

Artículos originales

Algoritmo De Selección De Receptores Altamente Sensibilizados En Lista De Espera Modalidad Donante Fallecido En Panamá. 2021

[Selection Algorithm for Highly Sensitized Recipients On The Waiting List Deceased Donor Modality In Panama. 2021]

Alejandro Vernaza-Kwiers^{1,3}, Luis Ortiz¹, Juan Moscoso¹, Yina Gutierrez¹, Cesar Cuero^{2,3}

¹Laboratorio Nacional de Trasplante, Rep. de Panamá; ²Organización Panameña de Trasplante. Rep. de Panamá;

³Academia Panameña de Medicina y Cirugía, Panamá.

Palabras Claves:

Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA),polimórfico,algoritmo,antibody reactive panel.

Keywords:

Human Leukocyte Antigens (HLA),polymorphic,algorithm,antibody reactive panel.

Correspondencia a:

Alejandro Vernaza-Kwiers

Correo electrónico:

al_ve_rnaza@hotmail.com

Recibido:

12 de diciembre de 2021

Publicado:

24 de diciembre de 2021

Aspectos bioéticos:

Los autores declaran que no existe conflicto de interés y que el trabajo fue aprobado por el Comité institucional de ética Institucional.

Financiamiento:

Los autores declaran no tener financiamiento externo para la realización de este trabajo.

Uso y reproducción:

Publicación de libre uso individual, no comercial. Prohibida la distribución para otros usos sin el consentimiento escrito del editorial.

Resumen

El Sistema de antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) juega un papel funcional en la presentación de péptidos al sistema Inmune. El grado de compatibilidad de los antígenos de los leucocitos humanos (HLA) de los loci -A, -B, -DRB1 entre el receptor en lista de espera y el donante, y la ausencia de anticuerpos específicos contra los antígenos HLA del donante, tienen la mejor supervivencia en un trasplante. El nuevo algoritmo de selección de receptores sensibilizados en lista de espera, que se introduce en el presente trabajo, tiene como objetivo mejorar su posibilidad de recibir riñones provenientes de un donante fallecido. Este algoritmo cumple etapas que se siguen en la selección del receptor sensibilizado compatible con el donante fallecido. Previo a incorporar un paciente en la lista de espera, es requisito conocer el grado de sensibilización a los antígenos del sistema de Leucocitos Humanos (HLA). El Laboratorio Nacional de Trasplante ha incorporado el Panel Reactivo de Anticuerpos Calculado (cPRA) que utiliza la frecuencia de antígenos HLA de la población panameña, en sustitución del Panel Reactivo de anticuerpos (PRA) que utiliza la frecuencia de alelos de otra población que no es la panameña.

Abstract

The Human Leukocyte Antigen (HLA) system plays a functional role in the presentation of peptides to the immune system. The degree of compatibility of human leukocyte antigens (HLA) loci -A, -B, -DRB1 between the waiting list recipient and the donor, and the absence of specific antibodies against the donor HLA antigens, have the best survival in transplantation. The new algorithm for the selection of sensitized recipients on the waiting list, introduced in the present work, aims to improve their chance of receiving kidneys from a deceased donor. This algorithm fulfills stages that are followed in the selection of the sensitized recipient compatible with the deceased donor. Before adding a patient to the waiting list, it is a requirement to know the degree of sensitization to the antigens of the Human Leukocyte Antigen System (HLA). The National Transplant Laboratory has incorporated the Calculated Reactive Panel of Antibodies (cPRA) that uses the frequency of HLA antigens of the Panamanian population, replacing the Reactive Panel of Antibodies (PRA) that uses the frequency of alleles of another population that is not Panamanian.

INTRODUCCIÓN

El Sistema de antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) juega un papel funcional en la presentación de péptidos al sistema Inmune [1,2].

Este Sistema es altamente polimórfico y las moléculas HLA inducen a la formación de anticuerpos en 33 % de personas expuestas a antígenos no propios durante el

embarazo, transfusión de productos de la sangre, y trasplantes previos, lo que disminuye su oportunidad de ser seleccionados como receptores [3,4].

El éxito del Trasplante renal está generalmente determinado por factores clínicos e inmunológicos y es conocido que el grado de compatibilidad de los antígenos de los

leucocitos humanos (HLA) de los loci -A, -B, -DRB1 entre el receptor en lista de espera y el donante, y la ausencia de anticuerpos específicos contra los antígenos HLA del donante, tienen la mejor sobrevida. La presencia de anticuerpos anti-HLA específicos en el receptor sensibilizado contra los antígenos HLA del donante son causa de rechazo del órgano trasplantado [5].

Los pacientes altamente sensibilizados representan un riesgo clínico e inmunológico debido a que tienen limitada posibilidad de encontrar un donante aceptable y estos anticuerpos representan el factor de mayor riesgo para la sobrevida del injerto; por lo cual, estos pacientes permanecen por años en lista de espera sin ser trasplantados, y cuando reciben un trasplante, muchos son de alto riesgo por complicaciones posteriores al trasplante [6].

Los rechazos humorales han disminuido después de la introducción de los estudios de histocompatibilidad HLA y las pruebas cruzadas donante específico previos al trasplante que identifican los anticuerpos contra el donante; inicialmente mediante la técnica de citotoxicidad serológica; pero este método es de baja especificidad y sensibilidad y actualmente se han incorporado otros procedimientos con mayor sensibilidad y especificidad como el uso de técnicas de fase sólida mediante ELISA o luminometría [7,8,9].

Con el interés de mejorar el grado de especificidad de la compatibilidad HLA y la sensibilidad de la reactividad de anticuerpos, hemos introducido en el algoritmo de selección la tecnología de fase sólida por luminometría, reemplazando la citotoxicidad [10], lo que incorpora nuevas tecnologías como la tipificación alélica HLA del receptor y el donante, el tamizaje de anticuerpos contra antígenos múltiples, la identificación de anticuerpos sencillos o específicos; la introducción de un nuevo programa denominado Prueba Cruzada Virtual que identifica antígenos no deseables o incompatibles, la Prueba cruzada Real de fase sólida, el Panel Reactivo de anticuerpos, el nuevo Panel Calculado de Reactividad de Anticuerpos (cPRA), el banco de sueros de receptores y el Banco de glicoproteínas HLA del donante.

El desarrollo de los ensayos de fase sólida que usan antígenos HLA sencillos recombinantes del ensayo Luminex solubles han permitido identificar con mayor sensibilidad y exactitud los anticuerpos anti-HLA específicos [11,12].

De los 398 pacientes trasplantados de riñón en Panamá, con donante fallecido desde 2008 a 2020, solo un porcentaje muy pequeño, con nivel de sensibilización de Panel Reactivo de anticuerpos (PRA) mayor de 80% se han trasplantado, lo cual se traduce en una larga permanencia en la lista de espera y pocas posibilidades de trasplante.

Basado en lo anterior, y con el objetivo de aumentar sus posibilidades de trasplante se acordó en 2008, los Criterios para la asignación de Trasplante Renal (CATRE) por la Sociedad Panameña de Nefrología e Hipertensión, que

los pacientes con Panel Reactivo de antígenos (PRA) mayor a un 80% definido mediante técnicas que detecten anticuerpos específicos contra el HLA de tipo IgG por el Laboratorio Nacional de Trasplante de la Caja de Seguro Social, serán considerados urgentes [11,12,13].

Los resultados obtenidos de la selección de pacientes altamente sensibilizados con un nivel de PRA basado en frecuencia de antígenos de una población extranjera diferente a la del receptor, nos obligan a introducir nuevas tecnologías y elaborar un nuevo algoritmo de preselección para mejorar sus posibilidades en la adjudicación de riñones a los pacientes altamente sensibilizados de ser trasplantados.

Con este objetivo hemos incorporado en el algoritmo, la Prueba Cruzada Virtual que nos permite preseleccionar receptores sensibilizados y excluir por reactividad cruzada de los determinantes antigénicos a donantes con antígenos no deseables y el Panel Calculado de Reactividad de Anticuerpos (cPRA), que utiliza la frecuencia de antígenos HLA presentes en la población panameña, para obtener una medida más exacta del grado de sensibilización y aumentar la probabilidad de ser trasplantados al categorizarlos como receptores urgentes [14,15].

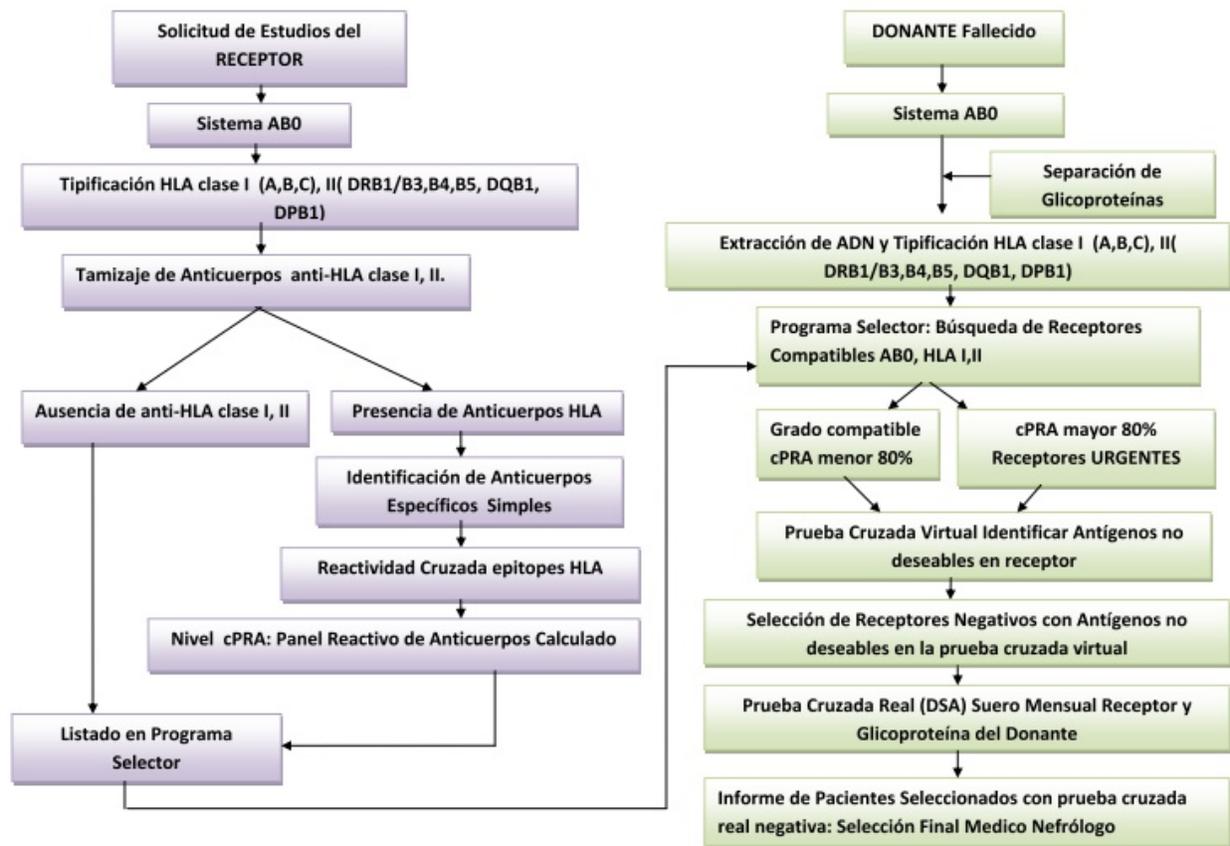
Etapas del algoritmo de selección de pacientes altamente sensibilizados

El nuevo algoritmo de selección de receptores sensibilizados en lista de espera tiene como objetivo mejorar su posibilidad de recibir riñones provenientes de un donante fallecido. Este algoritmo cumple etapas que se siguen en la selección del receptor sensibilizado compatible con el donante fallecido. (Ver Figura No 1)

El algoritmo incluye:

1. Haber cumplido con el protocolo clínico que se inicia con la solicitud por el médico que incluye nombre completo, copia de su cédula de identidad personal, fecha de nacimiento y consentimiento informado de que acepta los estudios inmunológicos.
2. Una vez recibida la solicitud médica se procede a la determinación del grupo sanguíneo, para seguir las reglas de compatibilidad ABO en trasplante renal ante la presencia de un donante fallecido.
3. Para la tipificación de los antígenos del Sistema Mayor de Histocompatibilidad (HLA), utilizamos muestra de sangre periférica con anticoagulante EDTA para separar las células mononucleares y granulocitos necesarias para la extracción del ADN genómico utilizando el método "Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit o el método QIAamp DNA Blood kit (Qiagen) y Maxwell 16 y siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante. La cantidad y pureza se obtiene ajustando la concentración a 15 ng/ml de ADN.

Figura 1. Flujoograma del Algoritmo y las etapas que se siguen en la selección del receptor sensibilizado compatible con el donante fallecido.



Fuente: Programa de Trasplante Renal con Donante Fallecido. Algoritmo de Selección de Receptor en Lista de Espera, Laboratorio Nacional de Trasplante, CSS.

- Se extrae sangre periférica sin coagulante, en ayunas, para la separación de suero necesario para estudios de sensibilización e identificación de anticuerpos anti-HLA y su uso en la prueba cruzada real pre y post trasplante. El ADN extraído y el suero fresco son registrados numéricamente y con fecha actualizada en una Base de Datos y conservados a -86°C .
- Tipificación del Sistema HLA. El método de tipificación incluye la amplificación del ADN mediante la reacción de la cadena polimerasa (PCR) y la identificación del alelo mediante el uso de la secuencia específica de oligonucleótidos (PCR-SSOP) (LIFECODES SSO Typing Kits).

De acuerdo con la nomenclatura del Sistema HLA (IMGT/HLA Database) se definen los alelos para cada loci genético.

La información genética de los Antígenos del Sistema de Leucocitos Humanos (HLA) del receptor incluyen la tipificación de los antígenos y alelos correspondientes a cada uno de los Loci HLA-A*, B*, C*, DRB1*, DQB1*, DQA1*, DPB1*, DPA1*

La exactitud de los estudios de tipificación HLA es garantizada ya que el Laboratorio Nacional de Trasplante

- participa desde el 2013 hasta el presente, en el Programa de Proficiencia Externa de la Sociedad Americana de Histocompatibilidad e Inmunogenética (ASHI) de los Estados Unidos, en los diferentes procedimientos del Algoritmo del Laboratorio que incluyen : tipificación HLA en intermedia y alta resolución , tamizaje de anticuerpos anti-HLA Clases I, II, determinación de antígenos sencillos sensibilizantes , prueba cruzada real del receptor.
- Programa selector. La tipificación HLA del receptor efectuada por luminometría es incorporada a la Base de Datos del PROGRAMA SELECTOR, construido por el Laboratorio Nacional de Trasplante que contiene la lista de pacientes en espera, su número de cédula, nombre completo, grupo sanguíneo ABO, si es paciente urgente según criterio CATRE de la Sociedad Panameña de Nefrología e Hipertensión y su tipificación HLA para sus antígenos de Clase I (-A*, -B*) y Clase II (DRB1*).

- Tamizaje por presencia de anticuerpos anti HLA en el suero de pacientes. Previo a incorporar un paciente en la lista de espera, es requisito conocer el grado de sensibilización a los antígenos del sistema de Leucocitos Humanos (HLA), para lo cual , estudiamos el suero fresco obtenido en ayunas, y determinamos su reactividad.

vidad de anticuerpo contra microesferas con antígenos HLA Clase I y otras con antígenos HLA Clase II, que son utilizando un panel comercial general de antígenos, este tamizaje nos indica si el paciente está sensibilizado o no.

Una alícuota de microesferas se incuba con un pequeño volumen de muestra de suero, las microesferas una vez sensibilizadas se lavan para remover el anticuerpo no fijado. Anticuerpo tipo Inmunoglobulina "G" conjugado con ficoeritrina se añade. Se efectúa una nueva incubación, y la muestra es diluida y analizada en el instrumento Luminex. La intensidad de la señal de cada perla es comparada con la intensidad de la señal de la perla del control negativo incluido en la preparación de perlas, para determinar si la perla es positiva o negativa por fijación del anticuerpo [4].

El procedimiento utilizado es un método cualitativo de inmunoensayo basado en el uso de microesferas para la determinación de anticuerpo tipo Inmunoglobulina "G" contra las moléculas HLA Clase I (-A, -B, -C,) y Clase II (DRB1, -DQB1, -DQA1, -DPB1, DPA1). Estas microesferas Luminex presentan afinidad con las glicoproteínas HLA Clase I y Clase II al ser conjugadas.

- Identificación de los anticuerpos HLA específicos presentes en el suero de los pacientes sensibilizados en lista de espera. El Laboratorio Nacional de Trasplante utiliza el sistema de ensayo sencillo y específico contra antígenos HLA de la empresa LIFECODES que es un ensayo de fase sólida para determinar anticuerpos específicos contra las glicoproteínas HLA Clase I (A, -B, -C,) y Clase II (DRB1 /B3, B4, B5, , DQB1, DQA1, DPB1, DPA1) El sistema se compone de 100 diferentes perlas de Luminex Clase I y 100 de Clase II, las cuales se conjugan con moléculas de glicoproteínas HLA clase I y Clase II recombinantes.

Se deja incubar una muestra alícuota de las microesferas con un pequeño volumen de suero del receptor. Las microesferas una vez sensibilizadas son lavadas para remover el anticuerpo no fijado al sistema microesferas-glicoproteínas HLA. Luego se añade un anticuerpo anti-IgG conjugado con ficoeritrina. Después de la incubación, la muestra se diluye y se analiza en el instrumento Luminex. Se compara la intensidad de la señal emitida por cada microesfera con la de la microesfera específica del locus de más baja calificación incluida en la preparación, para determinar si aquella es positiva o negativa en cuanto al anticuerpo unido.

Durante los meses de julio a noviembre de 2021 se renovó la lista de espera de receptores de donante fallecido con un total de 109 pacientes, de los cuales 78 (71.5%) resultaron negativos por presencia de anticuerpos anti HLA Clase I y II y 31 pacientes (28,4%) positivos por presencia de anticuerpos (Ver tabla No. 1). De los 31 receptores con anticuerpos, 22 (70.9%) presentaron anticuerpos específicos Clase I (HLA-, -B, -C) y 21 pacientes (67.7%) con presencia

Tabla 1. Anticuerpos anti-HLA Clase I y II en pacientes en lista de espera (noviembre 2021).

Grado de sensibilización	N	Porcentaje (%)
Negativo	78	71,5
Positivo	31	28,4
Total	109	100%

Grado de sensibilización con anticuerpos HLA clase I y II en pacientes en lista de espera. Noviembre 2021.

TABLA 2. Pacientes sensibilizados en lista de espera con presencia anticuerpos anti- HLA Clase I y/o II (noviembre 2021)

	N	Porcentaje (%)
Anti HLA Clase I	22/31	70,9%
Anti HLA Clase II	21/31	67,7%
Anti HLA Clase I y II	13/31	41,9%

Especificidad de Anticuerpos HLA en Pacientes en Lista de Espera (Noviembre 2021)

de anticuerpos Clase II (DRB1, DQB1, DPB1) y 13 pacientes presentaron anticuerpos múltiples de Clase I y II (Ver tabla No. 2).

- Determinación del panel reactivo de anticuerpos anti HLA (PRA) de los pacientes sensibilizados en lista de espera. El PRA se define como Panel Reactivo de Anticuerpos y es utilizado para medir el grado de sensibilización de los receptores de riñón en lista de espera. Este nivel representa el porcentaje de los posibles donantes de una población con antígenos no deseables con el receptor sensibilizado.

Para determinar si el paciente posee anticuerpos anti-HLA y su grado de sensibilización, estudiamos el suero fresco contra las glicoproteínas HLA Clase I y Clase II que son obtenidas de un panel comercial de 100 donantes de moléculas HLA que representan los antígenos HLA más frecuentes en una población diferente a la panameña.

Estos 100 donantes comerciales para Clase I y 100 para Clase II, indican la probabilidad expresada en porcentaje, de encontrar un donante compatible deseable que no tenga los antígenos específicos contra los cuales el receptor tiene anticuerpos. La desventaja del nivel del panel reactivo de anticuerpos (PRA) usado actualmente por el laboratorio es que utiliza la frecuencia de genes de una población diferente del receptor.

Si el suero del paciente no reacciona contra ninguna de las moléculas de las glicoproteínas de los donantes comerciales presentes en el panel, no está sensibilizado y tiene un PRA igual a cero. Si el suero del pacien-

te reacciona con 80 de las 100 muestras de glicoproteínas comerciales, el paciente tiene un PRA de 80%. Teóricamente significa que, de los donantes disponibles en el panel, el receptor puede experimentar rechazo agudo en 8 de los 10 donantes.

Los resultados de PRA mayor de 80%, indican que el donante debe esperar largo tiempo hasta que un donante compatible esté disponible y que sólo tiene una probabilidad de encontrar donante deseable en un 20% de la población. Por esto los sistemas de asignación de órganos en el caso de donantes fallecidos brindan a pacientes en lista de espera con PRA mayor de 80, la categoría de urgente.

Si el paciente tiene anticuerpos contra el HLA-A*02, este antígeno debe ser considerado inaceptable o incompatible para este paciente, al igual que otros antígenos HLA que comparten el núcleo central del epítipo que reconoce el anticuerpo anti-HLA-A*02. Si el paciente es trasplantado con un riñón que tiene

HLA-A*02, el órgano será rechazado [14].

Conociendo los antígenos inaceptables por un receptor, se aumenta la eficiencia en la adjudicación de los órganos al conocer previamente los donantes incompatibles o no deseables.

Hay varios problemas con la aplicación del nivel PRA en la adjudicación de órganos, ya que el valor es altamente variable e inconsistente al dar valores inexactos, por ser representativo de una población de potenciales donantes utilizados por la casa comercial y los resultados dependen de la composición de esa población utilizada y no de la población étnica del receptor, por lo cual debemos utilizar la frecuencia de genes HLA de la población panameña [15] (Ver tabla No 3).

10. Nuevo panel reactivo de anticuerpos calculado (cPRA). El Laboratorio Nacional de Trasplante ha incorporado el Panel Reactivo de Anticuerpos Calculado (cPRA)

Tabla 3. Frecuencia de alelos HLA Clase I en la población Panameña.

<i>HLA-A</i>		<i>HLA-B</i>		<i>HLA-C</i>	
<i>Alelo</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Alelo</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Alelo</i>	<i>Frecuencia</i>
A*24:02	0,2240	B*40:02	0,1137	C*04:01	0,1951
A*02:01	0,1493	B*35:01	0,0949	C*01:02	0,0953
A*68:01	0,0713	B*35:43	0,0607	C*07:01	0,0942
A*31:01	0,0532	B*44:03	0,0453	C*03:04	0,0843
A*23:01	0,0520	B*51:01	0,0442	C*07:02	0,0698
A*03:01	0,0453	B*58:01	0,0364	C*03:05	0,0654
A*01:01	0,0396	B*15:01	0,0331	C*16:01	0,0532
A*33:01	0,0362	B*18:01	0,0320	C*05:01	0,0377
A*11:01	0,0305	B*07:02	0,0298	C*06:02	0,0344
A*30:01	0,0294	B*53:01	0,0276	C*03:02	0,0333
A*02:02	0,0249	B*44:02	0,0265	C*08:02	0,0288
A*30:02	0,0238	B*49:01	0,0243	C*17:01	0,0277
A*29:02	0,0238	B*08:01	0,0232	C*02:02	0,0255
A*26:01	0,0215	B*39:01	0,0232	C*03:03	0,0200
A*02:06	0,0147	B*15:03	0,0210	C*12:03	0,0200
A*74:01	0,0147	B*14:02	0,0210	C*15:02	0,0166
A*68:02	0,0136	B*39:11	0,0199	C*12:02	0,0155
A*32:01	0,0136	B*52:01	0,0199	C*02:10	0,0144
A*34:02	0,0102	B*57:01	0,0199	C*14:02	0,0111
A*02:05	0,0102	B*45:01	0,0177		
		B*15:10	0,0133		
		B*42:01	0,0121		
		B*35:12	0,0121		
		B*35:02	0,0110		
		B*35:03	0,0110		

Tabla 3. Frecuencia de alelos HLA Clase I en la población Panameña.

HLA-DPB1		HLA-DQB1		HLA- DRB1	
<i>Alelo</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Alelo</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Alelo</i>	<i>Frecuencia</i>
DPB1*04:02	0,2760	DQB1*03:02	0,2329	DRB1*04:07	0,0977
DPB1*04:01	0,1563	DQB1*03:01	0,2280	DRB1*07:01	0,0927
DPB1*02:01	0,1354	DQB1*02:02	0,0945	DRB1*16:02	0,0664
DPB1*14:01	0,0920	DQB1*06:02	0,0863	DRB1*14:02	0,0652
DPB1*01:01	0,0781	DQB1*04:02	0,0847	DRB1*03:01	0,0602
DPB1*03:01	0,0573	DQB1*05:01	0,0782	DRB1*04:03	0,0514
DPB1*105:01	0,0260	DQB1*02:01	0,0733	DRB1*04:05	0,0514
DPB1*13:01	0,0243	DQB1*06:03	0,0228	DRB1*15:03	0,0376
DPB1*11:01	0,0208	DQB1*05:03	0,0195	DRB1*13:02	0,0363
DPB1*17:01	0,0191	DQB1*05:02	0,0179	DRB1*11:01	0,0351
DPB1*02:02	0,0156	DQB1*03:03	0,0130	DRB1*08:02	0,0351
DPB1*18:01	0,0139	DQB1*06:04	0,0130	DRB1*15:01	0,0338
DPB1*05:01	0,0122			DRB1*13:01	0,0313
DPB1*10:01	0,0122			DRB1*01:02	0,0276
				DRB1*14:01	0,0238
				DRB1*04:01	0,0175
				DRB1*09:01	0,0163
				DRB1*04:11	0,0163
				DRB1*11:02	0,0163
				DRB1*04:04	0,0150
				DRB1*10:01	0,0150
				DRB1*16:01	0,0138
				DRB1*11:04	0,0138
				DRB1*03:02	0,0125
				DRB1*01:01	0,0113
				DRB1*12:01	0,0100
				DRB1*13:03	0,0100

que utiliza la frecuencia de antígenos HLA de la población panameña, en sustitución del Panel Reactivo de anticuerpos (PRA) que utiliza la frecuencia de alelos de otra población que no es la panameña [15].

Para conocer el valor cPRA de los receptores sensibilizados en lista de espera, hemos determinado la frecuencia de antígenos HLA -A, -B, -C, -. DRB1, -DQB1, -DQA1, DPB1, DPA1. B3, B4, B5 del sistema HLA en la población panameña general, lo cual suministra un valor más exacto del Panel Reactivo de Anticuerpos en nuestra población panameña y la probabilidad exacta de un receptor sensibilizado de obtener donantes deseables y compatibles.

El Sistema obtiene el cPRA utilizando los valores de frecuencia de los antígenos no aceptables en los donantes presentes en el área geográfica del paciente. Para determinar el valor cPRA utilizamos los

estudios de frecuencias de antígenos HLA de la población panameña en más de 8000 personas [15].

Al actualizar los antígenos no aceptables por un paciente sensibilizado, el sistema automáticamente calcula el valor cPRA y concede categoría de urgente al receptor en la selección, cuando el valor es mayor de 80% . El cPRA utiliza la fórmula del Sistema Computarizado UNet (<http://optn.transplant.hrsa/resources/allocation-calculators/>), en el cual se introducen los antígenos no deseables del candidato.

Si se adiciona a los pacientes sensibilizados nuevos alelos HLA no aceptables, debido a nuevas sensibilizaciones que son estudiadas cada tres meses, el valor cPRA es automáticamente recalculado.

Todo centro debe establecer su propio criterio para

antígenos no deseables lo cual puede introducir nuevos factores como incompatibilidades debidas a reactividad cruzada. Este criterio puede reflejar si hay contraindicación para el trasplante de este candidato.

Este nuevo cálculo es representativo de la medida de sensibilización, no sólo debido al uso de frecuencia de HLA más actualizado y específico para la sensibilización de HLA Clase I y II, y también expresa el nivel de oportunidad del receptor sensibilizado y la probabilidad de existencia de donantes deseables en la población étnica a la cual pertenece y de donde proceden los donantes [16,17,18].

La determinación de la frecuencia de antígenos HLA en la población panameña ha demostrado que el cPRA es más exacto que el PRA, y se aumenta la probabilidad de trasplante a los pacientes hiper sensibilizados ya que tienen antígenos comunes con la población del donante fallecido y aumentan el valor, lo que les permite tener categoría de urgentes cuando el panel cPRA es mayor de 80% [15].

En la lista de espera de pacientes renales de donante fallecido se encontró que el nivel cPRA de los 22 pacientes sensibilizados anti HLA Clase I ES: 9 pacientes (40.9%) tienen nivel cPRA menor de 10; 8 pacientes (36.3%) con cPRA entre 11-30; 4 pacientes (18.2%) con cPRA de 31-50 ; ningún paciente presento cPRA ente 51-79; 1 paciente con cPRA mayor de 80.

El nivel cPRA de los 21 pacientes sensibilizados anti HLA Clase II, 7 pacientes (33.3%) tienen nivel cPRA menor de 10; 5 pacientes (23.8%) con cPRA entre 11-30; 6 pacientes (28.6%) con cPRA de 31-50; 2 pacientes con cPRA entre 51-79; 1 paciente con cPRA mayor de 80. En los 22 pacientes sensibilizados con anti HLA Clase I y en los 21 de Clase II, fue posible identificar los anticuerpos específicos para los cuales los antígenos HLA de los donantes son no deseables para los receptores sensibilizados.

Adicionalmente a todos los receptores sensibilizados fue posible conocer los determinantes antigénicos constituidos por núcleos de aminoácidos que reconoce los anticuerpos y sus correspondientes epítomos HLA de reactividad cruzada que son no deseables. (Ver tabla No 4)

Aproximadamente un 14.2% de los pacientes en lista de espera tiene un cPRA mayor de 50, lo que les reduce la posibilidad de encontrar un donante con antígenos deseables.

El estudio confirma la existencia de núcleos de aminoácidos que forman parte de los determinantes antigénicos que reconoce el anticuerpo y que por reactividad cruzada están presente en otros antígenos, lo que aumenta el nivel cPRA, determinado por la Prueba Cruzada Virtual.

Tabla 4. Nivel cPRA en pacientes sensibilizados en espera (noviembre 2021)

Nivel de cPRA	Anti -Clase I	%	Anti -Clase II	%
<10	9	40,9	7	33,3
11 -- 30	8	36,3	5	23,8
31-50	4	18,2	6	28,6
51-79	0	0	2	9,5
>80	1	4,5	1	4,7
Total	22	100	21	100

El estudio confirma la importancia del nivel cPRA como medida de sensibilización a los antígenos HLA, basado en la frecuencia de antígenos en la población panameña, ya que brinda un resultado real de la probabilidad del receptor de encontrar un receptor compatible.

Al otorgar la categoría de urgente, el paciente con cPRA mayor de 80 será excluido inicialmente por la incompatibilidad ABO y la Prueba Cruzada Virtual positiva, y al no presentarse estas condiciones será considerado como posible receptor para efectuar la Prueba Cruzada Real ante todo donante fallecido, lo cual aumenta sus probabilidades de ser trasplantado.

La selección de receptores se efectúa tomando en base la compatibilidad ABO y el puntaje de desigualdades lo cual reduce las posibilidades de los pacientes con cPRA mayor de 80.

11. Prueba cruzada virtual. El concepto de que los anticuerpos HLA son específicos para epítomos más que para antígenos es importante, no solo para la determinación de la aceptabilidad de las incompatibilidades para pacientes sensibilizados, sino también para el mejor entendimiento de la respuesta de anticuerpos a la incompatibilidad HLA.

Hemos participado en el 16th International HLA and Immunogenetics Workshop HHW que ha desarrollado un sitio del Registro de Epítomos verificados de los anticuerpos. La notación de epítomos está basada en el modelo molecular de residuos de aminoácidos en posiciones de secuencia polimórficas [13].

Hoy conocemos que las moléculas de antígenos HLA poseen en su estructura molecular determinantes antigénicos o epítomos que pueden ser lineales o conformacionales y pueden ser únicos para un antígeno y ser reconocidos por un anticuerpo específico para esa tripleta de secuencia de aminoácidos del epítomo sencillo. Esta tripleta puede ser compartida por otros antígenos HLA formando epítomos comunes y ser reconocidos mediante reactividad cruzada por los anticuerpos [19].

Este innovador concepto de reactividad de anticuerpos contra los determinantes y no contra los antígenos HLA es la base la introducir la tecnología de Prueba Cruzada Virtual en el algoritmo de selección en el Laboratorio Nacional de Trasplante [20].

Se ha incorporado obligatoriamente el Programa de Prueba Cruzada Virtual basado en las tripletas de aminoácidos de los determinantes antigénicos que reconocen los anticuerpos presentes en el receptor contra los epítomos de los donantes y en presencia de una Prueba Cruzada Virtual negativa, son considerados para trasplante para luego efectuar la Prueba Cruzada Real [21].

Este Registro Estudia la estructura de los núcleos de amino ácidos de los determinantes antigénicos que reconoce el anticuerpo específico anti donante en el receptor y que especifica, por reactividad cruzada otros antígenos que comparten estos determinantes no deseables por el receptor. Para cada epítomo, el sitio web muestra la composición de aminoácidos y los alelos que comparten estos epítomos [22].

La prueba Cruzada Virtual utiliza el Registro de Epítomos que aparece en el Programa <http://epregistry.ufpi.br/index/databases/databse/ABC/DRB, DQB+DQA/DPB/DPA> y que nos brinda la posición de la triplete de amino ácidos que reconoce el anticuerpos y que está presente en el polimorfismo de los diferentes antígenos., indicando los alelos que tiene presente esta triplete de aminoácidos y que pueden ser reconocidos por el anticuerpos y producir rechazo humoral.

En el procedimiento de Prueba Cruzada Virtual, se incluye el anticuerpo HLA específico que tiene el receptor a nivel alélico (dos dígitos), su tipificación HLA (Ej. HLA-A, -B,C), DRB1/3/4/5, DQ, DP ya que no forma anticuerpos contra antígenos autólogos y buscamos la reactividad de ese anticuerpo contra todo el polimorfismo HLA existente en la nomenclatura HLA.

Esta Prueba Cruzada Virtual está basada en un Programa informático denominado HLA "Matchmaker" que es un algoritmo que considera a los alelos HLA como grupos de distintas configuraciones moleculares que pueden ser reconocidas por los anticuerpos importantes en trasplante.

Es el único algoritmo basado en los epítomos de los anticuerpos verificados experimentalmente definido por aminoácidos polimórficos en configuraciones denominadas determinantes antigénicos.

El Programa HLA Matchmaker es una herramienta útil para determinar la aceptabilidad de las incompatibilidades basadas en triplete de aminoácidos para los pacientes sensibilizados considerados para trasplante. La ausencia de núcleos de aminoácidos reconocidos por el anticuerpo reduce la alo sensibilización y mejora el éxito del trasplante.

12.La prueba cruzada real. Una vez eliminados los receptores que tiene prueba cruzada virtual positiva con los determinantes antigénicos de los anticuerpos con MFI mayor de 1000, se procede a efectuar la Prueba Cruzada Real donante específico, utilizando el suero mensual conservado a -86°C de los pacientes preseleccionados por el PROGRAMA SELECTOR.

Para efectuar la Prueba Cruzada Real pre-trasplante se incluyen todos los pacientes sensibilizados con cPRA mayor de 80% que cumplen con el criterio de urgente y los diez primeros receptores de la lista de espera con el mayor grado de compatibilidad con el donante y que su prueba cruzada virtual sea negativa, por lo cual preseleccionamos normalmente a quince receptores de la lista de espera

Los linfocitos del donante aislados de sangre periférica se utilizan como material de origen de moléculas HLA. Las células aisladas se solubilizan con un detergente iónico, luego centrifugación para eliminar los restos y fragmentos celulares, y el lisado conteniendo glicoproteínas HLA se puede usar de inmediato o guardarse congelado para uso futuro.

La prueba cruzada real incluye mezcla de microesferas Luminex, que se conjugan con anticuerpos monoclonales específicos de HLA de Clase I o HLA de Clase II. Mezcladas con el lisado de glicoproteínas HLA, estas dos microesferas capturan el HLA solubilizado generando un blanco de glicoproteínas HLA específico del donante para los anticuerpos de una muestra de suero del receptor. La mezcla también incluye microesferas de control para conocer y vigilar la cantidad de fondo del ensayo y asegurarse de que se ha utilizado el conjugado adecuado en el ensayo.

Tras la captura de las glicoproteínas HLA se transfieren a una placa de filtrado y se lavan, se añade suero diluido en el diluyente de la muestra y se incuba con las microesferas. Se añade el conjugado diluido de ficoeritrina anti-IgG humana. Tras una incubación final, se añade el tampón de lavado, se coloca la placa en el instrumento Luminex y se obtienen los datos para su análisis. (Takemoto [4])

13. Conservación de suero del receptor y glicoproteínas HLA del donante para estudios prospectivos. El Laboratorio conserva el suero del receptor seleccionado para trasplante y utilizado en la prueba cruzada real negativa previo al trasplante, con el objetivo de utilizar este suero en el futuro para comparar su valor MFI pre-trasplante, con otra prueba cruzada prospectiva solicitada por el médico después del trasplante, si presenta episodios de rechazo humoral.

Adicionalmente el laboratorio conserva múltiples alícuotas de las moléculas de glicoproteínas HLA Clase I y Clase II del donante en congelación, como su representación genética, para ser utilizada prospectivamente ante una solicitud de efectuar nueva prueba

cruzada real, si el paciente presenta síntomas de rechazo humoral. Lo anterior nos permite conocer si hay cambio de valor MFI de la prueba cruzada real negativa antes del trasplante y una prueba cruzada real específica después del trasplante. Presencia de una prueba cruzada real positiva post trasplante en comparación con la negativa pre-trasplante es indicativa de rechazo humoral debido a anticuerpos anti-HLA de novo.

Si el médico decide efectuar un proceso de desensibilización HLA post-trasplante ante presencia de anticuerpos anti-HLA donante específico, el poseer alícuotas conservadas que representan las moléculas de glicoproteínas HLA del donante, facilita efectuar prospectivamente la prueba cruzada real donante específica y conocer el valor de disminución del valor MFI del anticuerpo presente en el receptor sometido a proceso de desensibilización.

CONCLUSIONES

1. El valor del nivel cPRA que utiliza la frecuencia de genes HLA de la población panameña brinda un valor exacto del grado de sensibilización de receptores en lista de espera.
2. Los receptores en lista de espera con cPRA mayor de 80 permanecen mayor tiempo en lista de espera y su posibilidad de ser trasplantado aumenta al ser declarados urgentes.
3. La Prueba Cruzada Virtual nos permite conocer los determinantes antigénicos que reconocen los anticuerpos específicos del receptor y ofrece el listado de antígenos no deseables en los donantes, incluyendo los de reactividad cruzada.
4. Un 28.4% de los pacientes en lista de espera están sensibilizados y de estos 2 pacientes tienen un cPRA mayor de 80.
5. El uso de cPRA y la Prueba Cruzada Virtual mejoran la probabilidad del paciente con alta sensibilización de ser trasplantados.
6. El algoritmo del Laboratorio Nacional de Trasplante al incorporar innovadoras tecnologías garantiza la mejor compatibilidad en la selección, disminuye el rechazo humoral y brinda oportunidades de trasplante a pacientes altamente sensibilizados.

REFERENCIAS

- [1] Patel R., Terasaki PL. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280:735-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM196904032801401> URL:<https://doi.org/10.1056/NEJM196904032801401>
- [2] McKenna RM., Takemoto SK., Terasaki PL. Anti HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 2000; 69:319-326. URL:<https://doi.org/10.1097/00007890-200002150-00001>
- [3] Susal C., Opelz G. Impact of HLA matching and HLA antibodies in organ transplantation. A collaborative transplant study view. *Methods Mol. Biol.* 2012; 882: 267-77. URL:https://doi.org/10.1007/978-1-61779-842-9_15
- [4] Sumitran Helgerson S. HLA specific antibodies and renal allograft outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2001, 10: 897-904. URL:<https://doi.org/10.1093/ndt/16.5.897>
- [5] Cecka J., Zhang R., Reed F. Preformed cytotoxic antibodies in potential allograft recipients' recent data. *Human Immunol* 2005; 4:343-9. URL:<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2005.01.030>
- [6] Yang J., Schael C., Smith D, et al. Sensitization in pediatric pre-transplant cardiac patients supported by mechanical assist devices: the utility of Luminex. *Heart Lung Transplant* 2009; 28:123-9 URL:<https://doi.org/10.1016/j.healun.2008.11.908>
- [7] Lee PC, Ozawa M, Hung CJ, et al. Reappraisal of the HLA antibody analysis and crossmatching in kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2009; 41:95-9. URL:<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.074>
- [8] Muro M., Llorente S., Marin L., et al. Acute vascular rejections mediated by HLA antibodies in a cadaveric kidney recipient; discrepancies between Flow RRA, ELISA, and CDC vs Luminex screening. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 20:223-6 URL:<https://doi.org/10.1093/ndt/gfh527>
- [9] Jung S., Oh E.J., Yang CW. et al. Comparative evaluation of ELISA and Luminex Panel Reactive Antibody assay for HLA alloantibody screening. *Korean J Lab Med.* 2009; 29:423-480. URL:<https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.5.473>
- [10] Howell WM., Carter V., Clark B. The HLA System Immunobiology. HLA typing antibody screening and crossmatching techniques. *J Clin Pathol* 2010; 63:390. URL:<https://doi.org/10.1136/jcp.2009.072371>
- [11] Cecka JM., Kucheryavaya AV, Reinsmoen NL., Leffell MS. Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and reduction in positive crossmatches. *Am. J. Transplant* 2011; 11:719-724. URL:<https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03340>
- [12] Cecka JM. Calculated PRA (cPRA) the new measure of sensitization for transplant candidates. *Am J Transplant* 2012;1026-29
- [13] Duquesnoy R, Marrari M, et al. Workshop report a website for the antibody defined HLA epitope registry. *International Journal for Immunogenetics* 2012;0:1-6.
- [14] Marrari M., Muistecki J., Mulder a, et al. Human monoclonal Antibody reactivity with HLA Class I. epitopos defined by pairs of mismatched Eplets and Self Eplets. *Transplantation* 2012; 90: 1468-72. URL:<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182007b74>
- [15] Llanes A, Vernaza A, et al. Allele and frequencies in the Panamanian Population. <http://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.11.006>
- [16] Cherikh W. Variability of PRA levels and reporting of unacceptable antigens among transplant centers.

- Report to the Histocompatibility Committee on January 2006 of an analysis of OPTN/UNOS data.
- [17] Zachary AA and Braun WE. Calculation of a predictive value for 71: 268-273.
- [18] Lefell MS, Kaplan I, Zachary AA. The probability of a positive crossmatch is a more accurate measure of sensitization and benefits minorities. Abstract 766. World Transplant Congress 2006. Blackwell Publishing Malden, MA, page 325. URL:<https://doi.org/10.1097/00007890-200607152-00766>
- [19] Duquesnoy RJ. Humoral autoimmunity in transplantation: relevance of HLA epitopo antigenicity and immunogenicity. *Front Immunology* 2011; 2, 59. URL:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00059>
- [20] Meneses GP, Melo R, et al. An online data base of predicted three-dimensional structure of HLA molecules. *Human Immunol* <https://doi.org/10-1016/Humimm> 2019, 06, 009.
- [21] Morris GP, Phelan D, Jemdrisak M, et al. Virtual crossmatch identification of donor specific anti-human leukocyte antigen antibody by solid-phase immunoassay: a 30-month analysis in living donor kidney transplantation. *Human Immunology* 2010; URL:<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.01.003>