



# Anticuerpos anti HLA postrasplante. Un nuevo método de monitorización

M. López-Hoyos, G. Fernández-Fresnedo, J. M. Pastor y M. Arias

Servicio de Inmunología, Hematología y Hemoterapia y Nefrología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.

## INTRODUCCIÓN

La nefropatía crónica del aloinjerto es la principal causa de pérdida del injerto renal a largo plazo<sup>1</sup>. Se trata de un proceso mediado por el sistema inmunitario en respuesta a numerosos factores, incluidos no inmunológicos<sup>2</sup>. Es evidente que en esa reacción inmunitaria juegan un papel fundamental los linfocitos T. No obstante, los anticuerpos (Ac) anti-HLA, que son el único medio de demostrar en la práctica un estado de aloinmunización, están ganando importancia en su papel de mediación de la nefropatía crónica del aloinjerto. De hecho, Terasaki ha sugerido una teoría humoral del trasplante que establece un papel relevante de los Ac anti-HLA en la producción del engrosamiento endotelial de los vasos del injerto que, finalmente, conduce a la pérdida del riñón trasplantado<sup>3</sup>. Aún más, los avances metodológicos producidos recientemente en la detección de estos Ac ha abierto una línea de investigación acerca de la utilidad de su presencia, no sólo en el período previo al trasplante renal sino, lo que es más novedoso, después del trasplante<sup>4</sup>. En la presente revisión se resumirán diversos datos de la literatura más reciente y se hará un especial hincapié en la experiencia de nuestro grupo en cuanto al papel de los Ac anti-HLA en el rechazo agudo y la importancia que pueden tener en la monitorización post-trasplante renal.

## MÉTODOS DE DETECCIÓN DE AC ANTI-HLA

### Ensayo de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento (CDC)

El CDC, ampliamente conocido y clásicamente utilizado en los laboratorios de histocompatibilidad, emplea un panel de linfocitos viables (alrededor de 60) con un fenotipo HLA conocido representativo de

la población general, que se añaden en cada uno de los pocillos de una placa de Terasaki<sup>5</sup>.

Esta prueba no sólo determina la especificidad de los Ac sino también el grado de reacción, lo que se conoce como %PRA (porcentaje de Ac reactivos contra el panel), que representa el número de células del panel que reaccionan con el suero<sup>6</sup>.

### Citometría de flujo (CMF)

La CMF detecta la presencia de Ac anti-HLA mediante el uso de Ac frente a inmunoglobulinas humanas conjugados a fluorocromos, sin necesidad de que el complemento se fije. El empleo de fluorescencia es lo que hace esta técnica mucho más sensible que la CDC clásica<sup>4</sup>. En un principio este método utilizaba, como en la CDC, un panel de linfocitos T (clase I) y B (clase II). Sin embargo, de este modo pueden detectarse autoanticuerpos dirigidos frente a otros antígenos distintos del HLA presente en esos linfocitos<sup>7</sup>. Además, esta técnica depende de la disponibilidad de los linfocitos con las especificidades HLA deseadas. Para evitarlo, se ha ideado un sistema con micropartículas que llevan pegadas en su superficie moléculas de HLA-I y HLA-II<sup>8</sup>. De este modo, se puede realizar la combinación de antígenos HLA que se desee y determinar la especificidad en un solo tubo. En ese tubo se incubarán las micropartículas con el suero a estudio y tras los lavados pertinentes se añadiría un Ac anti-IgG humana conjugado a fluorocromos. La presencia de Ac se objetiva en el citómetro de flujo al incidir sobre la muestra un haz de láser, el cual excita el fluorocromo que va conjugado al Ac y emite luz a una determinada longitud de onda. Esta señal luminosa se capta por unos detectores y un complejo sistema informático es capaz de transformar el mensaje luminoso al lenguaje informático, el cual se puede interpretar mediante el empleo de un software adecuado. En principio, se puede emplear cualquier citómetro de flujo disponible en el mercado. Además, muy recientemente se ha adaptado un sistema de CMF de cribado múltiple que consiste en un panel de micropartículas coloreadas cubiertas con antígenos HLA-I y -II. Se trata de la tecnología de-

**Correspondencia:** Dr. Marcos López Hoyos  
Servicio Inmunología  
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla  
39008 Santander  
E-mail: inmlhm@humv.es

nominada Luminex®, mediante la que se pueden realizar hasta 100 combinaciones de antígenos en una sola suspensión y un mismo ensayo de forma semiautomática<sup>9</sup>.

Una gran ventaja de la CMF es que permite cuantificar objetivamente la concentración de los Ac anti-HLA mediante la intensidad media de fluorescencia que alcanza el suero (*mean fluorescence intensity*, MFI). En una monitorización post-trasplante, no sólo la presencia de Ac, sino las variaciones de la MFI (concentración del Ac) podrían servir teóricamente de marcador de la evolución del paciente y su injerto<sup>10</sup>. Otra forma de medir la intensidad de la reacción es determinando el porcentaje de PRA a partir del porcentaje de células positivas para los Ac anti-HLA de clase I o de clase II.

El último adelanto metodológico de la CMF, que ofrece un abanico muy amplio e ilimitado de antígenos HLA, es el empleo de antígenos únicos recombinantes<sup>11</sup>.

### Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

En el ELISA las moléculas de HLA solubles se adhieren al fondo de los pocillos de una placa, en lugar de a las micropartículas, mediante distintos procedimientos. Estos antígenos pueden proceder de plaquetas o de líneas celulares transformadas con distintos HLA. Al igual que en las otras técnicas de *screening* de Ac anti-HLA, la mezcla de antígenos debe ser representativa de la población general<sup>12</sup>. El suero se incuba con el HLA pegado a la placa. En caso de que existan Ac específicos de moléculas HLA, estos se unirán a ellas y quedarán fijados en la placa. En caso contrario, todas las inmunoglobulinas se eliminarán con los lavados. En un paso posterior la presencia de los Ac fijados se determinará tras incubación con un Ac dirigido frente a IgG humana conjugado a un enzima. En caso de que haya Ac anti-HLA ese enzima producirá una reacción colorimétrica (y no fluorescencia como la CMF) al actuar sobre su sustrato en el último paso de la técnica. Esa reacción se cuantifica en un espectrofotómetro. Mediante ELISA se detectan todos los Ac anti-HLA I, tanto fijadores de complemento como los no fijadores. Aunque no se suelen determinar en la rutina diaria, es posible adaptar la técnica para medir Ac anti-HLA de clase IgM. En un principio, la técnica se diseñó para determinar sólo Ac de clase I aunque actualmente también se ha adaptado para detectar los de clase II<sup>13</sup>.

Una vez que se ha detectado la presencia de Ac anti-HLA (clase I ó II), la especificidad frente a la que se dirigen esos Ac se puede determinar también

mediante ELISA. La metodología es similar a la descrita para el cribado. La diferencia radica en que en el fondo del pocillo no se adhiere una mezcla de Ag HLA de clase I ó II<sup>4</sup>. En este caso cada pocillo tiene pegado unas pocas moléculas HLA bien caracterizadas y que no tienen reacción cruzada entre ellas<sup>4</sup>. Los datos obtenidos en unidades de densidad óptica se transforman en %PRA con un software específico.

Aunque todavía no está disponible, es muy probable que los antígenos HLA recombinantes también se puedan adaptar al ELISA, al igual que ocurre con la CMF.

### Ventajas e inconvenientes (tabla I)

A pesar de que es posible realizar el CDC con un aparataje disponible en cualquier laboratorio, las nuevas técnicas que se están introduciendo en la práctica clínica consiguen una mayor sensibilidad. Además, permiten determinar la especificidad de los Ac anti-HLA con más objetividad y facilidad. Por otro lado, la manera de cuantificar la presencia de estos Ac (unidades de densidad óptica en el ELISA o MFI en la CMF) permite obtener una información cuantitativa y objetiva acerca de la intensidad de la reacción, la cual es posible que se pueda emplear en el futuro como dato para la monitorización inmunológica de los trasplantes<sup>14</sup>.

Tanto el ELISA como la CMF (cuando se usan micropartículas) no precisan del empleo de linfocitos viables ni de actividad de complemento. Los datos de mayor peso en contra de estas técnicas por el momento son su coste elevado y la escasez de estudios mostrando su utilidad clínica<sup>14</sup>.

Finalmente, el porcentaje de pacientes que desarrollan Ac anti-HLA después del trasplante no varía excesivamente según se emplee la técnica de ELISA o la CMF, aunque esta última parece tener una mayor sensibilidad<sup>4</sup>.

### PRODUCCIÓN DE AC ANTI-HLA POST-TRASPLANTE Y EVOLUCIÓN DEL INJERTO Y DEL PACIENTE

Independientemente de la técnica empleada, la incidencia de rechazo agudo en caso de positividad de Ac anti-HLA post-trasplante renal con cualquiera de las tres técnicas es 2-10 veces mayor que si no se detectan. De igual modo, la ausencia de producción de Ac anti-HLA parece acompañarse de un menor porcentaje de rechazo crónico y una mayor supervivencia del injerto<sup>3,4</sup>.

**Tabla I.** Ventajas y desventajas de las tres técnicas utilizadas para detectar Ac anti-HLA en suero

	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Microlinfocitotoxicidad</b>	Equipamiento sencillo Barato Posibilidad prueba cruzada	Detecta otros anticuerpos Precisa experiencia Subjetividad Precisa células viables Necesario complemento
<b>Citometría de flujo</b>	Detecta Ac anti-HLA Objetividad Intensidad de reacción No autoantígenos (con micropartículas) No precisa complemento Ac anti-HLA-I y -II con un solo tubo Posibilidad prueba cruzada Automatismo (Luminex®)	Equipamiento complejo Caro Precisa experiencia Detecta autoantígenos (con células)
<b>ELISA</b>	Detecta Ac anti-HLA Objetividad No precisa células No precisa complemento Automatismo Muchas reacciones en una placa	Equipamiento complejo Precio medio entre CDC y CMF Duda con valores «borderline» No posibilidad prueba cruzada

Curiosamente, los Ac anti-HLA determinados por ELISA, tanto relacionados con el donante como no, se han asociado a una mayor frecuencia de rechazo. Sin embargo, si los Ac se detectan por CDC, únicamente aquellos relacionados con el donante se asocian con rechazo agudo y crónico<sup>4</sup>. Por lo tanto, queda por determinar si la mayor sensibilidad del ELISA para detectar los Ac no específicos del donante tiene relevancia clínica o es un problema técnico.

### Ac anti-HLA y rechazo agudo

Uno de los primeros trabajos aplicando las nuevas metodologías<sup>15</sup> determinó la relación existente entre la evolución clínica del injerto y los cambios en cuanto a la presencia o no de Ac anti-HLA en un suero recogido en los primeros seis meses después del trasplante respecto al suero de la prueba cruzada previa al trasplante. Los pacientes se dividieron en 4 grupos según la presencia o no de Ac anti-HLA en esos sueros (pre-trasplante/post-trasplante): -/-, -/+, +/- y +/+. El análisis de Ac se realizó mediante ELISA, CDC y CMF. El grupo +/+ tuvo un mayor riesgo de rechazo que el grupo -/- con independencia de la técnica empleada. En cambio, el grupo -/+ presentó un mayor riesgo de rechazo cuando los Ac se estudiaron mediante CDC o CMF pero no con ELISA. Además, la concordancia entre métodos fue relativamente baja para el ELISA con las

otras dos. Por ello, los autores consideraban el ELISA y la CDC como técnicas complementarias en el cribado de Ac anti-HLA<sup>15</sup>. En ese mismo trabajo la presencia de Ac anti-HLA-II casi siempre coincidió con la de Ac anti-HLA-I. Muy pocos sueros fueron positivos sólo para HLA-II y, en tal caso, sólo se detectaron con el ELISA, pero no con la CMF. Además, los Ac anti-HLA-II no se asociaron a un mayor riesgo de rechazo por lo que se les concedió una importancia clínica mínima<sup>15</sup>.

En nuestro centro hemos estudiado los cambios producidos en los niveles de Ac anti-HLA-I y -II específicos del donante después del trasplante renal en comparación con la situación previa al trasplante, mediante ELISA en 71 pacientes no hipersensibilizados<sup>16</sup>. Además, quisimos analizar si la producción de novo de estos Ac guardaba alguna relación con las lesiones producidas en el injerto en términos de rechazo y de evolución. Los pacientes incluidos en el estudio se dividieron en dos grupos: (A) aquellos pacientes que produjeron Ac anti-HLA I y/o II específicos del donante o que sufrían un aumento de reactividad > 40% respecto a la muestra pre-trasplante y (B) aquellos sujetos en los que no se comprobó ni una producción de nuevos Ac específicos del donante ni un aumento de reactividad. 16 de los 71 trasplantados estudiados desarrollaron rechazo agudo, con una mayor proporción en el grupo Ac anti-HLA específicos del donante respecto al grupo sin ellos<sup>16</sup>. Estos datos reflejan una sensibilidad del 63% de la detección

de Ac anti-HLA post-trasplante renal para el *screening* de rechazo agudo, alcanzando una especificidad muy elevada de casi el 95%. De igual forma, mucho más elevado fue el porcentaje de pacientes del grupo A que perdió el injerto y en todos los casos, excepto uno, debido a rechazo agudo. En el grupo B, sólo en 1 de los 9 casos en que se perdió el injerto se debió a rechazo agudo. En el grupo A, 8 pacientes sufrieron rechazo agudo, predominando los de tipo vascular de grado II y III de la clasificación de Banff<sup>16</sup>. Además, 7 de esos 8 pacientes desarrollaron Ac anti-HLA-I, lo cual demuestra una clara relación de los Ac de clase I con los episodios de rechazo agudo. El análisis del efecto de los Ac anti-HLA-II sobre la evolución del injerto no rindió ningún resultado significativo, básicamente debido a la producción concomitante de Ac de clase I y II. Un dato llamativo de nuestro trabajo, y muchas veces no considerado, fue la elevada frecuencia de Ac anti-HLA DQ (incluso más que DR). Este hecho remarca la importancia de considerar los mismatches de DQ, además de los DR. Nuestro hallazgo ha sido también puesto en evidencia recientemente por otro trabajo de Worthington y cols.<sup>17</sup>.

Otra similitud entre nuestro estudio y el de Worthington y cols. fue la frecuencia considerable de detección de Ac anti-HLA después del rechazo agudo. Una explicación factible puede ser la adsorción de los aloanticuerpos específicos del donante al injerto previamente y durante el rechazo<sup>13</sup>. Se asume que durante el rechazo los Ac dirigidos frente al HLA del donante se adsorben al injerto y sólo se detectarían circulando en la sangre aquellos Ac libres, después de saturar la unión al injerto. De hecho, muy recientemente se ha demostrado la fijación de los Ac anti-HLA específicos del donantes al injerto rechazado, gracias a la detección de esos Ac en muestras eluidas de biopsias de riñones rechazados<sup>18</sup>.

Como consecuencia del estudio descrito y de la experiencia de nuestro grupo, proponemos un plan de monitorización en el período post-trasplante renal consistente en la detección de Ac anti-HLA bien mediante ELISA y/o CMF de forma semanal durante el primer mes post-trasplante. En los siguientes dos meses, la monitorización se haría cada 2 semanas (fig. 1). Después de ese tiempo, el seguimiento y estudio de Ac anti-HLA específicos del donantes se realizaría de acuerdo a la clínica del paciente<sup>16</sup>.

En resumen, existe una serie de consideraciones que se deben tener en cuenta a la hora de relacionar la detección de Ac anti-HLA en el período post-trasplante renal con el desarrollo de un rechazo agudo<sup>3</sup>. Estas son:

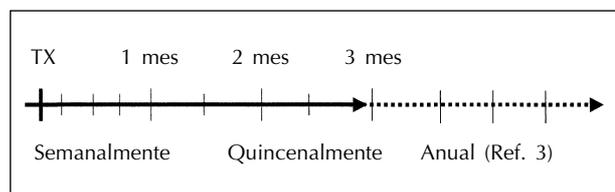


Fig. 1.—Propuesta de protocolo de monitorización de Ac anti-HLA después del trasplante renal. En los primeros tres meses después del trasplante renal la monitorización sería más intensiva para prevenir el rechazo agudo, mientras que posteriormente se realizaría anualmente, en busca de una posible evolución hacia rechazo crónico.

- Dependencia de la especificidad de los anticuerpos (específicos del donante o no; anti-HLA-I o -II).
- Dependencia de la severidad y tratamiento del rechazo agudo.
- Dependencia del isotipo IgG o IgM.
- Debate acerca de la sensibilidad y especificidad de la técnica empleada para detectar estos Ac.

Queda además pendiente de clarificarse el papel de estos Ac en el rechazo. Con las diversas mejoras metodológicas se ha llegado a detectar Ac anti-HLA después del trasplante en el 96% de los casos. Si realmente tienen algún papel patogénico, deberían detectarse en un porcentaje similar antes de los rechazos<sup>3,4</sup>.

### Ac anti-HLA y rechazo crónico

Hasta la fecha no se había considerado la importancia que pudieran tener los Ac anti-HLA en el desencadenamiento de un rechazo crónico. Sin embargo, recientemente han aparecido dos trabajos que hacen hincapié en ello.

Un artículo de la Universidad de Tainan (Taiwan), con la colaboración de Terasaki, pone de manifiesto en el 100% de los casos la formación de Ac anti-HLA previos al desarrollo de rechazo crónico demostrado mediante biopsia<sup>19</sup>. Por el contrario, sólo el 27% de los pacientes que mantuvieron una función renal estable produjeron estos Ac después del trasplante. Aunque no se establece con claridad, parece intuirse de dicho trabajo que la asociación establecida entre la producción de Ac post-trasplante y el rechazo crónico fue independiente de otros factores inmunológicos (por ejemplo, rechazos agudos previos) y no-inmunológicos implicados en la nefropatía crónica del injerto. La importancia de este trabajo radica en ser el primero que muestra una asociación entre la producción de Ac anti-HLA des-

pués del trasplante y el desarrollo de rechazo crónico. Además, muestran la cronología de detección de Ac anti-HLA positivos en 14 pacientes sin Ac anti-HLA pre-trasplante. Dado que los Ac aparecen al menos un año antes en la gran mayoría de los pacientes, Lee y cols. defienden la idea de emplear la detección de Ac anti-HLA de forma anual para monitorizar a los receptores de un trasplante renal y predecir así un rechazo crónico<sup>19</sup>. Según los autores<sup>19</sup> y Terasaki<sup>3</sup>, el daño producido por los Ac necesita de un tiempo variable y, en ocasiones, una cantidad de tiempo considerable hasta que su acción se manifiesta. En la actualidad está en marcha un estudio prospectivo internacional con 1.629 pacientes que pretende confirmar los hallazgos preliminares de Lee y cols<sup>3</sup>.

El hallazgo anterior también parece corroborarse en el trabajo de Worthington y cols. comentado anteriormente, en el sentido de que los sujetos que desarrollaron Ac anti-HLA-I específicos del donante tuvieron fallo del injerto mucho antes que aquellos que sólo produjeron Ac anti-HLA de clase II<sup>17</sup>. No obstante, en este trabajo no se correlacionaron estos hallazgos con la histopatología de los rechazos.

## CONCLUSIÓN

Las facilidades técnicas y la mejoría en la sensibilidad introducidas por el ELISA y la CMF en la detección de Ac anti-HLA, hacen plantearse el empleo de estos Ac como herramientas para la monitorización de los receptores de un trasplante renal. Es muy probable que próximamente aparezcan más trabajos confirmando los datos obtenidos hasta la fecha y que se han resumido aquí. Este tipo de monitorización se convertirá con toda probabilidad en una práctica rutinaria en la clínica. Si la teoría humoral del trasplante se consolida, es muy probable que los tratamientos inmunosupresores se dirijan más hacia el brazo humoral de la respuesta inmunitaria que hacia el celular.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Halloran PF, Melk A, Barth C: Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 10: 167-181, 1999.
2. Merino R, Fernández-Fresnedo G, Arias M: Rechazo de trasplantes. *Medicine* 8: 1342-1349, 2002.

3. Terasaki PI: Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 3: 665-673, 2003.
4. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI: Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 69: 319-326, 2000.
5. Ruiz JC, Arias M, Pastor JM: Manual de Nefrología. Harcourt Eds: 707-724, Madrid, 2002.
6. Terasaki PI, Kreisler M, Mickey RM: Presensitization and kidney transplant failures. *Postgrad Med J* 47: 89-100, 1971.
7. Rodríguez PC, Arroyave IH, Mejía G, García LF: Detection of alloantibodies against non-HLA antigens in kidney transplantation by flow cytometry. *Clin Transplantation* 14: 472-478, 2000.
8. Sumitran-Karuppan S, Moller E: The use of magnetic beads coated with soluble HLA class I or class II proteins in antibody screening and for specificity determinations of donor-reactive antibodies. *Transplantation* 61: 1539-1545, 1996.
9. Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR Jr: Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem* 43: 1749-1756, 1997.
10. Cicciarelli J, Helstab K, Méndez R: Flow cytometry PRA, a new test that is highly correlated with graft survival. *Clin Transplant* 6: 159-164; 1992.
11. Pei R, Lee J-H, Shih N-J, Chen M, Terasaki PI: Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 75: 43-49, 2003.
12. Kao KJ, Scornik JC, Small, SJ: Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies: an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation* 55: 192-196, 1993.
13. Supon P, Constantino D, Hao P, Cagle L Hahn A, Conti DJ, Freed BM: Prevalence of donor-specific anti-HLA antibodies during episodes of renal allograft rejection. *Transplantation* 71: 577-580, 2001.
14. López-Hoyos M, Fernández-Fresnedo G, Pastor JM, Arias M: Clinical significance of anti-HLA antibodies determined by new methods after kidney transplantation. *Rev Port Nefrol Hipert* 15: 63-69, 2001.
15. Christiaans MH, Nieman F, Van Hoof JP, Van der Verg-Loonen EM: Detection of HLA class I and II antibodies by ELISA and complement-dependent cytotoxicity before and after transplantation. *Transplantation* 69: 917-927, 2000.
16. Fernández-Fresnedo G, Pastor JM, López-Hoyos M, Ruiz JC, Zubimendi JA, González-Cotorruelo J, Rodrigo E, De Francisco ALM, Arias M: Relationship of donor-specific class-I anti-HLA antibodies detected by ELISA after kidney transplantation on the development of acute rejection and graft survival. *Nephrol Dial Transplant* 18: 990-995, 2003.
17. Worthington JE, Martín S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Jonson RWG: Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 75: 1034-1040, 2003.
18. Martín L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, Justrabo E, Riflé G: Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 76: 395-400, 2003.
19. Lee P-C, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee P-H, Hung C-J, Chen Y-L, Tsai A, Lei H-Y: All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 74: 1192-1194, 2002.