sistema inmune y presentados como péptidos unidos a sus moléculas HLA de clase I o de clase II en la superficie celular, estos serán reconocidos por el receptor de células T (TCR) durante la presentación antigénica (Cruz-Tapias *et. al.*, 2013).

Cuando el TCR reconoce los péptidos asociados con las moléculas HLA en una CPA, varias proteínas de superficie de las células T y moléculas de señalización intracelular se movilizan rápidamente al sitio de contacto, entre ellas los correceptores CD4 o CD8, moléculas coestimuladoras como B7, y otras accesorias como ICAM que son importantes para fortalecer la interacción entre las dos células (Cruz-Tapias *et. al.*, 2013).

En el desarrollo de esta respuesta las poblaciones de linfocitos T son específicas tanto para el antígeno como para las diferentes clases de HLA. Esta especificidad otorga la base para agrupar a los linfocitos T en dos subpoblaciones, los CD8+ que reconocen antígenos presentados con las moléculas HLA de clase I, y los CD4+ que reconocen antígenos presentados con moléculas HLA de clase II (de-Leo-Cervantes, 2005). Las CD8+ tienen una función citotóxica que les permite atacar directamente células infectadas con virus y/o células cancerosas mientras que, las CD4+ tienen una gama más amplia de funciones efectoras mediante la producción específica de citocinas. Estas últimas se conocen como células T colaboradoras (T Helper) y se han distinguido varios tipos, entre ellas las TH1, TH2 y TH17 (Cruz-Tapias *et. al.*, 2013).

La presentación antigénica mediante estas moléculas HLA puede darse principalmente por dos vías (Figura 3).

En la vía endógena, los antígenos extraños presentados por las moléculas HLA de clase I generalmente derivan de infecciones intracelulares, proteínas sintetizadas en el citosol que resultan defectuosas o aquellas maduras que ya deben ser eliminadas. El ensamblaje de las moléculas HLA de clase I con los péptidos antigénicos requiere la coordinación de múltiples procesos para crear primero

los péptidos los cuales son ubiquitinizados para ser degradados por un proteosoma, luego transportarlos y cargarlos en la hendidura de las moléculas HLA de clase I en el retículo endoplásmico (RE). Intervienen aquí los transportadores asociados a la presentación de antígenos (TAP), una glicoproteína asociada a TAP llamada Tapasina, que facilita el ensamblado del péptido en el RE y moléculas chaperonas. Cuando se ensambla de manera estable, el complejo HLA clase I-péptido se transporta a la superficie celular a través del aparato de Golgi para ser reconocidos por el TCR específico en la célula T CD8+ (Figura 3A) (Cruz-Tapias *et. al.*, 2013).

En la vía exógena, los antígenos extraños presentados por las moléculas HLA de clase II generalmente derivan de patógenos extracelulares, las CPA los reconocen e internalizan, mediante receptores especializados, formando fagolisosomas donde los mismos son degradados para dar los péptidos que se asocian a las moléculas HLA de clase II. Las cadenas HLA clase II  $\alpha$  y  $\beta$  se ensamblan en el RE con una proteína no polimórfica llamada cadena invariante (Ii), la cual estabiliza la estructura de la molécula HLA de clase II mientras previene la unión a otros péptidos dentro del RE, luego es degradada dejando solo un remanente llamado péptido invariante asociado a clase II (CLIP), el cual luego es reemplazado por el péptido derivado del material endocitado. Intervienen aquí enzimas proteolíticas como las catepsinas, molécula HLA-DM que elimina el CLIP y HLA-DO que modula la acción de HLA-DM. Los complejos HLA II-péptido se expresan en la membrana plasmática, donde pueden ser reconocidos por las células T CD4+ (Figura 3B) (Cruz-Tapias *et. al.*, 2013).

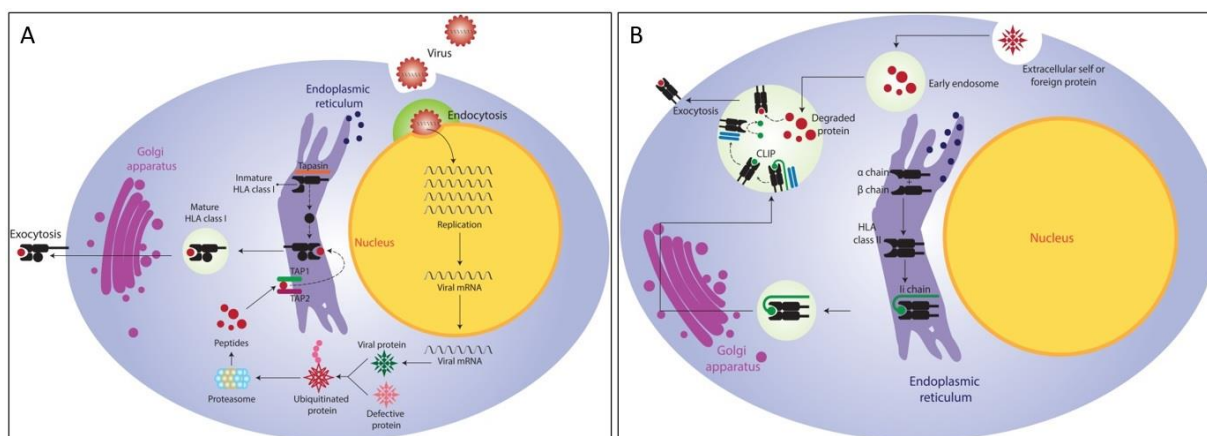


Figura 3: Vías de presentación antigénica. A) Vía Biosintética o Endógena B) Vía Endocítica o Exógena. Fuente: Cruz-Tapias *et. al.*, 2013

Asimismo, las CPA pueden presentar antígenos exógenos también a los linfocitos T CD8+ mediante una presentación cruzada, existen vías intracelulares que describen esta presentación de antígenos fagocitados, como ser la vía citosólica y la vía vacuolar (Cruz-Tapias *et. al.*, 2013).

### **Anticuerpos anti HLA de clase I y clase II**

El receptor potencial de un alotrasplante puede presentar anticuerpos contra las células del mismo. La producción de estos frente a moléculas HLA requiere de un estímulo antigénico previo. Este estímulo se produce cuando el sistema inmune de un individuo entra en contacto con células procedentes de otro individuo cuyas moléculas HLA son diferentes. Esta aloinmunización anti-HLA se puede producir durante el embarazo, por transfusiones sanguíneas, o debido a trasplantes previos (Muro *et.al.*, 2008; López *et. al.*, 2015; Akgul *et. al.*, 2017; Pandey *et. al.*, 2022)

En general, los anticuerpos producidos en mujeres embarazadas son el resultado de una respuesta inmune completamente desarrollada y dirigida frente a un número limitado de antígenos extraños (antígenos fetales heredados del padre) por lo tanto son de alta afinidad y de especificidad limitada, que pueden persistir durante un largo período de tiempo (Muro *et.al.*, 2008).

En pacientes transfundidos, la dosis de antígeno recibida en una única transfusión es relativamente pequeña, pero si el tratamiento se repite periódicamente las dosis antigénicas pueden ser adecuadas para desencadenar una respuesta inmune con anticuerpos de naturaleza policlonal, los cuales podrían tener una duración limitada en el tiempo (Muro *et.al.*, 2008).

En los pacientes trasplantados, el órgano extraño presenta una multitud de antígenos diferentes lo cual desencadena una amplia producción de anticuerpos por parte del sistema inmune, en relación a los anticuerpos anti HLA se desarrollan los de clase I y II, y estos pueden persistir un gran período de tiempo. (Muro *et.al.*, 2008; López *et. al.*, 2015; Akgul *et. al.*, 2017; Pandey *et. al.*, 2022).

Los anticuerpos anti HLA de clase I y clase II son los que clínicamente adquieren mayor relevancia en la sobrevida de un injerto, siendo capaces de provocar un rechazo y en ocasiones la pérdida del órgano.

### **Importancia del sistema HLA en el trasplante renal**

El polimorfismo característico del sistema HLA conduce a diferentes especificidades de unión de péptidos y podría contribuir a variaciones en la respuesta inmunitaria entre individuos, jugando un papel importante en los trasplantes de órganos y la susceptibilidad a ciertas enfermedades. El riesgo de rechazo de aloinjertos puede estar mediado por causas multifactoriales, incluidas inmunológicas y no inmunológicas. Entre las primeras están, la incompatibilidad HLA, la subóptima inmunosupresión, anticuerpos citotóxicos elevados y el retrasplante. Debido a su implicancia en los rechazos, los antígenos HLA se conocen clásicamente como antígenos de trasplante (Muro *et.al.*, 2008).

Los rechazos de aloinjertos ocurren cuando la respuesta inmunitaria del receptor contra el tejido extraño se induce por los antígenos presentes en el injerto (aloantígenos) que están ausentes en el receptor. Esta activación es tanto más intensa cuanto mayor es la incompatibilidad de la pareja donante/receptor (López-Hoyos *et. al.*, 2021). Los aloantígenos más relevantes son las moléculas HLA de clase I y II, el receptor los reconoce como no propias causando una activación de las células linfocitarias que desarrollarán una respuesta inmune coordinada, entre la adaptativa y la innata, contra el injerto.

El alorreconocimiento puede producirse mediante 3 vías, directa, indirecta y semidirecta (Figura 4) (Siu *et. al.*, 2018; Etxebarria *et. al.*, 2022):

- Alorreconocimiento directo: Los macrófagos y células dendríticas del donante pueden salir desde el riñón implantado para dirigirse a los órganos linfoides secundarios del receptor y activar las células T. Ocurre mediante el reconocimiento de las moléculas HLA de las CPA del donante por parte de los linfocitos T del receptor. Se considera que esta vía es de corta duración debido a la corta vida útil de las CPA del donante, produce una alorespuesta más

potente que la activación convencional de células T y se considera que es la vía predominante en el proceso de rechazo celular agudo (Figura 4a).

- Alorreconocimiento indirecto: Las CPA del receptor captan y procesan las moléculas HLA del donante para luego presentarlos a los linfocitos T a través de sus propias moléculas HLA. Esta vía se considera duradera y predominante en el rechazo crónico. Las células TCD4+ activadas por esta vía pueden activar a las células B alorreactivas (Figura 4b).
- Alorreconocimiento semidirecto: Las células T reconocen a las moléculas HLA intactas del donante, similar al reconocimiento directo, pero presentadas por sus propias CPA que han adquirido estas moléculas del donante a través de varias vías, como contactos célula-célula o exosomas (Figura 4c).

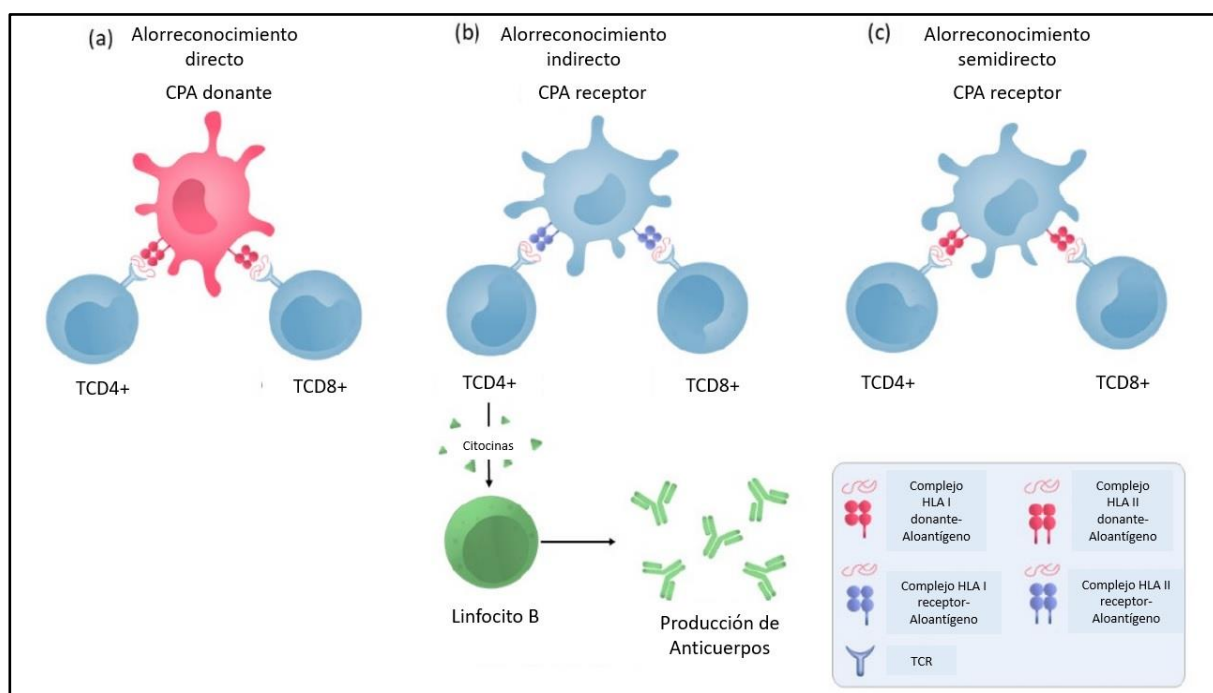


Figura 4: Vías de alorreconocimiento. a) vía directa; b) vía indirecta; c) vía semidirecta. Fuente: Etxebarria *et. al.*, 2022.

Asimismo, los rechazos de aloinjertos pueden clasificarse clínicamente en hiperagudos, agudos o crónicos (Ruchi y Saed, 2023). Las diferencias en la duración de las alorrespuestas de las células T probablemente influyen en su capacidad para mediar en cada rechazo.

**Rechazo hiperagudo:** Se presenta generalmente en las primeras horas después del trasplante. Está relacionado con anticuerpos circulantes preexistentes en la sangre del receptor, debido a una sensibilización previa, contra el antígeno del donante, generalmente del grupo sanguíneo ABO o antígenos HLA. Estos anticuerpos atacan y destruyen el órgano trasplantado tan pronto como se revasculariza el aloinjerto o unas pocas horas después, desencadenan una trombosis intravascular rápida con necrosis de la pared vascular, siendo necesario la trasplantectomía urgente. Actualmente, este rechazo no se presenta, debido a la realización de las pruebas cruzadas realizadas antes del trasplante.

**Rechazo agudo:** Ocurre en los primeros días, generalmente dentro de las tres semanas posteriores al trasplante. Se produce una lesión vascular y parenquimatosa pudiendo ser mediada por anticuerpos (rechazo agudo humoral) o por células T (rechazo agudo celular). El primero está relacionado con un alorreconocimiento que conduce al daño del aloinjerto a través de la activación del complemento, así como otros mecanismos que reclutan células asesinas naturales (NK), polimorfonucleares, plaquetas y macrófagos. Generalmente demuestra evidencia de aloanticuerpos circulantes específicos contra el donante y de lesiones renales mediadas por anticuerpos, como inflamación de glomérulos (glomerulitis) o capilares peritubulares (capilaritis peritubular). Mientras que, el rechazo agudo celular se produce cuando los linfocitos del receptor se activan mediante alorreconocimiento, lo que conduce a la activación e infiltración de las células T de los túbulos, el intersticio y, en ocasiones, la íntima arterial dañando el riñón trasplantado. Este rechazo tiene una alta respuesta al tratamiento, siendo de mucho peor pronóstico el rechazo agudo humoral.

**Rechazo crónico:** Suele desarrollarse luego de más de tres meses después del trasplante. Está relacionado con factores tanto inmunes como no inmunes. El principal factor de riesgo es el incumplimiento de la medicación inmunosupresora. Puede ser mediado por anticuerpos o mediado por células T, el primero es el más común y se relaciona principalmente con la presencia de anticuerpos anti-HLA específicos del donante (DSA), mientras que el segundo es poco común. Se caracteriza por

presentar fibrosis, arteriosclerosis acelerada y alteraciones vasculares con pérdida de la función del injerto después de un período prolongado.

Si se realiza un trasplante en un paciente que presenta anticuerpos anti-HLA preformados contra el donante traería como consecuencia un rechazo del injerto, asimismo, se ha observado una correlación beneficiosa entre una mejor compatibilidad HLA con la supervivencia a largo plazo del injerto. La identificación correcta de la especificidad de anticuerpos presentes en el suero del receptor y la realización de la prueba cruzada pretrasplante entre la pareja donante-receptor es clave (Muro *et.al.*, 2008).

### **Crossmatch en la pareja donante-receptor**

Antes de proceder a realizar un trasplante renal debe valorarse la compatibilidad antigénica entre el receptor y el donante, con la finalidad de optimizar la supervivencia del injerto y minimizar las posibles reacciones inmunológicas contra el órgano implantado. (de-Leo-Cervantes, 2005).

Para ello, existen diversas determinaciones inmunológicas que se realizan pretrasplante como ser, tipificación HLA del receptor y probable donante, determinación de anticuerpos anti HLA por fase sólida en el receptor (ELISA, citometría, luminex) y pruebas cruzadas entre donante-receptor por citotoxicidad dependiente del complemento y/o por citometría de flujo. El resultado de estas determinaciones permite no sólo evitar los trasplantes de alto riesgo sino también ofrecer el tipo de tratamiento inmunosupresor adecuado a cada nivel de riesgo (Ercilla y Martorell, 2010).

La CM-CDC está basada en la técnica de citotoxicidad dependiente del complemento, donde se 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 (Ercilla y Martorell, 2010). De esta manera es posible determinar la presencia de anticuerpos en el suero del receptor, contra las moléculas HLA del donante, dado que estos se unen y, con el posterior agregado del complemento, se produce la lesión celular permitiendo que el colorante penetre en el interior, visualizando las células vivas de un color y las no viables de otro (Dyers y Middleton, 1993; Zachary *et.al.*, 1995).

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 de clase I de los de clase II (Ercilla y Martorell, 2010). Además, se puede realizar un tratamiento con Ditiotreitól (DTT), que destruye las IgM, para diferenciar los anticuerpos linfocitotóxicos de tipo IgM, generalmente autoanticuerpos, de los de tipo IgG (Rose *et.al.*, 1992; Zachary *et.al.*, 1995).

En la FCCM la unión de los anticuerpos del suero del receptor a los antígenos de membrana de los linfocitos del donante se identifica con una antiinmunoglobulina 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, se utilizan anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo distinto al de la anti-IgG. Habitualmente se utiliza anti-CD3 para identificar los linfocitos T y anti-CD19 o anti-CD20 para los linfocitos B (Ercilla y Martorell, 2010).

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Comparar las metodologías empleadas en el estudio de anticuerpos anti HLA en la pareja donante receptor e Interpretar el valor clínico de cada una de ellas en el trasplante renal.

### Objetivos específicos

- Adquirir manejo en las técnicas utilizadas para separación de linfocitos a partir de sangre periférica utilizando gradiente de Ficoll Hypaque.
- Realizar prueba cruzada donante receptor por citotoxicidad mediada por complemento.
- Adquirir experiencia en el uso de microscopía de fluorescencia invertida.
- Realizar la prueba cruzada donante receptor por Citometría de Flujo.
- Adquirir conocimientos acerca del uso de la Citometría de Flujo.
- Evaluar la diferencia de sensibilidad entre las dos técnicas empleadas en las pruebas cruzadas linfocitarias donante receptor.
- Identificar las limitaciones y fortalezas de cada técnica analizada, para su uso en el manejo clínico del paciente
- Adquirir conocimientos teóricos acerca de las metodologías aplicadas en las pruebas cruzadas de histocompatibilidad en el trasplante de órganos sólidos.
- Conocer aspectos no tradicionales del perfil profesional que presentan una importante demanda: área de Histocompatibilidad- Trasplante renal.
- Brindar a la alumna que está finalizando el Ciclo de Formación Profesional, un espacio curricular que le permita profundizar su capacitación en el campo disciplinar bioquímico del análisis clínico y la investigación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante la presente práctica se realizaron ensayos de pruebas cruzadas linfocitarias entre donante vivo-receptor de la provincia del Chaco. Se efectuaron mediante dos técnicas, por citotoxicidad dependiente del complemento y por citometría de flujo. Ambas aprobadas mediante resolución por el Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante (INCUCAI) como metodologías de Crossmatch a utilizar durante los operativos de distribución renal (RES 63/2018). Se trabajó con sueros del paciente puros y diluidos (al  $\frac{1}{3}$  en el CM-CDC y al 1/50 en FCCM).

En primera instancia, se realizó la separación de linfocitos mediante técnica de centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll Hypaque (figura 5). Posteriormente, se separaron las poblaciones linfocitarias (T y B) mediante el empleo de perlas inmunomagnéticas (figura 6). Seguidamente, se llevó a cabo los ensayos de Crossmatch, mediante citotoxicidad dependiente del complemento, empleando Fluoroquench (FQ) y Diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) como colorantes (Figura 7) (Rose *et.al.*, 1992; Dyers y Middleton, 1993; Zachary *et.al.*, 1995) y, por citometría de flujo, previo empleo de solución de pronasa (Figuras 9 y 8 respectivamente) (Lazda, 1994; Scornik *et.al.*, 1994; Scornik, 1995; Talbot *et.al.*, 1995; Thompson, 1995).

Además, se llevó a cabo un análisis retrospectivo de los resultados obtenidos mediante ambas técnicas en las pruebas cruzadas realizadas durante el período comprendido entre enero de 2018 y noviembre de 2022 en el Laboratorio de GENÉTICA MOLECULAR E HISTOCOMPATIBILIDAD del Hospital Dr. Julio C. Perrando, Resistencia, Chaco. Se analizaron un total de 106 resultados, de los cuales, 30 correspondieron a pruebas cruzadas realizadas con donante vivo, mientras que 76 fueron llevadas a cabo en operativos con donantes cadavéricos.

### Técnicas operatorias

#### 1- SEPARACIÓN DE LINFOCITOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA UTILIZANDO FICOLL-HYPAQUE:

Muestra:

- ❖ Sangre entera anticoagulada con heparina

Equipamiento:

- ❖ Pipetas pasteur
- ❖ Micropipetas automáticas
- ❖ Tubos Falcón 15 ml
- ❖ Centrífuga
- ❖ Placa de Terasaki
- ❖ Microscopio de fluorescencia de luz invertida

Reactivos:

- ❖ Buffer fosfato salino (PBS 1x)
- ❖ Buffer fosfato salino - Suero fetal bovino (PBS 1x SFB) (10%)
- ❖ Ficoll-Hypaque

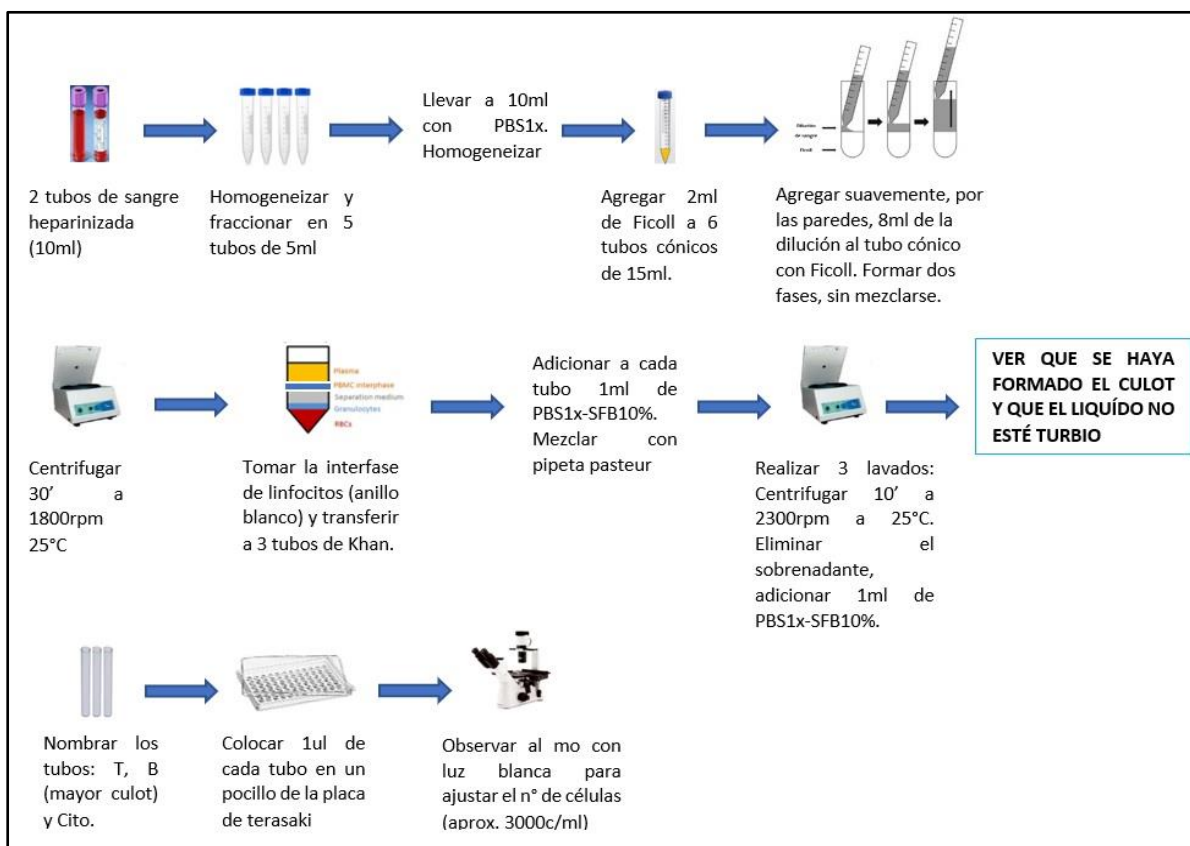


Figura 5: Secuencia de pasos para la separación de linfocitos a partir de sangre periférica utilizando Ficoll-Hypaque. Fuente: Elaboración

propia.

## 2- SEPARACIÓN DE LINFOCITOS T Y B CON PERLAS MAGNÉTICAS:

Muestra:

- ❖ Suspensión de linfocitos del potencial donante obtenidos mediante técnica 1

Equipamiento:

- ❖ Pipetas pasteur
- ❖ Micropipetas automáticas
- ❖ Tubos de Kahn
- ❖ Rotador orbital
- ❖ Magneto
- ❖ Placa de Terasaki
- ❖ Microscopio de fluorescencia de luz invertida

Reactivos:

- ❖ Buffer fosfato salino (PBS 1x)
- ❖ Buffer fosfato salino - Suero fetal bovino (PBS 1x SFB) (10% y 20%)
- ❖ Dynabeads anti CD3
- ❖ Dynabeads anti CD19.

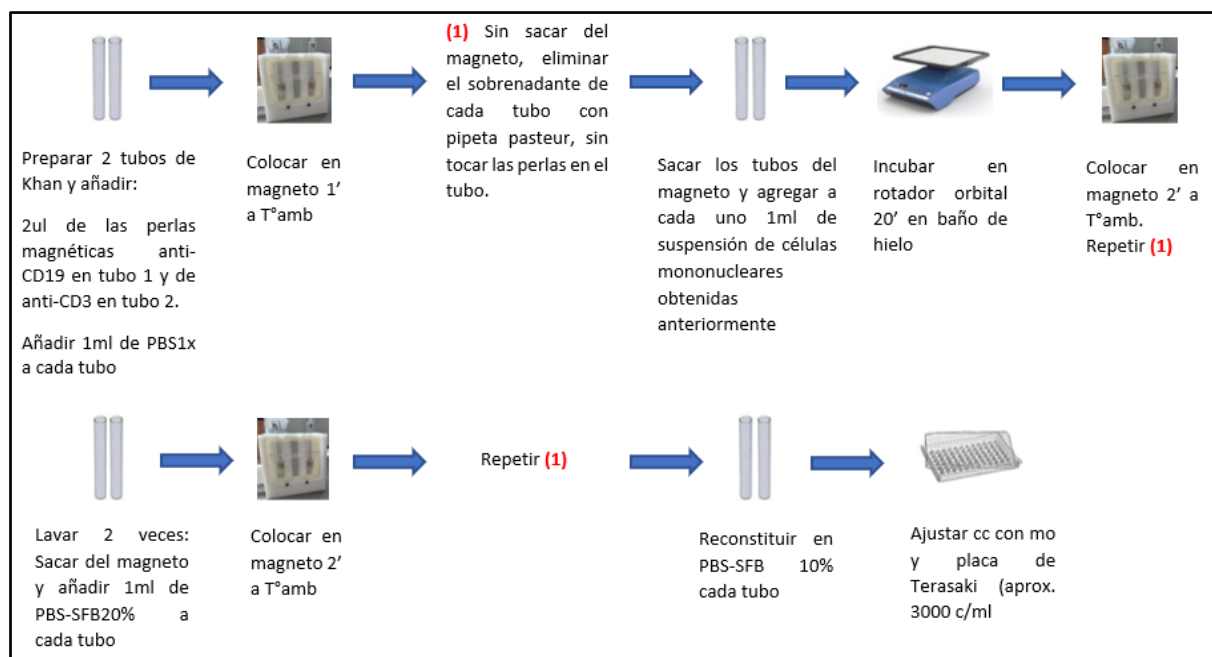


Figura 6: Secuencia de pasos para la separación de linfocitos T y B utilizando perlas magnéticas. Fuente: Elaboración propia.

### 3- CROSSMATCH POR CITOTOXICIDAD DEPENDIENTE DEL COMPLEMENTO:

Muestras:

- ❖ Suero del receptor
- ❖ Linfocitos T y B del donante obtenidos previamente mediante técnicas 1 y 2

Equipamiento:

- ❖ Placa de Terasaki
- ❖ Pipetas Hamilton de 1ul y de 5ul
- ❖ Micropipetas automáticas
- ❖ Microscopio de fluorescencia de luz invertida

Reactivos:

- ❖ Vaselina
- ❖ Complemento de conejo
- ❖ Fluoroquenich (FQ)
- ❖ Diacetato de carboxifluoresceina (CFDA)
- ❖ Bromuro de etidio

- ❖ Suero control negativo (CN)
- ❖ Suero control positivo (CP)
- ❖ Ditiotreitól (DTT)

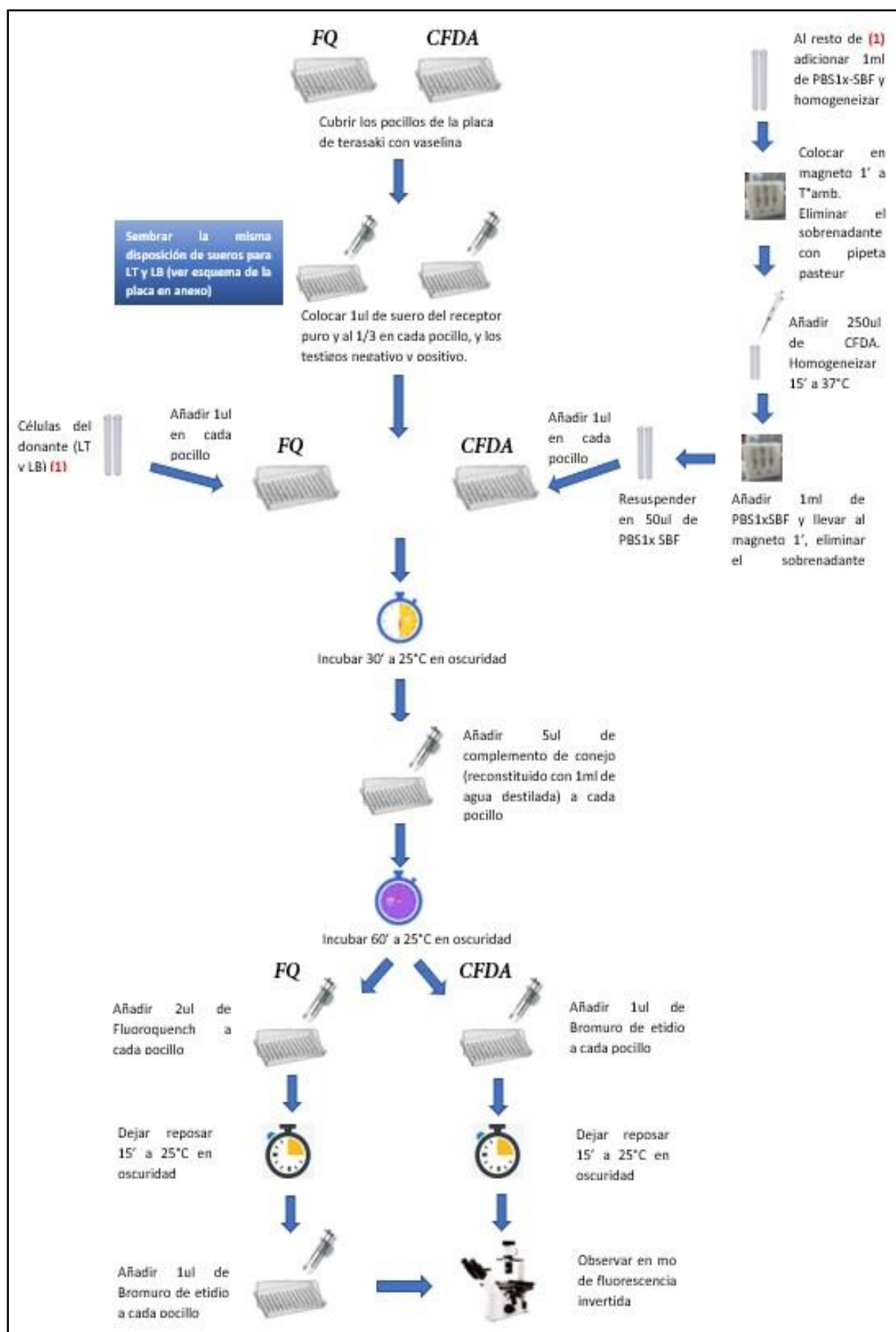


Figura 7: Secuencia de pasos para realizar la CM-CDC utilizando Fluoroquench (FQ) y Diacetato de carboxifluoresceína (CFDA).

Fuente: Elaboración propia.

Visualización de células vivas (color verde) y muertas (color rojo) mediante el microscopio de fluorescencia de luz invertida (Imagen 1) en la CM-CDC.



Imagen 1: Visualización de células vivas (en color verde) y muertas (en color rojo) mediante el uso del microscopio de fluorescencia de luz invertida.

Score según porcentaje de células muertas visualizadas:

- Score 2: < 20%
- Score 4: 20-50%
- Score 6: 50-80%
- Score 8: > 80%

El score 2 se considera negativo.

#### 4- CROSSMATCH POR CITOMETRÍA DE FLUJO:

Muestras:

- ❖ Suero del receptor
- ❖ Linfocitos del probable donante obtenidos previamente mediante técnica 1

Equipamiento:

- ❖ Micropipetas automáticas
- ❖ Tubos para citometría de flujo
- ❖ Tubos eppendorf

- ❖ Tubos Falcón 15ml
- ❖ Estufa (37°C)
- ❖ Microcentrífuga
- ❖ Centrífuga
- ❖ Heladera
- ❖ Citómetro (como mínimo de 4 colores)

Reactivos:

- ❖ Pronasa (0,5 mg/ml)
- ❖ Anti-IgG FITC
- ❖ Anti-CD3 PE
- ❖ Anti-CD19 APC
- ❖ Anti-CD45 PerCP
- ❖ PBS (a temperatura ambiente y a 4°C)
- ❖ Suero control negativo (CN)
- ❖ Suero control positivo (CP)

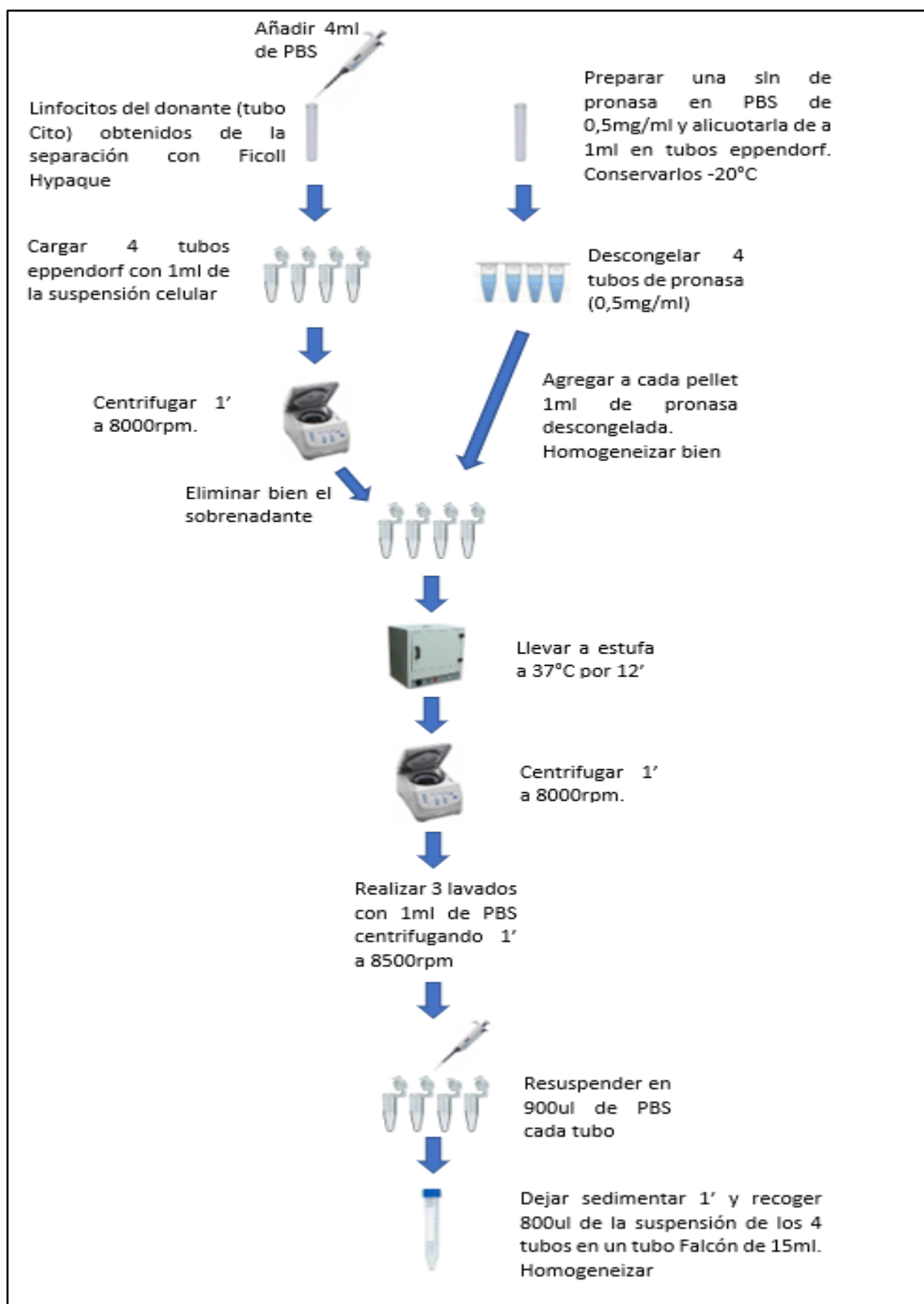


Figura 8: Secuencia de pasos para realizar el tratamiento de las células del posible donante con solución de pronasa (0,5

mg/ml). Fuente: Elaboración propia.

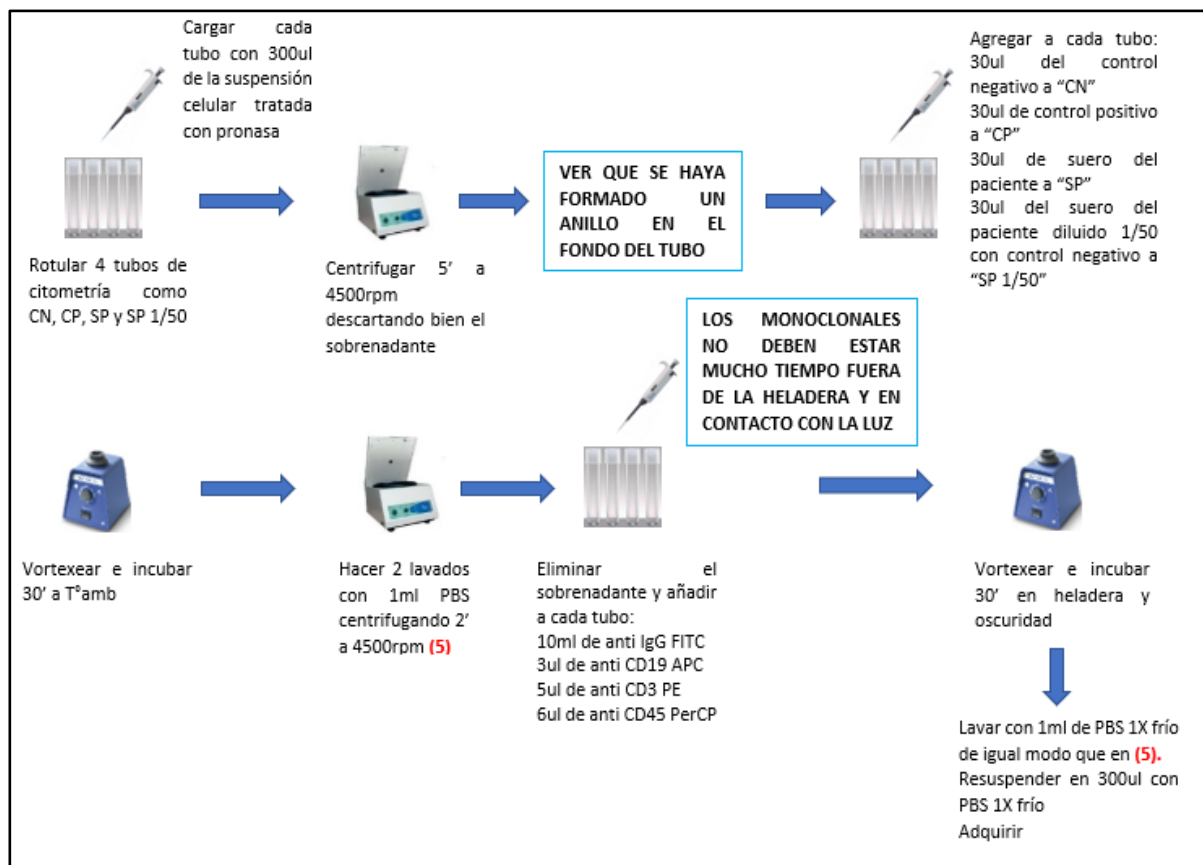


Figura 9: Secuencia de pasos para realizar la FCCM. Fuente: Elaboración propia.

Lo valores de referencia para MCS (median channel shift) utilizados, teniendo en cuenta la bibliografía, fueron:

	Positivo	Borderline	Negativo
Linfocitos B	>120	120-100	<100
Linfocitos T	>60	60-40	<40

## RESULTADOS

### Ensayos de crossmatch donante-receptor

Luego de la realización de los ensayos de crossmatch se elaboró la tabla comparativa 1 con las características observadas de cada técnica empleada, como ser anticuerpos detectados, método utilizado, muestras iniciales empleadas y sus correspondientes tratamientos previos, técnicas de separación de poblaciones celulares, tiempo de procesamiento requerido, equipamiento específico empleado, entre otras.

	CM-CDC	FCCM
<b>¿QUÉ DETECTA?</b>	Aloanticuerpos IgG e IgM fijadores del Complemento en el suero del receptor, contra antígenos HLA presentes en las células del posible donante	Aloanticuerpos de tipo IgG fijadores y no fijadores del Complemento, en el suero del receptor, contra antígenos HLA presentes en las células del posible donante
<b>MÉTODO EMPLEADO</b>	Capacidad citotóxica dependiente del Complemento	Marcadores de inmunoglobulina G asociado con fluorocromos. (Anti-IgG FITC)
<b>MUESTRAS INICIALES</b>	-Sangre entera heparinizada del posible donante -Suero del receptor (puro y diluido)	
<b>TÉCNICA DE SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA</b>	Centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll Hypaque	
<b>TRATAMIENTO PREVIO DE LAS MUESTRAS INICIALES</b>	-Suero del receptor: 56°C; 10 minutos	
	Se emplean sueros con y sin tratamiento con Ditiotreitól (DTT)	Tratamiento del suero con solución de Pronasa (0,5mg/ml)
<b>TÉCNICA DE SEPARACIÓN DE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS</b>	Separación física, previo a la determinación, mediante empleo de microesferas inmunomagnéticas (Dynabeads anti CD3; anti CD19)	Marcación simultánea a la determinación, mediante empleo de Acs monoclonales específicos (Anti-CD3; Anti-CD19; Anti-CD45)
<b>INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b>	Empleo de colorantes vitales (FQ y CFDA); visualización en microscopio con conteo de células viables; sistema de score estandarizado	Valores expresados en corrimiento de canales MCS respecto a un control negativo.
<b>TIEMPO DE PROCESAMIENTO</b>	6h	5h

<b>EQUIPAMIENTO ESPECÍFICO</b>	-Magneto -Pipetas Hamilton -Placa de Terasaki -Microscopio de fluorescencia de luz invertida	-Tubos para citometría de flujo -Citómetro de flujo
--------------------------------	---	--

Tabla 1: Tabla comparativa con las características de ambas técnicas empleadas en los ensayos de crossmatch. Fuente: elaboración propia.

### Análisis retrospectivo

A partir del análisis retrospectivo realizado se elaboraron las tablas 2 y 3.

En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos según la técnica empleada. Del total de datos analizados, por CM-CDC se obtuvo un 16% de resultados positivos para linfocitos T y B, un 76% negativo para ambas poblaciones linfocitarias, un 8% positivo solo para linfocitos B y ningún valor border line (BL). Resulta importante destacar que, entre los resultados informados negativos para ambos linfocitos por CM-CDC, se presentó un caso positivo sin tratamiento con DTT, pero negativo con el mismo.

Mientras que por FCCM, un 36% resultó positivo para linfocitos T y B, un 53% negativo para ambos, un 3% positivo solo para linfocitos B, un 5% de resultados BL para linfocitos T (MCS=40-60) y un 3% para linfocitos B (MCS=100-120).

No se obtuvieron datos positivos solo para linfocitos T por ninguna de las técnicas realizadas.

RESULTADOS	TÉCNICA EMPLEADA	
	Citotoxicidad dependiente del complemento	Citometría de flujo
<b>T y B +</b>	17	38
<b>T y B -</b>	80	56
<b>Solo B+</b>	9	3
<b>BL para T</b>	0	6

<b>BL para B</b>	0	3
<b>N</b>	106	106

Tabla 2: Resultados de las pruebas cruzadas realizadas, CM-CDC y FCCM, durante el período comprendido entre enero de 2018 y noviembre de 2022 en el Laboratorio de GENÉTICA MOLECULAR E HISTOCOMPATIBILIDAD del Hospital Dr. Julio C. Perrando, Resistencia, Chaco. Fuente. elaboración propia.

En la tabla 3 se muestran los datos teniendo en cuenta la relación entre los resultados obtenidos mediante ambas técnicas.

		RESULTADOS POR CM-CDC			N
		T y B +	T y B -	s/B+	
<b>RESULTADOS POR FCCM</b>	<b>T y B +</b>	16	17	5	38
	<b>T y B -</b>	0	56	0	56
	<b>s/B+</b>	0	2	1	3
	<b>BL T</b>	0	4	2	6
	<b>BL B</b>	1	1	1	3
<b>N</b>		17	80	9	106

Tabla 3: Resultados de las pruebas cruzadas realizadas por CDC y su relación con los resultados obtenidos por FCCM, durante el período comprendido entre enero de 2018 y noviembre de 2022 en el Laboratorio de GENÉTICA MOLECULAR E HISTOCOMPATIBILIDAD del Hospital Dr. Julio C. Perrando, Resistencia, Chaco. Fuente: elaboración propia.

Se observa que, del total de resultados positivos para ambas poblaciones linfocitarias mediante CM-CDC, un 94% también resultó positivo para T y B por FCCM, en tanto que, del total de resultados negativos para ambos linfocitos por CM-CDC, un 70% resultó negativo para ambos por FCCM y un 21% fue positivo para ambos linfocitos.

Por otro lado, del total de resultados positivos para ambas poblaciones linfocitarias mediante FCCM, un 42% también resultó positivo para ambas por CM-CDC y un 45% fue negativo. Con respecto a los resultados negativos para ambas células por FCCM, el 100% también resultó negativo para ambos linfocitos mediante CM-CDC.

## **DISCUSIONES**

### **Ensayos de crossmatch donante-receptor**

A partir de los ensayos de pruebas cruzadas realizados se pudo determinar similitudes y diferencias entre ambas técnicas.

En cuanto a las similitudes observadas, tanto en la CM-CDC como en la FCCM se detectaron aloanticuerpos correspondientes a linfocitos T y linfocitos B en el suero del receptor contra antígenos HLA presentes en las células del posible donante. Se emplearon las mismas muestras iniciales y, en el caso del donante fue necesario realizar una separación de las células mononucleares mediante una técnica en común, centrifugación utilizando Ficoll Hypaque, mientras que, para el suero del receptor se procedió a una incubación a 56°C con el objetivo de inactivar su complemento.

En relación a las diferencias entre ambas se observó que, el método empleado para la determinación de los aloanticuerpos resultó diferente, en la CM-CDC se empleó la capacidad citotóxica dependiente del complemento, por este motivo los anticuerpos anti-HLA detectados fueron aquellos que pueden fijar el complemento, mientras que, en la FCCM se utilizaron marcadores de inmunoglobulina G (IgG) asociados a fluorocromos. Por ello, en el caso de la FCCM, fue posible determinar incluso aquellos aloanticuerpos que no activan al complemento.

Para la separación de poblaciones linfocitarias, en la CM-CDC se realizó una separación física previa de estas células mediante el empleo de microesferas inmunomagnéticas, mientras que en la FCCM fue posible la evaluación simultánea de estas poblaciones linfocitarias mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos. Esto no solo implicó un tiempo de procesamiento mayor en la CM-CDC sino también el riesgo de error asociado al operador y a la técnica, la cual incluyó muchos pasos de lavados durante el proceso de separación.

Otro punto importante a considerar es que, en la FCCM se realizó un tratamiento previo de las células del donante con solución de pronasa, el objetivo de esto fue eliminar los receptores Fc (FcR) presentes en la superficie celular de los linfocitos B y evitar, de esa manera, la unión inespecífica de las inmunoglobulinas a la superficie de estas células. Esto permitió eliminar el posible error de falsos positivos para linfocitos B. Es un paso de trascendental importancia y cuidados, ya que un exceso de concentración de pronasa, tiempo de incubación, y/o temperatura puede conducir a falsos positivos para linfocitos T y/o a afección de las células utilizadas. (Lewski *et. al.*, 2018; Arrunátegui *et. al.*, 2022).

Así mismo, en la CM-CDC se emplearon sueros del receptor con y sin Ditiotreitól, este reactivo permite dividir la IgM pentamérica en monómeros, haciéndola incapaz de activar el complemento. De esta manera fue posible detectar, mediante esta técnica, tanto Acs IgM como IgG (Ercilla y Martorell, 2010; Arrunátegui *et. al.*, 2022). En relación a esto, la FCCM no detecta anticuerpos IgM, debido a que se emplean anticuerpos anti-IgG-humana marcados. Los Acs IgM podrían ser detectados en el caso de emplear anticuerpos anti IgM, sin embargo, los mismos no tienen relevancia en los procesos de rechazo por lo que no se realiza en la práctica (Ercilla y Martorell, 2010).

Con relación a otras especificaciones se puede mencionar que, ambas técnicas requirieron personal debidamente capacitado y el empleo de equipos complejos, costosos, como ser el microscopio de fluorescencia de luz invertida (por CM-CDC) y el citómetro de flujo (por FCCM). Si bien ambas conllevaron mucho tiempo de procesamiento, la FCCM resultó ser más rápida.

Por otra parte, la interpretación de los resultados en la CM-CDC resultó más subjetiva debido a que, si bien se interpretó utilizando un sistema de clasificación estandarizado, el mismo se basó en el porcentaje de células no viables visualizadas por el operador, mediante el empleo del microscopio de fluorescencia de luz invertida. Mientras que, en la FCCM los resultados se determinaron por el corrimiento de canales de fluorescencia entre la muestra y un control negativo. De esta manera, la FCCM redujo la subjetividad de la CM-CDC, además, permitió obtener valores semicuantitativos de la cantidad de anticuerpos presentes (evaluando el valor de MCS) y poder recuperar los datos para un análisis posterior (Ercilla y Martorell, 2010; López-Hoyos *et. al.*, 2021; Putheti *et. al.*, 2022).

### **Análisis retrospectivo**

Las características mencionadas anteriormente, resultan importantes en la interpretación del análisis retrospectivo realizado en el presente trabajo.

En relación a ello, en las pruebas cruzadas realizadas durante el período de estudio, se presentaron resultados positivos para ambas poblaciones linfocitarias (*i.e.* linfocitos B y linfocitos T) mediante las dos técnicas. Esto se debe a la presencia de acs anti HLA de clase I o de clase I y II, dado que ambas permiten determinar estos anticuerpos, sin embargo, el porcentaje de resultados positivos fue mayor por FCCM. Esto se debe a que la misma es más sensible que la CM-CDC, como se mencionó, esta última no puede detectar los anticuerpos específicos contra el donante que no activan el complemento o que se encuentran en concentraciones inferiores al umbral necesario para su activación (Ercilla y Martorell, 2010; Liwski *et. al.*, 2018; López-Hoyos *et. al.*, 2021; Arrunátegui *et. al.*, 2022; Putheti *et. al.*, 2022).

En cuanto a resultados positivos solo para linfocitos B, los mismos pudieron ser detectados por ambas técnicas. Esta situación puede deberse a las siguientes circunstancias (Ercilla y Martorell, 2010):

- a) Presencia de anticuerpos anti-HLA de clase II.
- b) Presencia de anticuerpos anti-HLA de clase I de bajo título detectables sólo en linfocitos B debido a que éstos expresan mayor cantidad.
- c) Presencia de anticuerpos anti-HLA de clase II y anticuerpos anti-HLA de clase I en baja concentración.

Al analizar la tabla 3 se observa que, del total de estos resultados positivos para linfocitos B por CM-CDC la mayoría resultó positiva para ambas células por FCCM, habiendo solamente un caso en el cual coincidieron en dar positivo solo para B, es decir que los casos mayoritarios podrían deberse a las situaciones planteadas en “b” y/o en “c”, mientras que el resultado coincidente se debería a la presencia de anticuerpos anti-HLA de clase II elevados. Por otro lado, los resultados solo B positivos por FCCM fueron mayormente negativos para ambas células por CM-CDC, esto implica que se trataría

de anticuerpos anti-HLA de clase II, siendo solo detectados por FCCM debido a que este presenta mayor sensibilidad.

Resulta importante añadir que, una causa de falsos positivos para linfocitos B en ambas técnicas podría ser el tratamiento con monoclonales humanizados, por ejemplo, el Rituximab, el cual es un anticuerpo anti CD20, por lo cual todo resultado debe ser interpretado cuidadosamente, con la información completa de los datos clínicos y de tratamientos de cada paciente.

Por FCCM se obtuvieron valores en el rango borderline, a diferencia de por CM-CDC, en cuya técnica no se prevee dicha interpretación. Así mismo, teniendo en cuenta la relación entre los resultados obtenidos mediante las dos técnicas (tabla 3), se observó una mayor coincidencia de los que fueron negativos para ambas poblaciones linfocitarias, esta observación resulta esperable y podría explicarse también considerando la sensibilidad de ambas, dado que por CM-CDC se presenta menor sensibilidad, los resultados borderline obtenidos por FCCM no suelen detectarse por CM-CDC.

En relación al resultado por CM-CDC positivo sin tratamiento con DTT pero negativo con este, el mismo se informó como negativo, debido a que se trataría de Acs anti HLA de tipo IgM, lo cual en principio no contraindica el trasplante. Este hecho se constató dado que el resultado por FCCM fue negativo lo cual se justifica teniendo en cuenta que esta técnica detecta solo IgG.

#### **Valor clínico de los resultados del crossmatch**

Hemos discutido sobre las características de ambas técnicas y sus diferencias en cuanto a la sensibilidad y especificidad. Por estos motivos, para la evaluación de un paciente en lista de espera de un trasplante renal, resulta importante determinar la técnica a utilizar y su interpretación clínica. En la práctica, ambas técnicas son complementarias, utilizándose cada una de ellas para pronosticar eventos distintos y con diferentes valores pronósticos, la evaluación conjunta, considerando también la historia de alosensibilización del receptor, es lo que permite determinar el riesgo real del trasplante. (Ercilla y Martorell, 2010).

En Argentina, la coordinación, normatización y fiscalización de las actividades de donación y trasplante de órganos, tejidos y células es llevada a cabo por el Instituto Nacional Central Único

Coordinador de Ablación e Implante (INCUCAI), el cual establece los lineamientos para estandarizar la metodología de crossmatch a utilizar durante un proceso de trasplante renal. Este organismo especifica la técnica a utilizar, según los antecedentes clínicos del receptor, siendo:

- Pacientes sin antecedentes de sensibilización y con panel por fase sólida (PRA) negativo: realizar crossmatch por citotoxicidad dependiente del complemento
- Pacientes con antecedentes de sensibilización y PRA <50%: realizar crossmatch por citotoxicidad dependiente del complemento y, de acuerdo a indicación médica, efectuar en forma simultánea FCCM.
- Pacientes con PRA por fase sólida >50%: realizar crossmatch por citotoxicidad dependiente del complemento en paralelo con FCCM, con el objetivo de minimizar los tiempos.
- En todos los pacientes pediátricos: realizar crossmatch por ambas técnicas en simultáneo, con el objetivo de minimizar los tiempos.

En relación al valor clínico de estas determinaciones, la CM-CDC pronostica un alto riesgo de rechazo hiperagudo y se considera una contraindicación para el trasplante. Mientras que, la FCCM permite determinar el riesgo de pérdida del injerto al año, especialmente en los retrasplantes, y descartar resultados positivos de la CM-CDC que no contraindican el trasplante (Ercilla y Martorell, 2010; Pomeranz y Trimarchi, 2014).

En la tabla 4 se presenta el valor pronóstico del trasplante según los posibles resultados obtenidos en las pruebas cruzadas (Pomeranz y Trimarchi, 2014).

RESULTADOS DEL CROSSMATCH		VALOR PRONÓSTICO
CM-CDC	FCCM	
Positivo	Positivo	80% Riesgo rechazo hiperagudo, 48h
Positivo	Negativo	Probables autoanticuerpos Confirmar

Negativo	Positivo	↑ Riesgo pérdida injerto, 1 año Primer trasplante: ↑ 12% Retrasplante: ↑ 30%
Negativo	Negativo	Buen pronóstico.

Tabla 4: Resultados posibles de las pruebas cruzadas pre trasplante y su valor pronóstico en el trasplante renal. Fuente: Reformulado de:  
Aspectos clínicos del Trasplante Renal. Pomeranz y Trimarchi, 2014.

Así, una CM-CDC con linfocitos T y B positiva contraindica el trasplante, dado que tiene un valor predictivo positivo (VPP) sobre la pérdida del injerto en las primeras 48h del 80%. (de-Leo-Cervantes, 2005; Ercilla y Martorell, 2010; Pomeranz y Trimarchi, 2014). Sin embargo, el trasplante puede no estar contraindicado si existen evidencias de que esta positividad se debe a autoanticuerpos anti-IgM, dado que los mismos no implican necesariamente riesgo de rechazo hiperagudo y se asocian a un mejor pronóstico de sobrevida del injerto (de-Leo-Cervantes, 2005; Pomeranz y Trimarchi, 2014).

Para poder determinar si se tratan de anticuerpos anti IgM es necesario que, la CM-CDC del suero tratado con DTT haya resultado negativo; no haya evidencia de un evento sensibilizante en los últimos 15 días; por FCCM haya resultado negativa. Pueden ayudar a confirmar una autorreactividad, evidencias de una enfermedad autoinmune como Lupus eritematoso sistémico, Artritis reumatoidea, Cirrosis biliar primaria, entre otros, o la realización previa o simultánea de un crossmatch autólogo positivo por citotoxicidad, que se negativice después del tratamiento del suero con DTT (Ercilla y Martorell, 2010).

Por otro lado, una CM-CDC que resulte B positivo y T negativo no contraindica el trasplante en los primeros trasplantes, pero indica un peor pronóstico en los retrasplantes (Pomeranz y Trimarchi, 2014). En tanto que, ante una FCCM positiva solo para linfocitos B, la decisión de trasplantar debe ser individualizada valorando toda la información del paciente en su conjunto, dado que los anticuerpos IgG anti-HLA-II formados debido a un injerto previo se han relacionado con episodios de rechazo y son considerados un factor de mal pronóstico relativo para los retrasplantes (Ercilla y Martorell, 2010).

De esta manera, si la CM-CDC resulta positiva se aplicará el criterio correspondiente a esta técnica. Si por CM-CDC es negativa y por FCCM positiva, la probabilidad de supervivencia del injerto al año disminuye, según se trate de un primer trasplante o de un retrasplante.

Otro valor clínico importante del resultado de estas pruebas en los trasplantes renales, está relacionado al tratamiento para la desensibilización de los receptores. A partir de los resultados de las determinaciones inmunológicas realizadas pre trasplante, entre ellas las pruebas de crossmatch, es posible determinar los pacientes candidatos a la desensibilización y aquellos en quienes este tratamiento tiene posibilidades de éxito. Para ello, se debe valorar en conjunto toda la información disponible como ser, historia de los niveles de sensibilización y de los elementos sensibilizantes, naturaleza de la población linfocitaria positiva, el valor de MCS por FCCM, entre otros (Ercilla y Martorell, 2010).

Así mismo, estas técnicas poseen un valor clínico importante en la monitorización inmunológica postrasplante renal. El deterioro del funcionamiento renal es frecuentemente la primera evidencia de rechazo y, ante un episodio de rechazo agudo, resulta importante determinar si este tiene o no un componente humoral, dado que estos requieren tratamientos específicos tales como recambios plasmáticos, intervenciones sobre los linfocitos productores de inmunoglobulinas, etc. Para el diagnóstico de un rechazo renal mediado por anticuerpos, es necesario realizar la determinación de anticuerpos donantes específicos circulantes. Debido a que el injerto retiene parte de los aloanticuerpos formados, se reduce el nivel de los mismos en circulación, por lo tanto, es recomendable emplear las técnicas más sensibles para su detección, siendo la FCCM la prueba más indicada. Además, para confirmar el éxito de estos tratamientos se debe informar la eliminación de los anticuerpos donantes específicos circulantes, para lo cual se requiere nuevamente de su determinación por FCCM o por fase sólida (Ercilla y Martorell, 2010; Pomeranz y Trimarchi, 2014).

### **CONCLUSIONES**

En el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo la comparación de las metodologías empleadas en las pruebas cruzadas de la pareja donante-receptor en el trasplante renal (por citotoxicidad

dependiente del complemento (CM-CDC) y por citometría de flujo (FCCM)). El crossmatch por citometría de flujo resultó más sensible, más específica, más rápida y más sencilla, mientras que, el crossmatch por citotoxicidad dependiente del complemento fue menos costoso, pero más subjetivo al momento de la interpretación de los resultados, además el mismo resulta más laborioso cuando se realiza a partir de muestras de donantes cadavéricos debido al gran número de posibles receptores que se evalúan.

Actualmente, siguiendo las normativas establecidas por el INCUCAI, se emplean ambas técnicas de manera complementaria, debido a que cada una pronostica un evento distinto pero importante en el trasplante renal, como ser alto riesgo de rechazo hiperagudo, determinado por una prueba positiva por CM-CDC, la cual contraindica el trasplante y, un aumento del riesgo de pérdida del injerto al año pronosticada por una prueba positiva para FCCM. Actualmente el INCUCAI ha implementado el programa de Hipersensibilizados, haciendo un VCM a los pacientes en lista de espera, con el cual se bajan directamente, de la lista de distribución, a los pacientes que tienen anticuerpos donantes específicos contra ese donante y, se da prioridad al grupo de hipersensibilizados que no poseen anticuerpos pre-formados contra ese donante por sobre el resto de los pacientes de la lista. Es mandatorio para este grupo de pacientes realizar solo la FCCM, mientras que, para los demás se continuaría empleando ambas técnicas de crossmatch.

Asimismo, es importante comprender que el proceso de selección de un donante inmunológicamente compatible con un receptor es progresivo y la decisión final de llevar a cabo el trasplante renal implica realizar estas pruebas junto con otros estudios, siendo el equipo médico quién deberá interpretar y evaluar los mismos en su conjunto.

## REFERENCIAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Peber, J. (2004). *Inmunología Celular y Molecular*. Editorial Elsevier.
- Akgul, S.U., Ciftci, H.S., Temurhan, S., Caliskan, Y., Bayraktar, A., Tefik, T., Kaya, I. A., Canitez, I. O., Demir, E., Yazici, H., Bakkaloglu, H., Aydin, A. E., Turkmen, A., Nane, I., Aydin, F. y Oguz, F. S. (2017). Association Between HLA Antibodies and Different Sensitization Events in Renal Transplant Candidates. *Transplantation Proceedings*, 49 (3), 425-429. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.02.004>.
- Arrunátegui, A. M., Ramon, D. S., Viola, L. M., Olsen, L. G. y Jaramillo, A. (2022). *Biomédica*, 42, 391-413. doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.6255>.
- Cruz-Tapias, P., Castiblanco, J. y Anaya, J. M. (2013). Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation en JM. Anaya et. al. (Eds.), *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. El Rosario University Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459467/>.
- de-Leo-Cervantes, C. (2005). Pruebas de histocompatibilidad en el programa de trasplantes. *Revista de Investigación Clínica*, 57 (2), 142-146. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-83762005000200006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762005000200006&lng=es&tlng=es).
- Dyers, P. y Middleton, D. (Ed.). (1993). *Histocompatibility Testing. A practical approach*. IRL Press.
- Ercilla, M. G. y Martorell, J. (2010). Estudio inmunológico de la pareja donante-receptor. *Revista Nefrología*, 30 (2), 60-70. doi:10.3265/Nefrologia.pre2010.Nov.10692.
- Etxebarria, A., Díez-Martín, E., Astigarraga, E. y Barreda-Gómez, G. (2022). Role of the Immune System in Renal Transplantation, Types of Response, Technical Approaches and Current Challenges. *Immuno* 2022 (2), 548–570. <https://doi.org/10.3390/immuno2040035>.

-Fainboin, L. y Geffner, J. (2005). *Introducción a la Inmunología Humana*. Editorial Médica Panamericana.

-García-García, G., Harden, P. y Chapman, J. (2012). El papel global del trasplante renal. *Revista Nefrología*, 32 (1), 1-6. doi:10.3265/Nefrologia.pre2012.Jan.11333.

-Lazda, V. A. (1994). Identification of patients at risk for inferior renal allograft outcome by a strongly positive B cell flow cytometry crossmatch. *Transplantation*, 57, 964-298.

-Liwski, R. S., Greenshields, A. L., Conrad, D. M., Murphey, C., Bray, R. A., Neumann, J. y Gebel, H. M. (2018). Rapid optimized flow cytometric crossmatch (FCXM) assays: The Halifax and Halifaster protocols. *Human Immunology*, 79, 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.10.020>.

-Lopes, D., Barra, T., Malheiro, J., Tafulo, S., Martins, L., Almeida, M., Pedroso, S., Dias, L., Castro Henriques, A. y Cabrita, A. (2015). Effect of Different Sensitization Events on HLA Alloimmunization in Kidney Transplantation Candidates. *Transplantation Proceedings*, 47(4), 894-897. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.03.014. PMID: 26036480.

-López-Hoyos, M., Ruiz San Millán, J.C., San Segundo Arribas, D. y Calabria, E. R. (2021). Inmunobiología del Trasplante. Estudios inmunológicos del donante y del receptor del trasplante renal en V. Lorenzo., y J.M. López Gómez, (Eds.), *Nefrología al día*. Nefrología de la Sociedad Española de Nefrología. <https://www.nefrologiaaldia.org/146>.

-Molina, J., Navas, A., Agüera, M. L., y Benot, A. R. (2018). Avances en inmunología del trasplante renal. *Nefrología*, 10 (2), 11-19. <https://www.revistanefrologia.com/es-avances-inmunologia-del-trasplante-renal-articulo-X1888970018633756>.

-Muro, M., Álvarez-López, M. R. y Moya-Quiles, M. R. (2008). Histocompatibilidad en trasplantes en P.P Paricio et.al. (Eds.), *Manual sobre donación y trasplante de órganos*. (pp.587-602). Editorial Aran.

-Pandey, P., Pande, A., Mandal, S., Devra, A. K., Sinha, V. K., Bhatt, A. P. y Mishra, S. (2022). Effects of different sensitization events on HLA alloimmunization in renal transplant cases; a

retrospective observation in 1066 cases. *Transplant Immunology*, 75. 101680  
<https://doi.org/10.1016/j.trim.2022.101680>.

-Pomeranz, V. y Trimarchi, H. (2014). *Aspectos clínicos del Transplante Renal*. [Archivo PDF].  
[https://www.nefrohospbritanico.org.ar/clases/libro\\_trasplante.pdf](https://www.nefrohospbritanico.org.ar/clases/libro_trasplante.pdf)

-Putheti, P., Liwski, R.S. y Jindra, P. T. (2022). Reducing number of laboratories performing complement dependent cytotoxicity crossmatching: Reasons and conclusions. *Human Immunology*, 83 (5), 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2022.02.001>.

-Rajalingam, R., Zhang, Q., Michael Cecka, J. y Reed, E. F. (2015). Major histocompatibility complex en L. Xian Chang, y A.M. Jevnikar, (Eds.), *Transplant Immunology*. (pp.85-102). American Society of Transplantation. DOI:10.1002/9781119072997.ch5.

-Resolución 63/2018 de 2018 [Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante] Por la cual se establecen los lineamientos para estandarizar la metodología de crossmatch a utilizar durante los Operativos de Distribución Renal, que deben implementar los laboratorios de histocompatibilidad habilitados. 11 de octubre de 2018.

-Rose, N., de Macario, E. C., Hahey, J. L., Friedman, H. y Penn, G. M. (1992). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. American Society for Microbiology.

-Ruchi, H. N. y Saed, H. S. (9 de febrero de 2023). *Renal Transplantation Rejection*. The National Center for Biotechnology Information. Recuperado el día 20 de enero de 2023 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553074/>.

-Scornik, J.C. (1995). Detection of alloantibodies by flow cytometry: relevance to clinical transplantation. *Cytometry*, 22, 259-263.

-Scornik, J. C., Brunson, M. E., Schaub, B., Howard, R. J. y Pfaff, W. W. (1994). The crossmatch in renal transplantation. Evaluation of flow cytometry as a replacement for standard cytotoxicity. *Transplantation*, 57, 521-625.

-Siu, J. H. Y., Surendrakumar, V., Richards, J. A. y Pettigrew, G. J. (2018). T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. *Frontiers in Immunology*, 9, 2548. doi: 10.3389/fimmu.2018.02548.

-Talbot, D., Bell, A., Shenton, B. K., Al Hussein, K., Manas, D., Gibbs, P. y Thick, M. (1995). The flow cytometry crossmatch in liver transplantation. *Transplantation*, 59, 737-740.

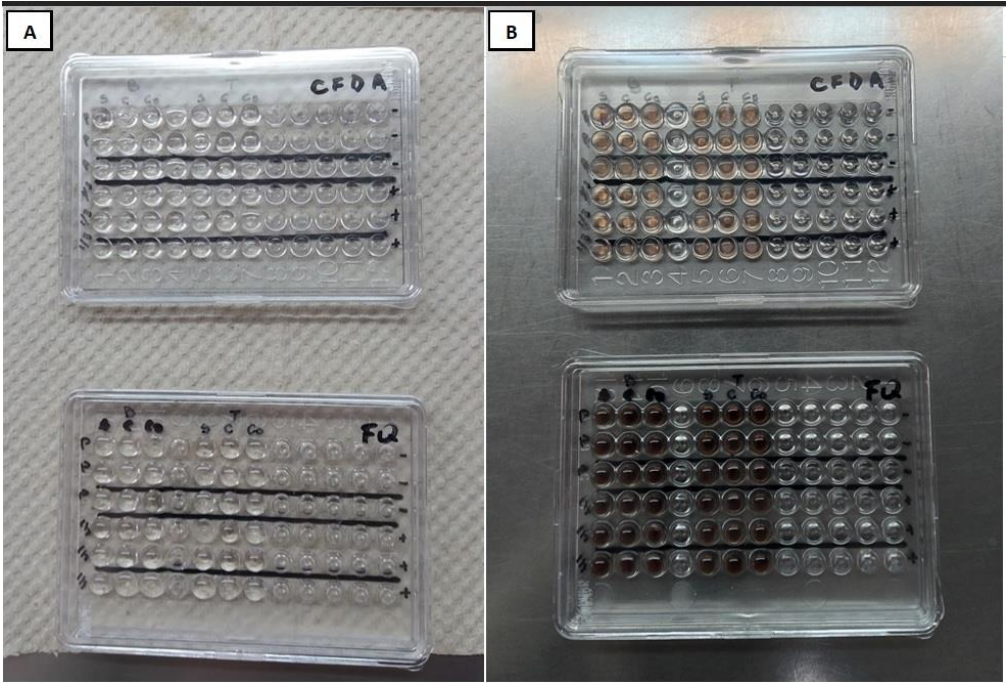
-Thompson, J. S. (1995). American society of histocompatibility immunogenetics crossmatch study. *Transplantation*, 59, 1636-1638.

-Zachary, A. A., Kligman, L., Thorne, N., Smerglia, A. R. y Teresi, G. A. (1995). Variations of the lymphocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity. *Transplantation*, 60, 498-503.

ANEXO

LB				LT					
s/dtt	c/dtt	contro- les		s/dtt	c/dtt	contro- les			
C	P	P	CN	P	P	CN			
C	P	P	CN	P	P	CN			
Ci	P	P	CN	P	P	CN			
C	1/3	1/3	CP	1/3	1/3	CP			
C	1/3	1/3	CP	1/3	1/3	CP			
Ci	1/3	1/3	CP	1/3	1/3	CP			

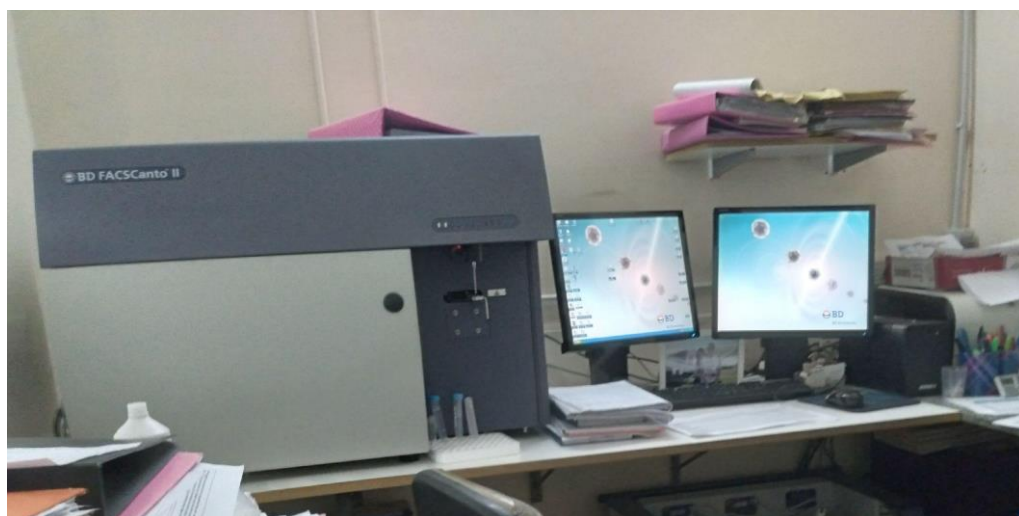
Fotografía 1: Esquema de la disposición de siembra de las muestras en la placa de Terasaki para la realización del crossmatch por citotoxicidad dependiente del complemento. Abreviaciones: s/dtt: Sin DTT; c/dtt: Con DTT; C: Complemento; Ci: Complemento inactivado; P: Suero puro; 1/3: Suero diluido al tercio; CN: Control negativo; CP: Control positivo.



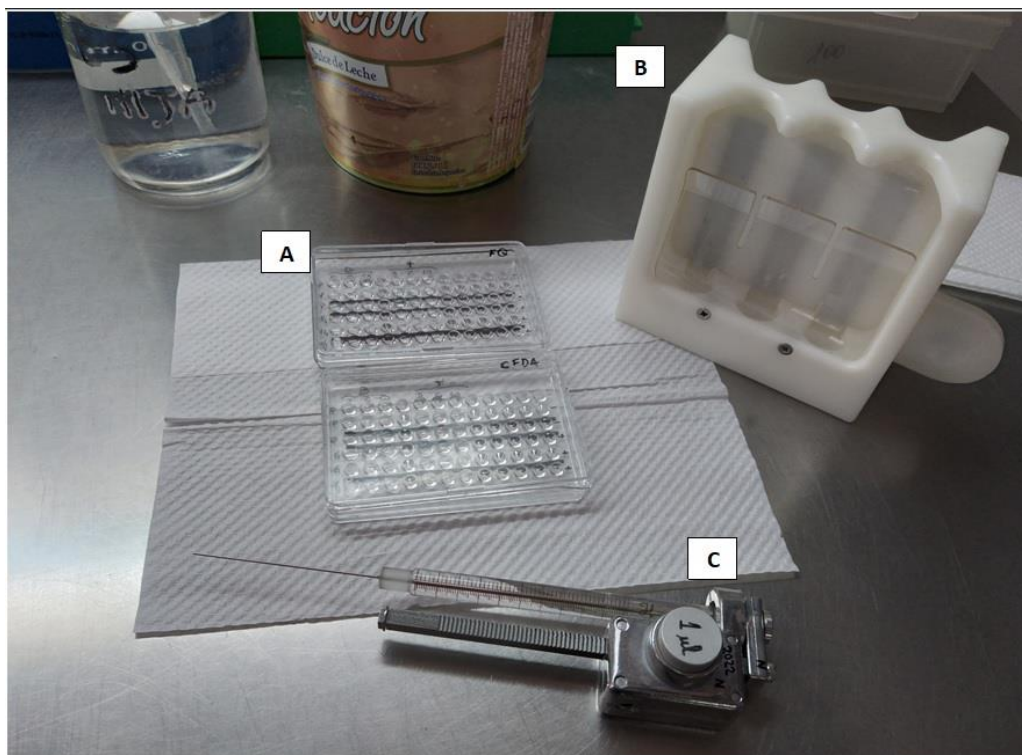
Fotografía 2: Se observan las placas de Terasaki utilizadas en el crossmatch por citotoxicidad dependiente del complemento. A: Al iniciar el ensayo, con los sueros sembrados. B: Al finalizar el ensayo. Abreviaciones: CFDA: Diacetato de carboxifluoresceina; FQ: Fluoroquench.



Fotografía 3: Se observa el microscopio de fluorescencia de luz invertida utilizado en el crossmatch por citotoxicidad dependiente del complemento. El mismo pertenece al Laboratorio de GENÉTICA MOLECULAR E HISTOCOMPATIBILIDAD del Hospital Dr. Julio C. Perrando, Resistencia, Chaco.



Fotografía 4: Se observa el citómetro utilizado en el crossmatch por citometría de flujo. El mismo pertenece al Laboratorio de Inmunología del Hospital Dr. Julio C. Perrando, Resistencia, Chaco.



Fotografía 5: Se observan algunos de los equipamientos utilizados en el crossmatch por citotoxicidad dependiente del complemento. A: Placas de Terasaki; B: Magneto; C: Pipeta Hamilton de 1ul.