



Artículo original

Frecuencia de anticuerpos HLA y MICA en pacientes en lista de espera de trasplante renal fallecido, su relación con factores de sensibilización y su posible efecto en el rechazo del injerto renal, en Panamá.

Frequency of HLA antibodies and MICA in patients on the waiting list for kidney died transplant, their relationship to factors awareness and their possible effect on renal graft rejection in Panama.

*Vernaza –Kwiers Alejandro APMC, *Gutierrez Yina, *Moscoso Juan, *Ortiz Luis, *Blake Elena, **Cuero Cesar, *** Viggiano Carlos, ***Manzanares José.

*Laboratorio de Trasplante C.H.M. C.S.S. **Organización Panameña de Trasplante. ***Servicio de Nefrología.

Palabras claves:

Anticuerpos HLA, factores de sensibilización, anticuerpos MICA, histocompatibilidad.

Keywords:

HLA antibodies, factors awareness, MICA antibodies, histocompatibility.

Correspondencia a:

Lic. Alejandro Vernaza

Correo electrónico:

al_ve_rnaza@hotmail.com

Resumen

Estudios previos indican que anticuerpos anti-HLA y anti-MICA están envueltos en la patogénesis del rechazo humoral renal y su presencia puede ser detectada en la etapa pre y post trasplante. La presencia de estos anticuerpos anti donante pre-trasplante o de novo post-trasplante, proveen una medida del valor pronóstico de riesgo de causa de pérdida del injerto por rechazo humoral. Es ampliamente conocido el efecto de los anticuerpos anti- HLA Clase I (HLA-A, -B, -C) y II (HLA-DR, DQ, DP) como causa de rechazo humoral. Se ha establecido igualmente el efecto de los anticuerpos MICA. Los antígenos MICA son genes relacionados con la cadena HLA-B Clase I del Sistema HLA, se expresan en células endoteliales, dendríticas, epiteliales y fibroblastos, pero no en linfocitos. Al no estar expresados en linfocitos, es necesario utilizar método de fase sólida por luminometría para determinar estos anticuerpos anti-MICA circulantes y asociarlos a causa de rechazo humoral mediado por anticuerpos. En este trabajo incorporamos en nuestro protocolo de rutina, adicionalmente a la determinación pre-trasplante renal de anticuerpos anti-HLA, los anticuerpos contra antígenos MICA en receptores renales y a los pacientes trasplantados con disfunción primaria del injerto, a los que se ha solicitado presencia de anticuerpos anti-HLA post-trasplante.

Abstract

Previous studies indicate that anti-HLA and anti-MICA antibodies are involved in the pathogenesis of humoral kidney rejection and their presence can be detected in the pre and post transplant stage. The presence of these antibodies donor pre-transplant or post-transplant de novo provides a measure of prognostic risk of graft loss caused by humoral rejection. It is widely known the effect of anti-HLA Class I antibodies (HLA-A, -B, -C) and II (HLA-DR, DQ, DP) to cause humoral rejection. It has also established the effect of MICA antibodies. MICA antigens are associated with HLA-B Class I HLA System chain genes are expressed in endothelial, dendritic cells, epithelial cells and fibroblasts, but not lymphocytes. Not being expressed in these cells, you need to use solid-phase method luminometry to determine these anti-MICA antibodies circulating and associate due to humoral antibody-mediated rejection. In this work we incorporate in our routine protocol, in addition to renal pre-transplant anti-HLA antibodies, antibodies against MICA antigens in kidney recipients and patients transplanted with primary graft failure determination, which has been requested presence of anti-HLA antibodies post-transplantation.

INTRODUCCIÓN

El Trasplante Renal es el tratamiento de elección para la mayoría de los pacientes con insuficiencia renal terminal (IRT), y esta terapia de reemplazo se inicia en Panamá a partir de 1990 con la modalidad de donante vivo; y en 1998 con la modalidad de donante fallecido [1]. A noviembre de 2015 se han efectuado un total de 675 trasplantes renales, 243 (36%) con modalidad donante vivo y 432 (64%) con donante fallecido. De estos trasplantes se registra un 10 % de pérdida de función renal del injerto al año debido a rechazo agudo o crónico [2].

El Protocolo de Histocompatibilidad del Programa de Trasplante Renal modalidad fallecido incluye que a todos los pacientes activos en la lista de espera, se les efectúe búsqueda de anticuerpos anti- HLA Clase I, II, y recientemente hemos incorporado la búsqueda de anticuerpos anti-MICA [3]. La presencia de anticuerpos circulantes contra los leucocitos humanos (HLA) es una contraindicación para el trasplante, ya que se asocia con incremento del deterioro de la función renal y con disminución de la supervivencia del aloinjerto [5], aún cuando los receptores y el donante posean buena compatibilidad HLA [4, 5, 6, 7, 8].

Estudios recientes mencionan la existencia de anticuerpos no HLA relacionados con trasplante y que se refieren a genes MICA, que son una nueva familia de genes recientemente descritas, altamente polimórficos y localizados dentro de la región de los genes de la Clase I del Sistema HLA en el cromosoma seis [9, 10, 11]. En caso de presencia de anticuerpos preformados pre-trasplante, se identifican los anticuerpos anti-HLA y anti-MICA y luego en el caso de presencia de anti-HLA previo al trasplante, se efectúa la prueba cruzada específica de receptor contra donante [3].

Al presente no efectuamos prueba cruzada anti-MICA donante específica por ausencia de metodología, y en este caso efectuamos tamizaje para determinar presencia de anticuerpo pre-trasplante y de novo post trasplante e incorporaremos la determinación de antígeno MICA en receptor y donante. Anticuerpos monoclonales contra antígenos MICA del donante se ha encontrado que reacciona en biopsias renales en pacientes con rechazo agudo y en receptores de trasplante que desarrollan anticuerpos. Similares hallazgos se han reportado en estudios relacionados utilizando absorción y anticuerpos monoclonales de ratón [12, 13, 14].

Las moléculas MHC no clásicas MICA muestran homología con HLA de Clase I, pero no juegan un papel en la presentación antigénica. El hecho de que MICA se exprese en la superficie de las células endoteliales, sugiere que esta molécula puede jugar un papel como posible diana humoral y celular en relación con la respuesta in-

mune generada durante el rechazo. La expresión de MICA es inducida en situaciones de estrés, en procesos infecciosos y durante transformación tumoral.

Estudios preliminares han valorado la existencia de anticuerpos anti-MICA en relación con el rechazo. Se ha demostrado que durante el curso de trasplante renal se producen anticuerpos anti-MICA, aunque se desconoce el significado clínico de los mismos. Pacientes que habían recibido un trasplante renal/pancreático y habían desarrollado rechazo agudo o crónico, presentaban un incremento de la expresión de MICA en el órgano transplantado y anticuerpos anti-MICA en el suero. Sin embargo, no es fácil establecer si MICA juega un papel en el rechazo de órganos debido a la presencia simultánea de anticuerpos anti-HLA durante el período pos-trasplante., de allí la necesidad de identificarlos simultáneamente. Los genes que conforman la familia MIC incluyen MICA, MICB, MICC, MICD, MICE, MIF y MIFG, donde sólo hay transcritos de mRNA que codifican para proteínas MICA y MICB. Los cinco genes restantes de la familia MIC son pseudogenes por las mutaciones puntuales y deleciones presentes en los mismos, así que no originan proteínas [1].

Inicialmente se identificaron mediante secuenciación del DNA de líneas celulares homocigóticas, 16 variantes alélicas para el gen MICA, pero actualmente el número de variantes alélicas se ha incrementado considerablemente hasta llegar a 54 [17]. Los antígenos MICA son glicoproteínas de superficie con funciones relacionadas a la inmunidad innata y se expresan en las células endoteliales, células dendríticas, fibroblastos, células epiteliales y muchos tumores, pero no en los linfocitos de sangre periférica [18, 19]. Como ocurre con los antígenos HLA, la exposición a los MICA alogénicos durante el trasplante puede inducir la formación de anticuerpos [20]. Es bien conocido que los anticuerpos contra los antígenos HLA especialmente que reconocen antígenos del donante pueden dañar severamente el injerto renal. El trasplante efectuado en presencia de una prueba cruzada positiva puede resultar en rechazo vascular agudo o crónico [21, 22].

El presente trabajo tiene como objetivos:

- Determinar la frecuencia de anticuerpos anti-HLA Clase I, II y MICA en pacientes en lista de espera post trasplante renal con donante fallecido.
- Determinar el efecto de trasplante previo como factor de sensibilización en los pacientes en lista de espera.
- Identificar los anticuerpos anti-MICA más frecuentes en pacientes sensibilizados en lista de espera.
- Evaluar la presencia de anticuerpos anti-HLA y

anti-MICA de novo y establecer si los mismos son causa de disfunción aguda del injerto renal.

-Introducir en nuestro protocolo de rutina pre-trasplante la determinación de anticuerpos anti-MICA mediante método de fase sólida utilizando luminometría y desarrollar un método para determinar la especificidad de anticuerpo MICA anti-donante específico.

Identificación de anticuerpos específicos anti HLA clase I y II.

Se utilizó el método LIFECODES class I II ID de la casa comercial IMMUCOR GAMMA. El procedimiento se compone de microesferas Luminex las cuales están sensibilizadas con glicoproteínas HLA de diferentes individuos, que han sido diseñadas para detectar anticuerpos IgG de clase I II presente en suero humano. Una alícuota de las microesferas es incubada con un pequeño volumen de suero de los individuos a los cuales se les ha comprobado presencia de anticuerpos con la técnica de tamizaje clase I o Clase II según sea el caso.

Identificación de anticuerpos MICA.

Se utiliza la técnica LIFECODES LSA™-MIC IMMUCOR GAMMA, El procedimiento se compone de microesferas Luminex las cuales están sensibilizadas con proteínas MICA recombinantes que incluyen todo el polimorfismo de la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Es un estudio retrospectivo transversal que incluyó inicialmente 55 pacientes sensibilizados de una población de 200 en lista de espera para injerto renal fallecido y posteriormente se estudió un total de 139 pacientes en lista de espera que fueron evaluados por frecuencia de anticuerpos anti-HLA Clase I, II y anti – MICA . Los sueros utilizados fueron obtenidos de la seroteca del Laboratorio de Trasplante, conservados a -86°C . Adicionalmente se estudiaron 20 sueros de pacientes trasplantados en el período 2014 – 2015 con disfunción aguda del injerto, a los cuales se les solicitó prueba cruzada específica anti-HLA receptor contra donante y adicionalmente se incorporó la presencia de anticuerpos anti-MICA de novo.

Para la identificación de anticuerpos anti HLA Clase I, II pre-trasplante, se efectuó tamizaje del suero del paciente y fueron seleccionados para trasplante los receptores con grado de compatibilidad y con prueba cruzada HLA negativa donante específica. En caso de sospecha de rechazo inmunológico post-trasplante los pacientes que resultaron con prueba cruzada positiva para antígeno HLA específico contra su donante, se le identificó el antígeno sensibilizante. En el caso de la identificación de anticuerpos anti-MICA pre-trasplante y de novo post-trasplante, se utilizó procedimiento de tamizaje pre-trasplante para determinar la presencia de estos anticuerpos.

Tamizaje de anticuerpos HLA clase I clase II.

Se utilizó el método LIFECODES LifeScreen Deluxe de la casa comercial IMMUCOR GAMMA. El Procedimiento utiliza microesferas Luminex específicas conjugadas a las glicoproteínas de HLA clase I (HLA-A, -B, -C) y II (HLA-DR, -DQ, -DP) purificadas por afinidad. Se deja incubar una alícuota de las microesferas con un pequeño volumen del suero a estudiar. Seguidamente, se lavan las microesferas sensibilizadas para eliminar los anticuerpos que no se hayan fijado. Se añade luego un anticuerpo anti IgG humano conjugado con ficoeritrina. Después de otra incubación, se diluye la muestra en estudio y se analiza en el aparato Luminex. Se compara la intensidad de la señal emitida por cada microesfera con la del control negativo, para determinar si aquella es positiva o negativa para el aloanticuerpo unido a ella.

RESULTADOS

Frecuencia de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA en pacientes sensibilizados en lista de espera.

Para determinar la frecuencia de anticuerpos anti-HLA Clase I, II se estudiaron un total de 200 pacientes en lista de espera. De esta cohorte 55 (28%) pacientes estaban sensibilizados con anticuerpos anti-HLA y 25 (45%) dieron positivo por múltiples anticuerpos Clase I y II, un 38% (21 pacientes) fueron positivo por Clase I y 9 (16%) fueron positivo para clase II.

Frecuencia de anticuerpos MICA en pacientes sensibilizados de la lista de espera.

Al estudiar la presencia de anticuerpos anti-MICA en los 55 pacientes HLA sensibilizados, se encontró que 11 (20%) fueron positivos por anti-MICA y 44 (80%) fueron negativos. Los anticuerpos anti-MICA más frecuentes en los once pacientes positivos para anticuerpos MICA fueron MICA*041 (5/11=46%), (3/11=27%)*001, *004, *005, *007, *008, *009, *018*, *029;(2/11 =18 %) *006, *037, *042, * 051 ; y (1/11 =9) fueron *002, *012, *015, *016, *030, *036, *043, *050. En la población sensibilizada por anticuerpos anti-MICA hay ausencia de anticuerpos anti-*011, *017, *019, *024, *028, *033, *046. (Gráfica No.1)

Frecuencia de anticuerpos anti-HLA en lista de espera total.

En el estudio de sensibilización de un total de 139 pacientes de la lista de espera, 81(58.2%) resultaron positivos para anticuerpos anti-HLA clase I y/o clase II y 58(41.8%) resultaron negativos por presencia de anticuerpos anti-HLA. De los 81 pacientes con anticuerpos,

37(46.1%) resultaron positivos para ambos anticuerpos HLA clase I y clase II; 33(40.7%) resultaron positivos para anti HLA clase I y negativos para clase II. Y 11 (13.5%) pacientes resultaron negativos para clase I y positivo para clase II.

Frecuencia de anticuerpos anti-mica y anti-HLA en lista de espera total.

De los 139 pacientes de la lista de espera estudiados: 18 (12.9%) resultaron positivos para anticuerpos anti-MICA y 121(87.0%) resultaron negativos. De los 18 pacientes que presentaron anticuerpos anti-MICA, 8 (44.4%) tenían presencia de anticuerpos anti-HLA clase I y clase II, 2 (11.1%) presentaron anticuerpos MICA y anti-HLA clase I positivo y anti-HLA clase II negativo; 2 (11.1%) pacientes presentaron anticuerpos anti MICA y anti HLA Clase II positivo, y 6 pacientes (33.3%) presentaron presencia de anticuerpos anti-MICA y ausencia de anticuerpos anti-HLA clase I y clase II.

Determinación de anticuerpos anti -HLA y mica en pacientes trasplantados con disfunción primaria del injerto.

De un total de 20 pacientes 8(40%) resultaron positivos para anticuerpos anti-HLA pre- trasplante. Un paciente (12%) resultó positivo para anticuerpos donantes específicos HLA (Ver tabla 1).

DISCUSIÓN

Al estudiar la frecuencia de anticuerpos anti-HLA y anti MICA en pacientes sensibilizados en lista de espera por modalidad de injerto renal con donante fallecido, se observa que una gran proporción de los mismos están sensibilizados contra anticuerpos anti-HLA y anti-MICA con presencia de múltiples anticuerpos Clase I y II y anti-MICA y con mayor frecuencia de anti-Clase I.

La presencia de una gran proporción de pacientes sensibilizados en lista de espera exige que se identifiquen los antígenos no deseables en los donantes fallecidos, a fin de evitar rechazo hiperagudo y agudo del injerto renal. En ambos tipos de anticuerpos es necesario efectuar tamizaje o determinación de presencia de anticuerpos y la identificación de la especificidad de los mismos. Los estudios evidencian que un gran número de los antígenos MICA inducen la formación de anticuerpos por eventos sensibilizadores en el período pre-trasplante y que es necesario no solamente identificar la especificidad anti-MICA, sino también los antígenos MICA del receptor y el donante.

En la segunda etapa del estudio establecemos que de la totalidad de pacientes en lista de espera, una alta proporción están sensibilizados, lo cual disminuye la posibi-

Tabla 1. Determinación de anticuerpos anti -HLA y MICA en pacientes trasplantados con difunción primaria del injerto.

Resultados	Anticuerpos Anti-HLA Pre-transplante	Anticuerpos donantes específicos	Tamizaje anti MICA post-transplante	MICA post-transplante de novo
Positivo	8(40%)	1(12%)	5 (25%)	2 (40%)
Negativo	12(60%)	7(88%)	15 (75%)	Negativos
Total	20	8	20	

Tabla 2. Distribución de anticuerpos MICA.



lidad de ser trasplantados y que la proporción es mucho mayor de lo esperado en una población total de lista de espera.

Nuestros resultados sugieren que el factor de riesgo de la alosensibilización HLA y MICA no es idéntico ni dependiente el uno del otro y que ambos anticuerpos están presentes en casos de disfunción primaria del injerto renal.

CONCLUSIONES

1. Los estudios evidencian que una alta frecuencia de pacientes panameños en lista de espera desarrollan anticuerpos anti-HLA y anti MICA previo al trasplante, lo cual disminuye su posibilidad de encontrar donante con prueba cruzada negativa.
2. La incompatibilidad de antígenos HLA y MICA receptor y donante, es el factor de sensibilización más importante y se constituye en el mayor factor de riesgo en los pacientes trasplantados que han perdido el injerto renal.
3. Existe diferencia de frecuencia de anticuerpos MICA en la población de receptores de la lista de espera.
4. La presencia de anticuerpos anti –HLA y anti- MICA de Novo es la causa principal de rechazo del injerto renal.
5. La introducción de la técnica de identificación de antígeno MICA en el receptor y donante pre-trasplante y el uso de tamizaje para la identificación de la presencia de anticuerpos anti –MICA post-trasplante, permite incorporar un método sustituto de la prueba cruzada de anticuerpos anti MICA donante específico.

REFERENCIAS

[1] Cuero, Cesar. Trasplante Renal. Una alternativa viable para la insuficiencia Renal Terminal. Revista Médica de Panamá. Vol. 2 No. 2 págs. 35-38, 1997.

[2] Cuero, Cesar. Evolución de los Trasplantes de Componentes Anatómicos en Panamá. Revista Médica de Panamá Vol. 34, No., 3, págs. 19-11, 2014.

[3] Vernaza A. y col. Sistema de Gestión de Calidad del Laboratorio de Trasplante. Proceso de Trasplante. 2012.

[4] Susal C, Dohler B, Opelz G: Presensitized kidney graft recipients with HLA Class I and II antibodies are at increased risk for graft failure: a Colab. Transplant Study report. Human Immunol 70:569, 2009.

[5] Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, et al. Antihuman

leukocyte antigen and donor specific antibodies detected by Luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. Transplantation 87:1505, 2009.

[6] Terasaki , PI. Humoral Theory of transplantation. Am J. Transplant 2003; 3:665-673

[7] Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, et al. All Chronic rejection failures of kidney transplant were preceded by the development of HLA antibodies. Transplantation 2002; 74: 1192-1194.

[8] Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Post transplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. Transplantation 20032; 75: 1034 – 1040.

[9] Zou Y, Statsny P, Susal C, et al. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. N. Engl J Med 357:1293, 2007.

[10] Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:6259-6263

[11] Hankey KG, Drachenberg CFB, Papadimitriou JC et al. MIC expression in renal and pancreatic allografts. Transplantation 2002; 73: 304-306.

[12] Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, Zou Y, Statsny P. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. Human Immunol 2000; 61: 917-924.

[13] Zou Y, Mirsbaha F, Lazaro A, Shangd Y, Lavingia B, Statsny P. MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. Hum Immunol 2002; 63:30-39.

[14] Suarez B, López A, Díaz B, López C. MICA, un nuevo aloantígeno en el trasplante de órganos. Reseña de investigación No. 42008, 2008.

[15] Bahram S and Spies T. Nucleotide sequence of a human MHC Class I MICBcDNA. Immunogenetics 1996; 43:230-233.

[16] Bahram S and Spies T. The MIC family. Res Immunology 1996; 147:328-333.

[17] Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, Zou Y, Statsny P. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipient. Human Immunol 200; 61:917-24

[18] Jinushi M, Takehara T, Kanto T, et al. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression of IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. J Immunol 2003; 170:1249-56.

[19] Zwirner NW, Dole K, Statsny P. Differential surface expression of MICA by endothelia cells, fibroblast, keratinocytes and monocytes. Human Immunol 1999; 60:323-30

[20] Menier C, Riteau E, Carosella ED, Rouas-Freiss N. MICA triggering signal for NK cell tumor lyses is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal.

- Int JCancer 2002;100:63-70
- [21] Tieng V, Le Bouguenec C, du Merle L, et al. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:2977-82.
- [22] Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, Zou Y, Statsny P. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipient. Human Immunol 200; 61:917-24
- [23] Mizutani K, Terasaki PI, Rosen A, et al: Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. Am J Transplant 5:2265, 2005
- [24] Kristensen ET, Grunnet N, Madsen M, et al. Hyperacute rejection of a kidney allograft may cause by cytotoxic lymphocytes. Acta Pathol Microbiol Scand [C] 1976; 84:304-12.
- [25] Patel R, Teasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. N Engl J Med 1969; 280:735-9
- [24] Kristensen ET, Grunnet N, Madsen M, et al. Hyperacute rejection of a kidney allograft may cause by cytotoxic lymphocytes. Acta Pathol Microbiol Scand [C] 1976; 84:304-12.
- [25] Patel R, Teasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. N Engl J Med 1969; 280:735-9