

TRASPLANTE RENAL DE DONANTE VIVO
ASPECTOS ORGANIZATIVOS DE LA DONACION
INDICACIONES Y ESTUDIOS INMUNOLOGICOS DE LA
PAREJA DONANTE- RECEPTOR

TESINA DE CONCLUSION DEL MASTER ALIANZA 2012

AUTOR: Dr. FRANKLIN EDUARDO GOMEZ APARICIO

TUTOR: Dr. VICTOR SAGREDO

COMPLEJO ASISTENCIAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA

INTRODUCCION

El trasplante renal de donante vivo es la alternativa terapéutica que ofrece mejores resultados de supervivencia en el tratamiento de la insuficiencia renal crónica. El empleo de personas vivas para la donación de vivo debe fundamentarse en unos sólidos principios éticos, como son el altruismo, la ausencia de coerción o compensación monetaria, la autonomía de la persona en la toma de decisiones, la beneficencia y la no maledicencia.

Este objetivo ha de lograrse concretando en nuestros centros asistenciales los protocolos de donación con todas las garantías organizativas de su funcionamiento, facilitando la formación de los profesionales y la información a los pacientes y a sus familiares. Asimismo, la donación renal de vivo ha de sustentarse en todo momento en la garantía de la protección del donante vivo y ello implica la generación de la mayor de las evidencias en la seguridad para el donante a corto, medio y largo plazo, y el desarrollo de iniciativas orientadas a promover este tipo de donación.

En Honduras se han realizado 32 trasplantes renales en adultos desde 1997, los cuales tuvieron su inicio en hospitales privados, en vista de las limitaciones del sistema de salud público. En el Hospital Escuela (Hospital de Referencia del sector público), el primer trasplante renal se realizó en agosto del 2007, en el 2010 se realizaron 9 trasplantes y en el 2011 hubieron apenas 3 trasplantes, esto se debe a la falta de una estructura Hospitalaria en cuanto a los recursos necesarios para el estudio inmunológico de la pareja donante-receptor, por no contar con un laboratorio de Histocompatibilidad, falta de quirófanos diseñados para tal finalidad y el coste de los inmunosupresores.

Los estudios de Histocompatibilidad que se necesitan en Honduras para el trasplante renal se realizan en países vecinos como: Guatemala, Panamá, Costa Rica, Estados Unidos y México, lo que genera mayores costes y retraso en la ejecución de los mismos.

El objetivo del estudio inmunológico consiste en evaluar el riesgo de pérdida del injerto, debiendo identificarse en el receptor los aloanticuerpos donante-específicos y determinarse las incompatibilidades HLA entre receptor y donante. Para determinar los aloanticuerpos existen diferentes métodos que tienen diferente sensibilidad y diferente valor pronóstico, unos determinan un alto riesgo de rechazo hiperagudo y otros un aumento en el riesgo de pérdida de injerto en retrasplantes.

La intención de esta tesina se basa en el abordaje organizativo del Trasplante Renal y los estudios de Histocompatibilidad empleados en el sistema Español para la realización de los mismos, modelo que será un aporte significativo en el trasplante de riñón en nuestro país.

TRASPLANTE RENAL DE DONANTE VIVO

En los últimos 20 años el trasplante renal de donante vivo es el mejor tratamiento sustitutivo de la insuficiencia renal terminal, el que proporciona mejor calidad de vida y se ha posicionado como el mejor tratamiento en cuanto a supervivencia, menores complicaciones y mejor relación coste-beneficio frente a la diálisis, existe un largo camino por recorrer hasta que, de manera rutinaria, se ofrezca el trasplante renal de vivo como una alternativa terapéutica más a este tipo de pacientes. Los datos del *Organ Procurement Transplant Network* demuestran que la supervivencia del injerto renal a 5 años es del 79,7% para los receptores de donante vivo frente al 66,5% para los de donante fallecido y la supervivencia del paciente a 5 años del 90,1% frente al 81,9%⁸.

El receptor suele ser más joven y presentar mejor compatibilidad HLA con su donante, pues es frecuente la relación genética entre ambos. El donante, sometido a un estudio extenso antes de su aceptación, presenta un excelente estado de salud, con menos patología asociada que la observada evidentemente en el caso del donante fallecido.

Asimismo, al tratarse de una cirugía programada, existe la posibilidad de tratamiento inmunosupresor anticipado en el receptor y el tiempo de isquemia fría a la que se somete al órgano es inferior que en el caso de la donación de personas fallecidas y se realiza de manera anticipada, antes de la entrada en diálisis del paciente, lo que se ha identificado de manera reiterada como factor negativamente asociado tanto a la supervivencia del injerto como a la del paciente, con independencia de la etiología de la insuficiencia renal crónica, y constituyendo ese límite de 6 meses en tratamiento sustitutivo el punto a partir del cual se observa un impacto negativo.

La realización de una nefrectomía en una persona sana no es inocua, si bien es cierto que el riesgo asumido se considera bajo a día de hoy. De este modo, el riesgo de mortalidad inmediata asociada al proceso de la donación renal de vivo se estima en un 0,03%. También la probabilidad de sufrir complicaciones a corto plazo, como el sangrado o la infección, es bajo, si bien varía en función del procedimiento utilizado para la realización de la nefrectomía en el donante (oscilando entre un 0,6% y un 14%). En este sentido, la incorporación de la nefrectomía laparoscópica ha supuesto una mejora considerable en el postoperatorio inmediato del donante, con un más rápido restablecimiento y reincorporación a la vida social y laboral. A largo plazo, la mortalidad vinculada a la donación de vivo no parece superior que la de la población general ajustada por edad y comorbilidad asociada.

La posibilidad de trasplante Renal de Vivo (TR) obtiene más ventajas si es anticipado con un aclaramiento de creatinina (Ccr) 10-20 ml/min, no acceso vascular, no inicio TRS, mejor supervivencia paciente e injerto, ventajas psicológicas del receptor y donante y si el receptor en está en diálisis, cuanto antes, mejor.

TIPOS DE TRASPLANTE RENAL (T.R.) DE DONANTE VIVO

La Donación directa entre individuos genéticamente relacionados (71%), Familiar no genéticamente relacionado (27%) y entre individuos emocionalmente relacionados (2%)

La Donación indirecta: Donación cruzada: intercambio de riñones entre parejas compatibles, Intercambio con lista de donante cadáver, Donante samaritano y Donante retribuido (Comercio ilegal)

CONDICIONES BÁSICAS

Bajo riesgo para el donante

Donante completamente informado, Decisión voluntaria y desinteresada, con altas probabilidades de éxito para el receptor y la NO compensación económica

JUSTIFICACIÓN DEL T.R. DE DONANTE VIVO (VENTAJAS)

Ausencia de fenómenos asociados a la muerte cerebral

Estudio más exhaustivo al donante

El donante vivo suele tener menos patología asociada

Tiempo de isquemia fría menor

Posible mejor compatibilidad HLA

Posibilidad de programar la extracción y el trasplante

Inmunosupresión anticipada del receptor. Regímenes menos agresivos.

Posibilidad de trasplante anticipado

Reducción del tiempo de espera y el número de receptores en lista de espera de donante de cadáver

Mejores resultados a corto y largo plazo. Mayor supervivencia del paciente y del injerto comparado con donante cadáver

Descubrimiento de patología tratable en el donante

Beneficio psicológico en el donante

Beneficio económico a medio y largo plazo

DIFERENCIAS CON EL T.R. DE DONANTE CADÁVER

- 1.- Posibilidad de iniciar inmunosupresión unos días antes del trasplante.
- 2.- Gran diferencia en tiempo de isquemia fría (1-2 horas) y de incidencia de NTA
- 3.- En algunos casos gran compatibilidad entre donante y receptor.
- 4.- Ausencia de fenómenos intrínsecos a la muerte cerebral
- 5.- Edad media de donante y receptor inferior a donante cadáver
- 6.- En algunos casos gran diferencia de edad entre donante y receptor
- 7.- Estudio inmunológico más detallado.
- 8.- Donante bien estudiado y con muy buen estado de salud

ASPECTOS ECONÓMICOS

Se logra una mayor supervivencia del paciente trasplantado que en diálisis. Los gastos del primer año del trasplante igualan a los gastos en diálisis, pero a partir de ese momento, los gastos/año del paciente trasplantado son significativamente muy inferiores. El trasplante de vivo es a medio y largo plazo más barato que el de cadáver (mejor supervivencia). La cirugía laparoscópica tiene un mayor coste hospitalario, pero menor morbilidad y menor coste social. La disminución de costes nunca debe disminuir la seguridad del donante. El trasplante anticipado es mejor que el no anticipado y mejora la supervivencia del paciente y del injerto, sin el coste de la diálisis.

ASPECTOS ORGANIZATIVOS DE LA DONACION

Los equipos de coordinación hospitalaria deben adecuarse a las necesidades de coordinación de cada hospital. Asimismo, deben establecer una muy buena relación con la Dirección del Hospital con el fin de que ésta comprenda la importancia de la donación y del trasplante y así entiendan y asignen los requerimientos humanos y materiales necesarios para cubrir dichas actividades, Se resaltan la **motivación, la entrega y la capacidad de trabajo**, Es conveniente que los componentes del equipo sean personas *resolutivas*, lo que implica *conocimiento*, tanto del entorno hospitalario como de las peculiaridades del proceso de donación, para lo que se requiere amplia formación y actitudes pedagógicas, resaltando dotes de liderazgo, con presencia y disponibilidad para el personal del hospital, siendo de gran ayuda para ello el tener habilidades de comunicación, buena capacidad de relación y empatía.

1. PROMOCIÓN Y DETECCIÓN

Con el objetivo de informar a los pacientes y a sus familiares, se organizan periódicamente sesiones informativas acerca de las diferentes modalidades de trasplante, entre ellas donante vivo. En estas sesiones participan distintos profesionales: nefrólogos, hepatólogos, urólogos, cirujanos hepáticos, el coordinador de trasplantes y, en ocasiones asiste un donante vivo para dar su testimonio y compartir su experiencia con todos los asistentes.

Los asistentes a las sesiones informativas tienen la oportunidad de preguntar y aclarar dudas acerca de su problema concreto. Con frecuencia, a raíz de estas reuniones surgen personas interesadas en recibir más información acerca de la donación de vivo. A partir de aquí, los componentes del equipo de trasplante

correspondiente, renal o hepático y coordinación de trasplantes, personalizan la información e inician el estudio de donante potencial si procede.

2. EVALUACIÓN MÉDICA Y EVALUACIÓN QUIRÚRGICA

Todos los potenciales donantes son evaluados por el equipo médico y quirúrgico con el fin de buscar la mejor compatibilidad entre donante y receptor, la idoneidad del estado de salud del donante y descartar riesgos derivados de la donación que contraindiquen su aceptación como donante.

3. EVALUACIÓN DE COORDINACIÓN DE TRASPLANTES

Durante el proceso de la donación de vivo, el coordinador de trasplantes es el encargado de explicar al donante todos los pasos y trámites que deben de seguirse, a la vez que presentarse como referente de las siguientes etapas del proceso: realizar la evaluación médica del riesgo biológico del donante, valorar socialmente al donante, valorar el posible impacto económico de la donación (baja laboral, pérdidas económicas), constatar que se trata de una donación altruista, obtener el consentimiento informado, presentar el caso al Comité de Ética del hospital, gestionar el procedimiento del Registro Civil, realizar un seguimiento de la extracción y el trasplante, al igual que un seguimiento del donante.

3.1. Valoración ética y social

3.2. Firma del consentimiento informado

4. PROGRAMACIÓN

4.1. Comité de Ética

4.2. Procedimiento del registro Civil

5. EXTRACCIÓN Y TRASPLANTE

6. SEGUIMIENTO DEL DONANTE

DONANTE VIVO DE RIÑÓN

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DONANTE VIVO DE RIÑÓN

Donante realmente motivado, con poco riesgo, y grandes probabilidades de éxito para el receptor y con edad del donante > 18 años (preferible >30 y < 70 años, con diferencia de edad del receptor no mayor de 10 años), preferible inicialmente padres y reservar hermanos o cónyuge para el futuro .El principio fundamental que debe primar siempre en la extracción renal de donante vivo, es que el donante siempre debe quedarse con el mejor riñón. El hallazgo de anomalías renales, de vasos o vías, en el donante potencial, deben ser valorados cuidadosamente a fin de evitar riesgos innecesarios en él. El método elegido para la obtención del riñón dependerá de la experiencia quirúrgica del equipo de extracción y trasplante.

ESTUDIOS DEL POTENCIAL DONANTE

Hª Clínica completa y exhaustiva.

Grupo Sanguíneo.

Tipaje HLA y Cross-match.

Laboratorio: Hemograma, coagulación, función renal, proteinuria de 24 hª

Microalbuminuria, función hepática, glucemia, Hb glicosilada, ionograma Completo, úrico, lípidos, proteinograma, sedimento urinario, Marcadores tumorales (PSA, otros) y cultivo de orina.

Serología: HIV, Hepatitis B y C, CMV, E-BV, toxoplasmosis.

ECG

RX Tórax, y Abdomen.

Ecografía Abdominal.

ÁNGIO-TAC con fase excretora (para reconstrucción de vías urinarias)

Valoración Cardiológica.

Valoración Ginecológica: si es mujer. Citología, y Mamografía.

Consulta de Nefrología: (inicial y final)

Consulta de Urología.

Consulta de Anestesia.

Consulta de Psicología.

Consulta de Psiquiatría.

Reunión Clínica Conjunta : Nefrología, Urología ,Inmunología Anestesiología ,
Psicología , Psiquiatría y Coordinación de Trasplantes, Certificado de Salud
física/ mental : (realizado por un Nefrólogo no relacionado con el TX)

Comité de Ética: Informe con VºBº.

Presentación de Informe: Al juzgado

Los objetivos de la evaluación son para garantizar un estado de salud óptimo del donante (riesgos) e identificar contraindicaciones absolutas y relativas. Las consecuencias para el donante en cuanto a mortalidad perioperatoria es de 0.03-0.06% con una supervivencia a largo plazo superior a la población general y una morbilidad perioperatoria global 32%, y grave del 2%.

Los riesgos de vivir con un solo riñón con la posible incidencia de trauma, tumor, infección, litiasis, y la probabilidad de sufrir insuficiencia renal postrasplante. El riñón remanente se hace progresivamente compensador (basal 103 ml/min, 1 mes 72, 6 meses 78, 1 año 75); a 25 años los donantes no tienen más IR que la población general, con menor riesgo de necesidad de diálisis que la población general.

CONTRAINDICACIONES ABSOLUTAS A LA DONACIÓN: Neoplasia maligna, Infección por HIV, Embarazo, Incompetencia intelectual, Evidencia de coacción, Abuso de drogas iv, Edad < 18 años, Enfermedad cardiorrespiratoria mayor, Enfermedad renal y Enfermedad sistémica con posible afectación renal.

CONTRAINDICACIONES RELATIVAS A LA DONACIÓN: Deterioro intelectual, Enfermedad psiquiátrica, Edad avanzada, Obesidad, Diabetes mellitus, Hipertensión arterial, Síndrome metabólico, Anomalías en vías urinarias, Infecciones crónicas activas (TB, hepatitis B y C, parasitosis) y Tabaquismo.

LIMITACIONES PARA LA DONACIÓN (PROBLEMAS RENALES): Filtrado glomerular, Proteinuria, Piuria, Microhematuria, Anomalías de la vía urinaria, Anomalías de la vascularización renal y Nefrolitiasis

RECEPTOR DE TRASPLANTE RENAL DE DONTE VIVO

ESTUDIOS DEL RECEPTOR:

Hª Clínica completa y exhaustiva del receptor.

Grupo Sanguíneo.

Tipaje HLA y Cross-match.

Laboratorio : Hemograma, coagulación ,función renal (si procede) proteinuria de 24 h^a (si procede) , función hepática ,glucemia , Hb glicosilada, Ionograma Completo ,úrico , lípidos, proteinograma , sedimento urinario (si procede) , cultivo de orina (si procede) y Marcadores Tumorales (PSA , Otros)
Serología: HIV, Hepatitis B y C, CMV, EBV, toxoplasmosis

ECG , RX, Tórax, y Abdomen

Ecografía Abdominal, ANGIO-TAC. Con fase excretora (para reconstrucción de vías urinarias), CUMS

Valoración Cardiológica

Valoración Ginecológica: (si procede)

Consulta de Nefrología: (inicial y final)

Consulta de Urología

Consulta de Anestesia

Reunión Clínica Conjunta: Nefrología, Urología, Inmunología

Anestesiología, Psicología, Psiquiatría y Coordinación de Trasplantes.

GRUPOS SANGUINEOS Y TRASPLANTE

Desde el punto de vista genético su compatibilidad es mucho menos importante que la del HLA, puede conducir a un rechazo hiperagudo por la existencia de anticuerpos anti-A o anti-B preformados en el receptor, pero su incompatibilidad es vista como una contraindicación relativa al trasplante ya que existe tratamiento inmunosupresor capaz de superarla, dependiendo del grado de incompatibilidad existente. Por tanto debemos intentar realizar los trasplantes, con el mayor número posible de identidades antigénicas HLA, disponiendo para ello la posibilidad de realizar el tipaje HLA, tanto a los pacientes como a los donantes de órganos, permitiéndonos así seleccionar aquellos receptores que mejor compatibilidad presente.

Factor Rh.: A diferencia del sistema ABO, el factor Rh tiene escasos efectos en la respuesta inmunológica, por lo que no constituye una contraindicación absoluta; sin embargo se ha observado que la supervivencia después del trasplante disminuye en un 13% en receptores Rh (-).

Grupos Lewis a y b: Se ha observado que su incompatibilidad no contraindica el trasplante, pero hay un 8% menos de supervivencia del injerto cuando el receptor es Lewis (-).

La selección basada en los grupos sanguíneos cumple las mismas reglas de la transfusión sanguínea y a través de esto se evita las reacciones de rechazo hiperagudas.

Regla:

Donante:	A	B	O
Receptor:	A, AB	B, AB	A, B, AB, O

PROTOCOLO INMUNOLÓGICO EN EL TRASPLANTE RENAL

Entre los factores de riesgo inmunológicos que se han sugerido para la mala evolución del trasplante renal estarían, la incompatibilidad HLA, la subóptima inmunosupresión, anticuerpos citotóxicos elevados, retrasplante y aparición de rechazo agudo. Entre los factores de riesgo no inmunológicos tendríamos, la raza, edad y sexo del donante, el *status* del donante (tiempo de isquemia), hipertrigliceridemia, hipertensión arterial e infección por CMV.

La consecuencia directa de trasplantar un paciente con anticuerpos anti-HLA frente al donante sería un rechazo hiperagudo, por lo tanto, la identificación correcta de la especificidad frente a la que reacciona un individuo y la realización de la prueba cruzada pretrasplante es clave. Los estudios actuales van dirigidos a la generación de anticuerpos post-trasplante como medidores del rechazo vascular acelerado cortico-resistente y del rechazo crónico del aloinjerto. La determinación de C4d en la biopsia renal es sinónimo de rechazo mediado por anticuerpos.

Para trasplante de donante vivo se deben de tipar todos los miembros de la familia para identificar los haplotipos correspondientes.

TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR HLA EN TRASPLANTE

Es necesario obtener el tipaje del receptor, determinando la especificidad HLA-A, -B, y -DR. Dicho tipaje debe ser fiable, incluyendo técnicas de biología molecular si fuese necesario.

Los posibles donantes también serán tipados para los mismos antígenos HLA (-A, -B y -DR) antes de proceder al trasplante.

TÉCNICAS DE TIPAJE POR SEROLOGÍA

La técnica elegida es la microlinfo–Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC) convencional, es una técnica óptima para distinguir especificidades de clase I y II, en placas de Terasaki, usando colorantes vitales para distinguir la reacción. Con las muestras se procede a la extracción de linfocitos viables para las determinaciones serológicas y de pruebas cruzadas. Es importante hacer recuento celular, para comprobar la viabilidad de la muestra y ajustar la concentración celular.

Fundamento: Este método se basa en el empleo de anticuerpos específicos contra diferentes alelos del HLA (moléculas de clase I y de clase II). Cuando estos anticuerpos reconocen al antígeno contra el cual son específicos, y en presencia de complemento, se produce la lisis celular. El ensayo se realiza en placas plásticas de 60 fosas denominadas placas de Terasaki y la muerte celular se cuantifica mediante una tinción diferencial de células viables y muertas.

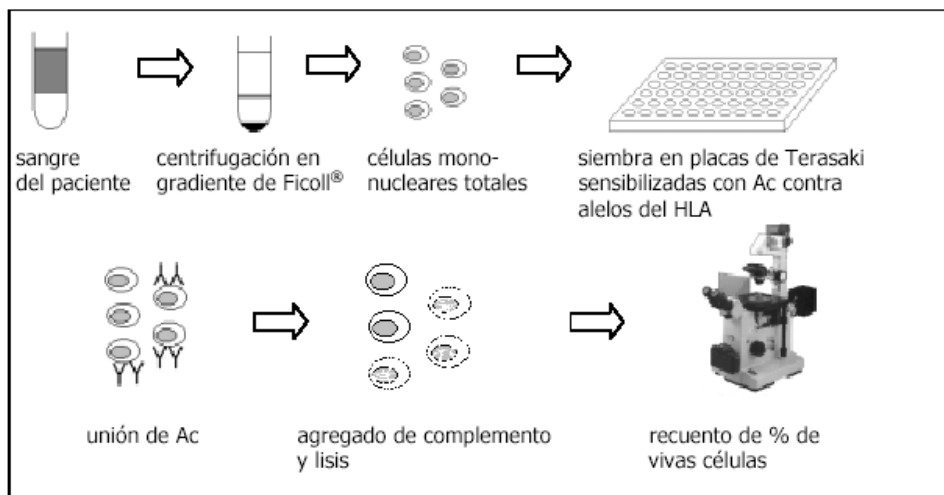
Para determinar si las células están lisadas (reacción positiva) o vivas (reacción negativa) se añaden dos fluorocromos que se intercalan en el DNA de las células: bromuro de etidio (BE), que penetra sólo en las células muertas y emite fluorescencia roja, y el naranja de acridina (NA), que penetra en todas las células y emite fluorescencia verde. Al observar los pocillos con un microscopio de fluorescencia invertido, se podrá determinar en cada uno de ellos si las células están vivas (FL verde) y por tanto reacción negativa, o lisadas (FL roja que enmascara a la FL verde) y por tanto reacción positiva.

Etapas:

1. Extracción de sangre del paciente

2. Aislamiento de células mononucleares (centrifugación en gradiente de Ficoll®)
3. Siembra de células en fosas de placas de Terasaki previamente sensibilizadas con sueros policlonales contra diferentes alelos del HLA.
4. Incubación (unión de los Ac a las moléculas de clase I o de clase II del HLA)
5. Agregado de fuente de complemento (suero de conejo)
6. Incubación y lisis de células que unieron Ac en la etapa anterior
7. Agregado de un colorante de contraste para diferenciación de células vivas y muertas (diacetato de fluoresceína)
8. Observación microscópica y clasificación.

Esquema general de la técnica



Al leer los pocillos al microscopio se asigna a cada uno una "puntuación" de acuerdo con el siguiente criterio:

% de células lisadas

en el pocillo	Puntuación	Interpretación
0-10	1	Negativo
10-20	2	Negativo dudoso
20-50	4	Positivo débil
50-80	6	Positivo
80-100	8	Positivo fuerte

La ventaja de este procedimiento es que no se necesita utilizar equipos de difícil manejo y calibración para la interpretación de los resultados.

ANTÍGENOS QUE DEBEN SER DETERMINADOS POR SEROLOGÍA

El laboratorio de histocompatibilidad identifica por serología las especificidades HLA-A y -B. En el momento de diseñar las placas que se generen para este propósito, es obligatorio incluir las siguientes especificidades:

1. **Locus A:** 1, 2, 3, 9, 10, 11, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 32, 33.
2. **Locus B:** 5, 7, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 27, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 44, 51, 60.
3. **Locus DR:** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14.

Además, se considerarán como deseables las siguientes especificidades:

1. **Locus A:** 19, 31, 34, 36, 43, 66, 68, 69, 74, 80, 203, 210, 2403.
2. **Locus B:** 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 81, 703, 2708, 3901, 3902, 4005, 5102, 5103, w4, w6.

3. **Locus C:** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10

4. **Locus DR:** 103, 1403, 1404, 15, 16, 17, 18, 51, 52, 53.

5. **DQ locus:** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.

TECNICAS DE TIPAJE MOLECULARES

El tipaje HLA de clase II (HLA-DR y -DQ) y el de clase I, se realiza por técnicas moleculares mediante PCR-SSP (amplificación PCR con primers específicos de secuencia) y su visualización mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o técnicas de Hibridación a sondas unidas a bolas (beads) que tienen fluorocromos para identificarlas (LUMINEX).

EXTRACCIÓN DE ADN PARA EL TIPAJE HLA POR PCR-SSP O LUMINEX

Extracción del DNA manual con DNAzol o métodos automatizados (MagNa Pure, Maxwell). Una vez obtenido el ADN se realiza espectrofotometría (basado en la capacidad que tiene el ADN para absorber luz de 280 nm de longitud de onda) con valores de aceptación entre 260-280 y ratio de 1.60-1.90 para proceder a realizar PCR.

SSP (Fundamento)

En este método se realiza una reacción de cadena de polimerasa (PCR) utilizando como molde el ADN extraído de células de sangre periférica del paciente. Como oligonucleótidos cebadores ("primers") se emplean combinaciones de oligonucleótidos específicos para diferentes alelos del HLA. De esta manera se logra la amplificación de fragmentos de ADN de diferente longitud. El patrón de fragmentos de ADN obtenido, que se analiza en una electroforesis en gel de agarosa, permite asignar alelos a la muestra analizada.

La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa. Además, si en dicha electroforesis se aplican marcadores de peso molecular (fragmentos de DNA de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del DNA en estudio.

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos...) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos.

Etapas:

1. Extracción de sangre del paciente
2. Aislamiento del ADN
3. Reacción de cadena de polimerasa (PCR) con diferentes combinaciones de "primers"
4. Electroforesis en geles de agarosa conteniendo bromuro de etidio
5. Observación del patrón de bandas de ADN amplificadas en la PCR bajo luz UV
6. Integración de los resultados obtenidos
7. Asignación de alelos a la muestra analizada

Los geles deben cumplir los siguientes criterios:

Cantidad de agarosa o acrilamida adecuada al tamaño

Cantidad de colorante suficiente

Líneas de electroforesis uniformes

Uso de tampón y voltaje correctos.

El método de detección (tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz ultravioleta) es ampliamente conocido, incluyendo su sensibilidad y especificidad. No obstante, su especificidad y sensibilidad se comprueban cada vez que se emplea, al incluir un control (el marcador de peso molecular).

La asignación de alelos se llevará a cabo electrónicamente o por comparación con las tablas del Kit.

LUMINEX

Es un método similar a la citometría convencional, utiliza microesferas recubiertas de moléculas HLA en lugar de células, permite el escrutinio de anticuerpos séricos frente a antígenos HLA con una sensibilidad mayor que el método convencional de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento.

Detecta Ac anti HLA sin necesidad de fijar el complemento. El empleo de fluorescencia (LUMINEX) permite detectar Ac contra HLA tipo I y tipo II.

Esta técnica detecta Ac frente a otros antígenos diferentes al HLA (falsos positivos). Para evitar esto se ha ideado un sistema de microesferas que llevan pegadas moléculas de HLA I y II. Además mediante esta técnica se puede determinar Single –Antigen que utiliza suero del receptor.

También permite determinar el DSA (anticuerpo donante específico) que precisa linfocitos del donante. Durante el análisis se debe disponer de los

umbrales para dar una sonda como positiva o negativa. El software permite asignar esto de forma automática, pero se puede modificar de forma manual.

Los objetivos de la mayoría de las técnicas utilizadas son:

1. Evaluar las incompatibilidades que el receptor va a detectar en las células del donante.
2. Identificar la presencia en un receptor de aloanticuerpos dirigidos contra polimorfismos HLA de posibles donantes.
3. Identificar si los aloanticuerpos del receptor reaccionan contra los polimorfismos expresados en el donante propuesto.
4. Identificar el tipo de inmunoglobulina (IgM o IgG) y la diana (HLA-I, HLA-II, o no HLA).

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CITOTÓXICOS

Si importante es el tipaje HLA, para poder trasplantar a un máximo de identidades, mediante el escrutinio de anticuerpos citotóxicos, vamos a poder hacer un seguimiento de perfil inmunológico de cada paciente, detectando o no, la presencia de anticuerpos anti-HLA (que pueden ser los responsables, en un momento dado, del rechazo y la consiguiente pérdida del órgano trasplantado). La inmunización de un paciente puede ser ocasionada por transfusión, embarazos, trasplantes previos o enfermedades autoinmunes.

Dicho estudio lo realizamos enfrentando en una placa de Terasaky, el suero del paciente en un papel de 30 células de tipaje conocido y suspendidas con DTT.

A continuación, desarrollamos la técnica de la microlinfocitotoxicidad mediada por complemento, cuyos fundamentos han sido ya descritos al tratar el tipaje.

La positividad ocurrirá en aquellos pocillos donde el anticuerpo (si lo hubiere) reaccione con algún antígeno presente en las células del panel, pudiendo en muchas ocasiones determinar la especificidad del mismo, al comprobar de todas las células con las que reacciona son portadoras de un mismo antígeno. Todo paciente que recibe una transfusión, es remitido al centro un suero a los 15 días para su estudio. Durante esos 15 días el paciente pasará a la situación (CT) de contraindicación transitoria para recibir un trasplante, ya que puede estar formando un anticuerpo, que todavía no se detecte en el escrutinio o el cross match. La situación CT es utilizada también cuando el paciente atraviesa una situación clínica que le contraindica temporalmente el trasplante.

PRUEBA CRUZADA

La clásica prueba cruzada linfocitaria por citotoxicidad o *crossmatch*-CDC tiene un alto valor pronóstico positivo (VPP) sobre la pérdida del injerto (80%) y su positividad clásicamente contraindica el trasplante renal. Otras pruebas poseen un valor pronóstico menos rotundo y su positividad indica aumentos en el riesgo de pérdida del injerto que oscilan entre el 10 y el 30% al año. El Cross match se realiza enfrentando los sueros almacenados del receptor a los linfocitos T y B del donante en placa Terasaky y aplicando la técnica de microlinfocitotoxicidad mediada por complemento. La negatividad de todos los sueros es la condición imprescindible para la realización del trasplante. La viabilidad celular debe ser superior al 90% y la reacción con el control positivo anti- HLA debe ser superior al 90% para considerar las pruebas interpretables. Se considera una prueba cruzada como positiva cuando la estimación de la lisis sea > 20%.

CRITERIOS INMUNOLOGICOS DE TRASPLANTE

Los criterios de compatibilidad por los que se realiza la elección, atendiendo a su importancia inmunológica son:

Identidad del grupo sanguíneo.

Identidad del locus DR.

Identidad del locus B.

Identidad del locus A.

Prueba Cruzada Negativa.

Se seleccionan con unos criterios, que varían según la valoración del estado clínico del paciente por parte del nefrólogo. Así, hay receptores cuya selección exige un mínimo de compatibilidades, (1 antígeno B y 1 DR), y otros cuyo grado de urgencia determina que el único criterio de selección sea la compatibilidad ABO y cross match negativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Manual de Procedimientos Generales, laboratorio de HLA, Hospital Universitario de Salamanca
2. Protocolo de Trasplante Renal de Donante Vivo, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (Version Octubre 2,010)
3. Guías S.E.N. Recomendaciones de la Sociedad Española de Nefrología (S.E.N.) y (ONT) sobre trasplante renal de donante vivo
4. Protocolo Coordinación de Trasplantes, Coordinación de Trasplantes Hospital Universitario de Salamanca.
5. El proceso de donación, papel del equipo de coordinación, Víctor Sagredo Meneses, Coordinador de Trasplantes del H.U.S.
6. Guía de buenas prácticas en el proceso de donación de órganos, ONT.
7. El Modelo Español de Coordinación y trasplantes, 2 a edición
8. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales
9. Protocolo inmunológico en el trasplante renal, Rafael Rodríguez Martínez, Centro de transfusión de la Comunidad Valenciana
10. Protocolo de determinación de Ac. Anti-HLA Clase I con LABScreen (One Lambda) (LUMINEX)
11. Trasplante renal de donante vivo HLA, Servicio de Nefrología. Hospital Universitario A Coruña. 2009

