

## TRASPLANTE DE ORGANOS SOLIDOS VASCULARIZADOS

Eduardo Chuluyan, Diego Guerrieri, Nella Ambrosi, Valeria Mas, Domingo Casadei y Claudio Incardona

### Introducción

El daño irreversible de órganos es uno de los principales desafíos de la Salud Pública, siendo el trasplante de los mismos una solución parcial y transitoria. El trasplante de órganos ha tenido un éxito considerable, pero diversos factores tales como los fenómenos de rechazo inmunológico y los efectos adversos de las terapias inmunosupresoras, limitan su efectividad. Sin embargo, actualmente el problema más acuciante es la falta de donantes.

De todos los órganos trasplantados, el riñón es el de mayor requerimiento. La relevancia socio-económica de esta demanda se pone de manifiesto por los 29.246 pacientes en diálisis durante el año 2016, en la Argentina. La enfermedad renal crónica y por lo tanto la necesidad de diálisis va en aumento, lo que genera altos costos, tanto para los pacientes como para el sistema de salud. Además, se debe considerar la pérdida de calidad de vida y la capacidad productiva de los pacientes. Por lo tanto, no cabe duda que una solución más adecuada para estos pacientes es el trasplante renal con políticas adecuadas que fomenten la donación de órganos.

El trasplante de órganos sólidos es un tema complejo. Cada uno de los órganos trasplantados presenta problemáticas comunes y particulares. En este capítulo, detallaremos algunas problemáticas comunes a los trasplantes, pero nos avocaremos especialmente a la problemática del trasplante renal y, en menor medida, hepático por ser los órganos que más se trasplantan.

Actualmente, el trasplante de órganos y tejidos en reemplazo de tejidos dañados, es considerado una terapia médica habitual, habiendo sido las transfusiones de sangre los primeros tejidos trasplantados. Los inicios del trasplante renal se remontan al año 1933 y fueron realizados por el ruso Yu Yu Voronoy, pero ninguno de éstos trasplantes fue exitoso. Los primeros indicios sobre la posibilidad de éxito datan del año 1947 en la ciudad de Boston (EUA) y termina de consolidarse cuando se obtuvo el éxito total al trasplantarse el riñón entre gemelos univitelinos. Los primeros aportes inmunológicos relacionados a las causas del rechazo de los injertos fueron realizados por Peter Brian Medawer (1915-1987), quien junto con Frank Macfarland Burnet, recibió el Premio Nobel de Medicina (1960), por su trabajo en los injertos de tejidos y sus aportes al descubrimiento de la tolerancia inmunológica. Es así, como se comienza a reconocer la importancia de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en los fenómenos de rechazo de órganos y tejidos. El éxito o fracaso en el trasplante dependía de la compatibilidad entre moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), lo que resultaba casi imposible debido al alto grado de polimorfismo poblacional del sistema de antígenos leucocitarios de histocompatibilidad (HLA). Las consecuencias de este elevado polimorfismo, son el alto grado de rechazo de órganos y tejidos mediado por la respuesta inmune adaptativa celular y humoral.

Con el correr de los años se realizaron trasplantes de otros órganos. En 1963 Thomas Starzl realizó el primer trasplante de hígado entre humanos. En 1967, en Ciudad del Cabo, el Dr. Christiaan Barnard realizó el primer trasplante cardíaco, ante la perplejidad de la opinión pública

mundial. A los primeros años de grandes fracasos le siguieron los éxitos, que fueron acompañados por un mayor conocimiento de los mecanismos de rechazo de los injertos y al desarrollo de los fármacos inmunosupresores.

La conexión entre el área del trasplante y la inmunología, generó una nomenclatura particular para referirse a los efectores celulares y humorales y a los mecanismos de respuesta inmune contra los órganos. Es así como en el área del trasplante es común referirse a los aloantígenos a aquellos antígenos que son reconocidos como extraños durante el rechazo; al reconocimiento de los aloantígenos, los que pueden ser mediados por anticuerpos, denominados aloanticuerpos, y/o por linfocitos denominados linfocitos aloreactivos.

### **Tipos de trasplantes**

Los trasplantes se pueden clasificar según el material que se vaya a injertar. Estos pueden ser: i) órganos sólidos vascularizados; ii) células; iii) tejidos; iv) materiales inertes; v) tejido compuesto; o vi) materia fecal (Tabla 1).

Entre los órganos sólidos vascularizados que se pueden trasplantar se encuentran el corazón, hígado, intestino, páncreas, pulmón, útero y riñón. A veces, el cuadro clínico requiere el trasplante simultáneo de dos órganos; como por ejemplo en los pacientes diabéticos que están en insuficiencia renal debido a una nefropatía diabética, y a los que se les propone un trasplante simultáneo renal y pancreático para restablecer la función renal y endócrina pancreática.

**Tabla 1. Tipos de células, tejidos u órganos que se pueden trasplantar**

<b>Tipos de Trasplante</b>	
<b>Células</b>	Hematopoyéticas
	Células de los islotes de Langerhans
<b>Tejidos</b>	Córnea
	Piel
	Sangre
	Óseo
<b>Organos sólidos vascularizados</b>	Riñón
	Hígado
	Corazón
	Pulmón
	Páncreas
	Intestino
	Útero
<b>Tejido compuesto</b>	Mano
	Cara
	Laringe
	Tráquea
	Cuero Cabelludo
	Pene

También se ha trasplantado tejido compuesto como mano, cara, laringe, tráquea, cuero cabelludo, fémur y pene, con diferentes grados de éxito. Pero lo que más llama la atención es la reciente incorporación de los trasplantes de microbiota fecal que, aunque se la propone como terapia para el tratamiento de diversas enfermedades, la única indicación médica real actual es en los casos refractarios de diarrea por infecciones con *Clostridium difficile*, bacilo Gram positivo anaerobio, responsable de una infección colónica denominada colitis pseudomembranosa.

### Clasificación de los Trasplantes

A partir del descubrimiento de la relevancia del sistema de HLA en los mecanismos de rechazo, los trasplantes se los puede clasificar de acuerdo al grado de similitud existente en los antígenos de histocompatibilidad entre el donante y el receptor (Tabla 2). De esta manera reconocemos a los trasplantes singeneicos (sin = idéntico), alogeneicos (alo = diferente) y xenogeneicos (xeno = extraño); siendo los trasplantes singeneicos aquellos que se realizan entre individuos de la misma especie y de la misma cepa, y que por lo tanto comparten antígenos de histocompatibilidad. Un ejemplo de trasplante singeneico es el que se produce entre gemelos idénticos. En estos casos no se observan reacciones de rechazo en el corto o mediano plazo. Una forma especial de trasplante singeneico, son los trasplantes autólogos, también denominados autotrasplantes o autoinjertos, en donde el donante y el receptor es el mismo individuo y, por lo tanto, también lo son los antígenos de histocompatibilidades. En estos casos, los problemas relacionados al injerto, no son de tipo inmunológico, sino de tipo quirúrgico e inflamatorio. Son ejemplos de autoinjertos, los injertos de piel, huesos, médula ósea, vasos (como por ejemplo los bypass coronarios), entre otros.

Los trasplantes alogénicos, aloinjerto o alotrasplante son realizados entre individuos de la misma especie, pero de cepas diferentes; es decir, entre individuos que expresan diferentes alelos codificados en el sistema del CMH. En estos casos se producen reacciones de rechazo siempre y cuando no se dé el tratamiento inmunosupresor adecuado.

**Tabla 2. Clasificación de los trasplantes.**

<b>Clasificación de los trasplantes</b>		
	<b>Características</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Trasplantes Singeneicos</b>	Sin diferencias en los antígenos de histocompatibilidad entre donante y receptor	Gemelos univitelinos, Trasplantes autólogos
<b>Trasplantes alogénicos, aloinjertos o alotrasplante</b>	Entre individuos que expresan diferentes alelos de histocompatibilidad	Hermanos, primos, tíos, parientes, individuos no relacionados.
<b>Trasplantes xenogeneicos</b>	Entre especies diferentes	Corazón de cerdo a humano.
<b>Trasplantes de órganos bioartificiales</b>	Materiales inertes a individuos.	Corazón, uréter

Los trasplantes xenogéneos son realizados entre dos especies de animales diferentes. Durante años, se ha pensado en la posibilidad de utilizar cerdos u otros animales como fuente de órganos a trasplantar para el ser humano. De hecho, se ha pensado e intentado modificar de manera genética a los animales con el objeto de expresar proteínas humanas, como por ejemplo la expresión de hDAF, que es un factor regulador de la activación del complemento. Sin embargo, la posibilidad de infecciones severas por retrovirus endógenos y/o la incorporación de partículas retrovirales al genoma humano, ponen cierto grado de pesimismo en la ejecución de este tipo de trasplantes.

Por último, podemos mencionar que existe un nuevo tipo de trasplante que consiste en el trasplante de órganos bioartificiales. Este tipo de trasplante, surge del avance del conocimiento en medicina regenerativa, bioingeniería y células madre, pero existen problemas técnicos que al día de hoy no han sido resueltos de manera eficiente.

### **Factores críticos para la supervivencia del órgano trasplantado**

La sobrevida de los órganos trasplantados, varía según el tipo de trasplante (ver Tabla 3).

**Tabla 3. Sobrevida de los injertos a lo largo del tiempo**

Trasplante	Porcentaje de sobrevida del órgano trasplantado		
	Al año	Al 3er año	Al 5to año
<b>Corazón</b>	88	84	79
<b>Riñón donante vivo</b>	97	95	88
<b>Riñón donante cadavérico</b>	94	89	84
<b>Riñón y páncreas simultáneo</b>	90	86	84
<b>Hígado</b>	83	77	72
<b>Pulmón simple</b>	90	78	74
<b>Pulmón doble</b>	85	70	54

En este sentido, la histocompatibilidad del sistema HLA es uno de los factores que más influye en la sobrevida del órgano trasplantado. Sin embargo, también se reconocen otros factores que condicionan el funcionamiento del órgano a corto y largo plazo, y se los puede clasificar en factores pre-trasplante, peri-trasplante y post-trasplante, vinculados al donante y al receptor. Entre los factores derivados del donante podemos mencionar la compatibilidad de grupo sanguíneo, la edad, tipo de donante (cadavérico o vivo) y la causa de muerte. En tanto que los derivados del receptor incluyen la edad, el tiempo en diálisis (para trasplantes renales), su estado de sensibilización frente a los antígenos del donante, entre otros. También existen factores peritrasplante que pueden afectar la función del órgano, tales como el tiempo prolongado de isquemia fría y caliente, el tiempo de sutura, entre otros. Otro de los factores más relevantes, son los tratamientos inmunosupresores, algunos de los cuales presentan efectos nefrotóxicos y

hepatotóxicos). A continuación, se detallan algunos aspectos de los factores críticos más relevantes y que se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 4. Factores que condicionan la sobrevida del injerto**

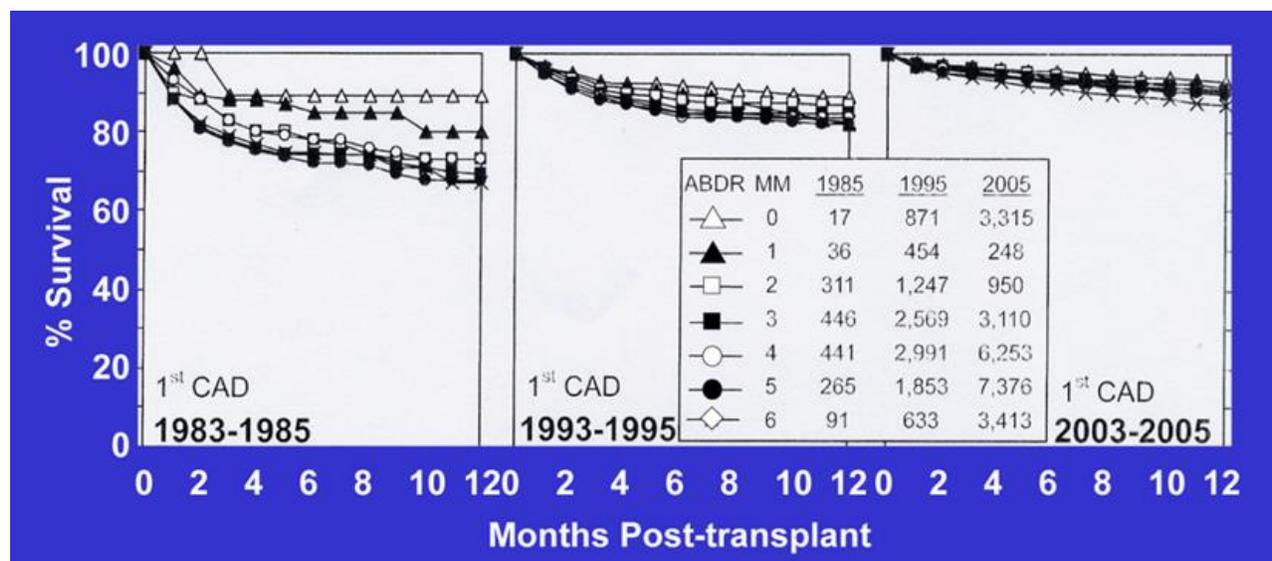
<b>FACTORES PRE-TRASPLANTE</b>		
<b>DEL DONANTE</b>	<b>DEL RECEPTOR</b>	<b>INMUNOLOGICOS</b>
TIPO DE DONANTE (Vivo o Cadavérico, con muerte encefálica o asistolia)	OBESIDAD	COMPATIBILIDAD HLA Y ABO
EDAD	EDAD	SENSIBILIZACION PREVIA
SEXO	SEXO	TRASPLANTE PREVIO
COMORBILIDADES	COMORBILIDADES	
TIEMPO DE ISQUEMIA FRIA	POLIMORFISMO GENETICO	
	TABAQUISMO	
	TIEMPO EN DIALISIS	
<b>FACTORES PERITRASPLANTE</b>		
TIEMPO DE ISQUEMIA FRIA Y CALIENTE	COMPLICACIONES QUIRURGICAS RELACIONADAS A LA ANATOMIA DEL ORGANO	
<b>FACTORES POS-TRASPLANTE</b>		
<b>COMORBILIDADES DEL RECEPTOR</b>	<b>FACTORES MORFOLOGICO FUNCIONALES</b>	<b>FACTORES INMUNOLOGICOS</b>
HIPERTENSION ARTERIAL	NECROSIS TUBULAR AGUDA	TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR
DIABETES MELLITUS POS-TRASPLANTE	FUNCION RENAL	RECHAZO AGUDO
ANEMIA	PROTEINURIA	RECHAZO SUBCLINICO
RECURRENCIA DE LA ENFERMEDAD DE BASE	INDICE DE RESISTENCIA	FALTA DE ADHERENCIA AL TRATAMIENTO
INFECCIONES (CMV, BK, PIELONEFRITIS)	BIOPSIAS	
UROPATIA OBSTRUCTIVA		

### **Compatibilidad del Complejo Mayor de histocompatibilidad y grupo ABO**

El éxito o el fracaso de un trasplante, depende en gran medida de la relación genética entre donante y receptor, ya que existen moléculas que marcan la diferencia entre lo propio y lo no propio. Estas moléculas, codificadas por genes que pertenecen al CMH, se ubican en la superficie de todas las células del organismo. Este conjunto de genes se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 y son altamente polimórficos. Cada individuo hereda los alelos de CMH del padre y de la madre, y al conjunto de alelos heredados (en cada cromosoma) se lo denomina

haplotipo. Un aspecto muy importante, es que su expresión es codominante, es decir, que se expresan en la membrana celular todos los alelos heredados.

En el ser humano, estas moléculas corresponden al llamado sistema HLA (Human Leukocyte Antigens). Existen tres clases de moléculas de HLA. Los genes de clase I, denominados HLA-A, -B y -C, son expresados en la mayoría de las células nucleadas y plaquetas, de forma tal que constituyen el mayor blanco para las reacciones inmunes contra el injerto. A diferencia de los genes de clase I, los de clase II (HLA-DP, -DQ y -DR) se encuentran expresados solamente en las células presentadoras de antígenos profesionales. Por último, los genes de clase III codifican para algunas proteínas que intervienen en la respuesta inmune como factores del sistema de complemento o proteínas de shock térmico. La presencia en los órganos injertados de moléculas HLA distinta a las del receptor (situación de incompatibilidad HLA) provoca en éste una respuesta del sistema inmune que puede resultar en el rechazo del órgano, el cual puede ser mediado por anticuerpos y/o por células T. Por otra parte, si las moléculas HLA presentes en el órgano injertado son iguales a las del receptor (situación de compatibilidad HLA), se reduce en gran medida la incidencia y la severidad del rechazo, aumentando por tanto la sobrevida del injerto. La implicancia del factor "incompatibilidad del sistema de HLA" en la sobrevida del injerto, fue modificándose con el tiempo. En la figura 2 se puede observar que, para una misma cantidad de incompatibilidades (*mismatch*, MM), la sobrevida de los injertos fue mayor entre los años 1993-1995 y aún más entre los años 2003-2005 comparado con la sobrevida de los injertos al año post-trasplante entre los años 1983-1985. Este fenómeno se debió a la aparición de nuevos y más eficientes tratamientos inmunosupresores. De esta manera, para los trasplantes de órganos sólidos, la incompatibilidad en algunos alelos de HLA no es un factor condicionante para el trasplante de órganos.



**Figura 2.** Evolución en el tiempo de la sobrevida del injerto según la cantidad de disparidad de alelos de HLA entre receptor y donante. En la figura se puede que las diferencias en la sobrevida del injerto por efecto del mismatch se fue reduciendo en el tiempo debido a la incorporación de nuevos y mejores tratamientos inmunosupresores.

Además de la compatibilidad del sistema HLA, también es muy importante determinar la compatibilidad del grupo sanguíneo ABO. Dado que los antígenos del grupo sanguíneo se encuentran en muchas células, incluyendo eritrocitos, plaquetas y células endoteliales de todos los órganos vasculares, la incompatibilidad ABO es una barrera inmunológica significativa en el trasplante. Esto es debido a la presencia de anticuerpos naturales contra los aglutinógenos (antígenos) A y/o B. Los pacientes con grupo sanguíneo A poseen anticuerpos (isohemaglutininas) contra el antígeno B y viceversa, mientras que los pacientes del grupo O poseen anticuerpos contra ambos antígenos. Solamente el grupo AB no presentan este tipo de anticuerpos dado que posee naturalmente ambos antígenos. Si el donante y receptor poseen incompatibilidad ABO, puede ocurrir rechazo agudo humoral. Por ejemplo, en trasplantes hepáticos ABO incompatibles, se ha reportado un mayor riesgo de rechazo humoral y celular, trombosis arterial y complicaciones biliares post-trasplante. Los mecanismos que llevan a activación del sistema inmune y al rechazo del órgano serán desarrollados más adelante.

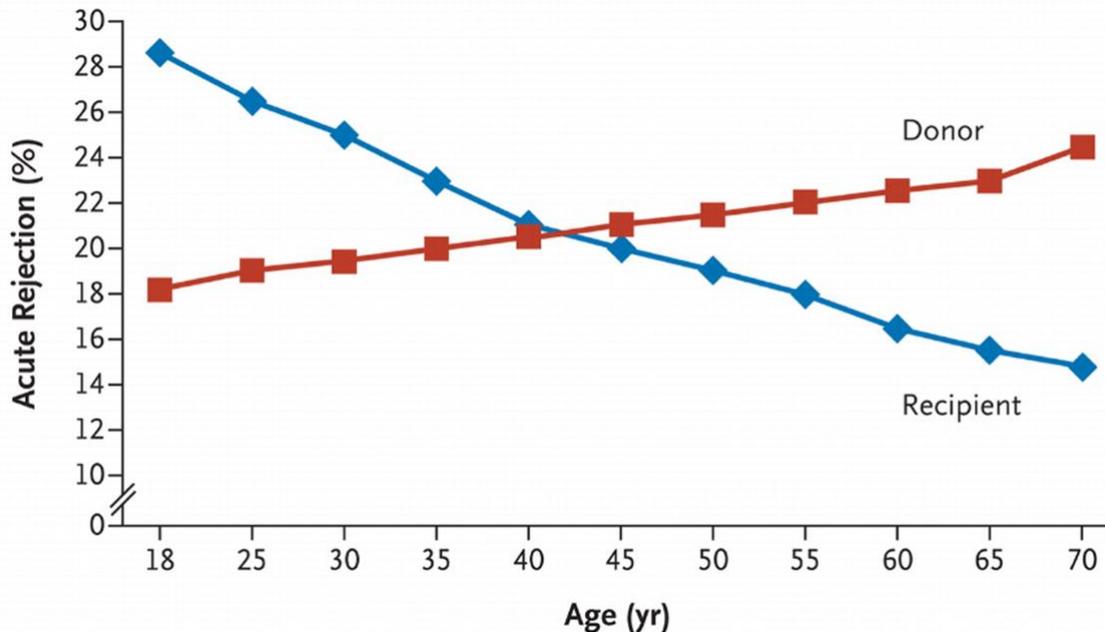
### **Tipo de Donantes**

El tipo de donante es uno de los factores más importantes a la hora de evaluar la sobrevida del órgano trasplantado. Los órganos a trasplantar pueden provenir de donantes vivos o cadavéricos y se sabe que los riñones provenientes de donantes vivos tienen mayor sobrevida que aquellos derivados de donantes cadavéricos.

Los donantes vivos son aquellos que pueden realizar la donación de un órgano y sobrevivir luego del procedimiento. Existen principalmente dos tipos de donantes vivos. Los donantes vivos relacionados, que deben tener un vínculo parental hasta 4º grado con el receptor y los no relacionados, quienes no se encuentran emparentados con el receptor. Es interesante señalar que, en Argentina, este último tipo de donación está prohibido por ley; por lo tanto, sólo es posible realizarla con autorización judicial que asegure los recaudos y medidas necesarias que garantice que efectivamente se trata de un acto de “carácter voluntario, altruista, desinteresado y solidario”. Existe un tipo particular de donante vivo no relacionado, y es el que se denomina donante vivo cruzado. En estos casos, dos (o más) receptores, cuyos donantes vivos relacionados son médicamente incompatibles, intercambian sus donantes. La donación cruzada es una alternativa válida, que ha tenido éxito en España y en EEUU.

En el caso de los donantes cadavéricos, existen dos tipos: aquellos con muerte encefálica (a corazón latente) y los donantes cadavéricos en asistolía o también llamados a corazón parado. Los donantes con muerte encefálica son pacientes que no poseen ninguna actividad cerebral y que indefectiblemente van a sufrir paro cardíaco, una vez que se les deje de suministrar las drogas que mantienen la perfusión de los órganos y sean desconectados de los aparatos de respiración artificial. En la Argentina, sólo se utilizan donantes cadavéricos con muerte encefálica.

Otro de los factores que influye en la sobrevida del órgano trasplantado es la edad del donante. Órganos provenientes de pacientes añosos suelen tener mayor probabilidad de rechazos agudos y peor pronóstico en comparación con aquellos procedentes de pacientes jóvenes (Figura 3).



**Figura 3.** Relación entre la edad del donante o del receptor con la probabilidad de rechazos agudos. Se puede ver que a medida que aumenta la edad del donante mayor será la probabilidad de rechazos agudos en el receptor. Lo opuesto se puede observar en los receptores. N Engl J Med 2011; 364:1369-1370 April 7

Por otra parte, se han identificado enfermedades preexistentes en los donantes que pueden afectar el resultado global del trasplante. Las infecciones transmitidas por el donante al receptor pueden tener importantes influencias sobre el resultado del trasplante. Por ejemplo, la infección por citomegalovirus (CMV), especialmente cuando se transmite a un receptor (con serología para CMV negativa) que nunca ha estado expuesto, aumenta el riesgo para infecciones fúngicas, rechazo y se asocia con peor supervivencia del paciente. Sin embargo, el desarrollo de profilaxis y regímenes preventivos ha limitado significativamente los efectos nocivos. Otro caso es el del virus Epstein-Barr, cuyo contagio puede plantear un riesgo de enfermedad linfoproliferativa post-trasplante y la muerte del receptor. Es difícil determinar completamente las relaciones causales ya que todos estos factores (la edad, la diabetes, la enfermedad vascular, la obesidad, infecciones) están vinculados. Sin embargo, todos estos por separado, o juntos, pueden afectar el funcionamiento del órgano y su recuperación. Es decir, la salud general del donante es crítica para el futuro del trasplante.

Es por todo esto que los requisitos para que un individuo con muerte encefálica pueda ser considerado un potencial donante son bastante estrictos, y tiene en cuenta la edad, la presencia de comorbilidades como la hipertensión arterial, alteraciones hidroelectrolíticas, entre otras. Sin embargo, la necesidad de aumentar el número de donantes, hizo reevaluar esos criterios. Es así, como en algunos centros se comenzó a utilizar a donantes cadavéricos con criterios expandidos (DCE). Las características de estos donantes incluyen una edad > 60 años, o edad 50-59 años con algunas de estas características: diabetes o hipertensión arterial, con trastornos hidroelectrolíticos o hemodinámicos graves, con serología positiva para el virus hepatitis, que ha

fallecido por intoxicación, con antecedente de neoplasias malignas, quemados, infectados y hospitalizaciones prolongadas (más de siete días en la UTI).

Debido a todos estos factores mencionados, resulta fundamental la selección cuidadosa de los donantes, pero teniendo en cuenta que, a pesar de haberse demostrado que los pacientes trasplantados con DCE tienen una menor sobrevida del injerto en comparación a los donantes con criterio estándar (Tabla 5), frente a la falta de órganos ideales es preferible el trasplante por sobre la continuidad en lista de espera, tanto en términos de calidad de vida, complicaciones y la sobrevida del paciente a largo plazo.

Tiempo de sobrevida (años)	Sobrevida del paciente (%)		Sobrevida del injerto	
	DCE	DCS	DCE	DCS
1	90,6	94,5	81,7	89,3
3	78,5	89,9	65,1	80,4
5	69,9	81,2	48,6	65,2

**Tabla 5.** Tiempo de sobrevida del paciente y del órgano en trasplantes renales de receptores de donantes con criterio estandar (DCS) y donantes con criterio expandido (DCE).

Los criterios de órganos expandidos, que en un principio sólo se aplicaban a riñón, se han ido extendiendo a otros órganos, en la medida en que las listas de espera divergen cada vez más entre receptores potenciales y donantes, por lo que se han incorporado al trasplante de hígado, páncreas, corazón, pulmón, intestino delgado y tejidos. A pesar de no ser donantes ideales, los receptores de riñones de DCE demostraron tener una tasa de sobrevida mayor en comparación con los pacientes con enfermedad renal terminal en lista de espera, permitiendo aumentar el número de trasplantes. También se han implementado programas de trasplante denominados “viejos para viejos” (od to old), en donde se trasplantan riñones provenientes de donantes añosos a receptores añosos que tienen baja necesidades metabólicas. En estos casos, la selección de los receptores, no se realizan en base a la compatibilidad HLA, sino en función de la tasa de filtrado glomerular del donante y prioriza el trasplante a pacientes próximos al donante, permitiendo reducir significativamente los tiempos de isquemia fría.

Particularmente en el caso de trasplante hepático, como es un órgano con capacidad regenerativa, también existe la donación mediante técnica de partición hepática (un solo hígado cadavérico se utiliza en dos pacientes) o técnica de reducción hepática (un segmento de órgano adulto se implanta en un receptor pediátrico).

### **Factores de riesgo derivados del receptor**

En lo que respecta al receptor, también existen diversos factores de riesgo, entre ellos la edad. A pesar que los receptores añosos tienen un menor porcentaje de eventos de rechazos agudos (Figura 3), se conoce que los mismos tienen una menor sobrevida del injerto y del paciente en comparación con receptores jóvenes; probablemente debido a la asociación con otras comorbilidades. La obesidad es otro factor importante, habiéndose descrito que los pacientes obesos son más propensos a tener complicaciones quirúrgicas y post-quirúrgicas, y mayor morbilidad perioperatoria que los pacientes no obesos. Las infecciones crónicas en el receptor

también son factores de riesgo para la sobrevida del paciente en el post-trasplante. Por ejemplo, la infección con el virus de la hepatitis C y B (VHC, VHB), se asoció con un riesgo aproximadamente 2 veces mayor de mortalidad post-trasplante.

Por otro lado, cada tipo de trasplante tiene factores de riesgo propios, en el caso de trasplante renal, por ejemplo, se observó que los pacientes que permanecieron períodos prolongados en diálisis sufren un impacto negativo en el resultado post-trasplante y en la sobrevida del paciente. El impacto que tiene este factor resulta evidente en la mayor sobrevida de los pacientes y del injerto en aquellos trasplantes denominados, según la terminología anglosajona *preemptive* (anticipado) que significa realizar el trasplante renal antes de iniciar la diálisis. Las razones de esta mejor sobrevida no están del todo claras. Pero se conoce que la uremia presente en el paciente con insuficiencia renal terminal favorece el desarrollo de un cuadro inflamatorio mediado por la acumulación de sustancias proinflamatorias y un aumento del estrés oxidativo. Por otro lado, la hemodiálisis facilita la acumulación de sustancias de alto peso molecular que activan células mononucleares de sangre periférica y eliminan otras sustancias de bajo peso molecular con actividad anti-oxidante.

### **Factores de riesgo perioperatorios**

No solo las características de los individuos participantes del trasplante son factores de riesgo para el trasplante. Existen otros factores que son independientes del donante y del receptor. Entre ellos, la isquemia del órgano es uno de los factores más críticos que influye de manera negativa en la función del órgano trasplantado. Durante el proceso de procuración, el órgano es ablacionado, lo que significa la interrupción sanguínea y la consiguiente isquemia del órgano. Este órgano isquémico, luego es conservado en frío para su transporte hasta la implantación en el receptor.

En el proceso de ablación, el órgano pasa por dos etapas de isquemia; la caliente y fría. La isquemia caliente ocurre en dos momentos diferentes durante el trasplante. El primer evento de isquemia caliente se inicia cuando los vasos del donante son pinzados y termina cuando se perfunde el órgano con la solución de preservación fría (normalmente unos pocos minutos). El segundo evento de isquemia caliente ocurre al colocar el órgano en el receptor hasta completar la anastomosis vascular e iniciar la perfusión por parte del receptor (alrededor de 35 minutos idealmente menos). La isquemia fría, transcurre desde que el órgano es ablacionado y perfundido con solución de preservación fría, hasta el momento que el órgano es colocado en el receptor. El tiempo total de isquemia fría debería ser menor de 24 horas. Durante este período, el órgano es almacenado a 4°C, lo que permite una disminución del metabolismo, sin cristalización de las proteínas. De esta forma, el tiempo de isquemia caliente se vincula al proceso quirúrgico mientras que la isquemia fría está relacionada con el operativo de transporte del órgano y la evaluación de compatibilidad con los potenciales receptores. Un tiempo de isquemia prolongado tanto fría como caliente se asocia con efectos adversos a posteriori, dado que puede afectar la función temprana del injerto, así como disminuir la sobrevida del injerto y el paciente a largo plazo. Desafortunadamente en nuestro país el tiempo de isquemia fría suele ser elevado. Una manera de reducir el impacto del tiempo de isquemia es a través de la utilización de máquinas de perfusión que remedan la perfusión sanguínea. Se sabe que el uso de estas máquinas, permite una recuperación funcional del injerto mucho más rápida y mejora la sobrevida del órgano y del paciente.

### **Impacto Inmunológico de los factores de riesgo en la sobrevida del injerto**

Cada uno de los factores de riesgo descritos condicionan la sobrevida del injerto favoreciendo el desarrollo de procesos inflamatorios e inmunológicos; algunos de ellos bien caracterizados y otros no tanto. Por ejemplo, se sabe que la muerte cerebral libera cantidades masivas de citoquinas, factores de crecimiento y activa el complemento afectando todos los órganos y sistemas del donante. El impacto de esta respuesta inflamatoria no regulada en los pacientes con muerte cerebral repercute de manera negativa en la sobrevida de los órganos provenientes de donantes cadavéricos, sugiriendo que el fenómeno inflamatorio comienza previo al proceso de ablación del órgano. Este fenómeno sustenta la hipótesis por el cual algunos investigadores proponen iniciar la inmunosupresión en el donante luego del diagnóstico de muerte cerebral. De todas maneras, independientemente de este fenómeno, no cabe ninguna duda que el mayor condicionante en la sobrevida de los órganos es el daño generado por el proceso de isquemia-reperusión que se detalla a continuación.

### **Daño por isquemia-reperusión**

El daño por isquemia-reperusión es una condición patológica inevitable caracterizada por la restricción inicial del suministro de sangre al injerto, seguido de la posterior restauración de la perfusión con la re-oxigenación concomitante. La injuria comienza por anoxia, prosigue y se agrava al reperfundir el órgano, culminando con una reacción inflamatoria estéril. La duración de la isquemia determina la gravedad del daño tisular. Debido a la isquemia, ocurren cambios estructurales y metabólicos en el tejido como la reducción del diámetro capilar, la disfunción metabólica de las células endoteliales, la disfunción de la membrana celular y la regulación positiva de mediadores proinflamatorios. Una vez que se restablece el flujo sanguíneo, se desencadenan una serie de mecanismos moleculares que pueden provocar la muerte de las células del tejido. A continuación, se detallan los procesos que resultan en la alteración funcional y estructural del tejido.

### **Daño en la fase isquémica**

En la fase isquémica, la lesión anóxica de las células O<sub>2</sub>-dependientes es sin duda el proceso predominante. Esta lesión anóxica comienza con una disminución de la producción de energía mitocondrial, una caída de la energía celular (ATP) seguida por un desbalance hidroelectrolítico, la activación de hidrolasas y el aumento de la permeabilidad de las membranas celulares. Estas alteraciones siguen solo en parte un orden secuencial y puede ocurrir la auto-amplificación de los procesos y la propagación a través de diversas vías. El pH citosólico disminuye debido a la degradación del ATP, al aumento de la tasa glucolítica con acumulación de lactato y a la liberación de H<sup>+</sup> de lisosomas dañados. En paralelo, se deteriora la homeostasis celular de iones, lo que implica un aumento de las concentraciones citosólicas de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup>. Ambos sucesos están relacionados debido a que fallan los mecanismos compensatorios que regulan el pH. Se produce una disminución de la actividad de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa y se genera un mayor intercambio de Ca<sup>++</sup> y Na<sup>+</sup> por el contra-transportador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> que en las etapas avanzadas de la isquemia comienza a funcionar en el modo inverso. Este fenómeno provoca un aumento en la concentración citosólica de Ca<sup>++</sup>, la cual puede activar hidrolasas, tales como las fosfolipasa A2 y proteasas (calpaínas y otras). Las hidrolasas producen la proteólisis de proteínas del

citoesqueleto lo que aumenta el proceso de lesión tisular. Al mismo tiempo, el aumento de  $Ca^{++}$  citosólico y la hipoxia generan un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial que produce un fracaso en la fosforilación oxidativa con un agotamiento progresivo del ATP. A su vez, la edematización de las mitocondrias y el aumento de la permeabilidad llevan a la liberación de citocromo c, el cual activa una cascada de señalización que involucra a las caspasas 1 y 9 provocando la apoptosis celular. Por otra parte, el aumento de  $Na^+$  celular puede causar edema celular, que contribuye al daño de la membrana plasmática resultando finalmente en la muerte celular por necrosis. En el riñón, este proceso da lugar a diferentes grados de necrosis tubular aguda, que se evidencian en las biopsias renales.

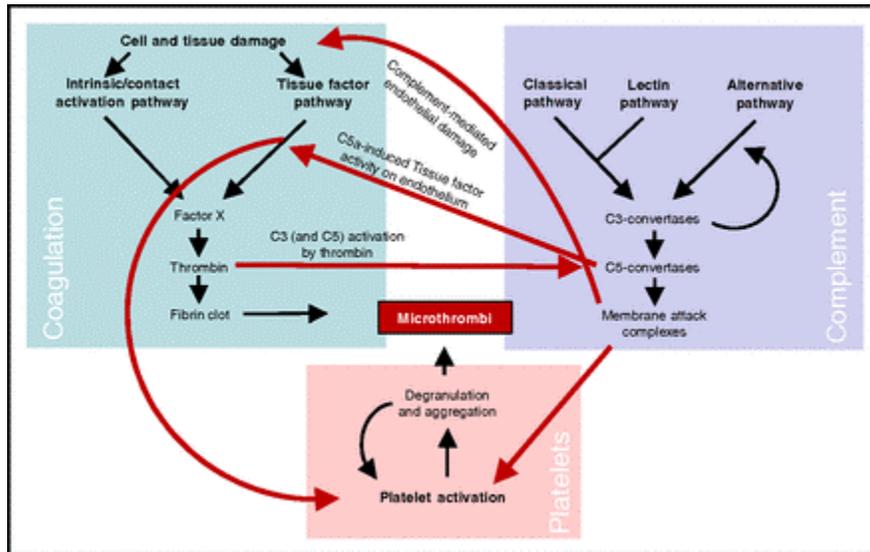
Por otro lado, el período de isquemia se asocia con una alteración importante en la expresión génica y la reprogramación de la transcripción. Por ejemplo, en condiciones de normoxia las enzimas prolin hidroxilasas (PHD) reguladoras del factor inducible por hipoxia (HIF) modifican post-traduccionalmente la subunidad alfa de dicho factor, agregándole hidroxilos en residuos de prolina específicos. Dicha modificación permite su reconocimiento, lo que deriva en su ubiquitinación y proteólisis. A diferencia, en condiciones de hipoxia, la falta de oxígeno imposibilita la acción de estas enzimas, permitiendo la acumulación de la subunidad alfa, su translocación al núcleo y la formación del factor de transcripción activo junto con HIF-1 $\beta$ , permitiendo la transcripción de genes que promueven la adaptación y sobrevivencia tisular.

### **Daño en la fase de reperfusión**

El restablecimiento del flujo sanguíneo, paradójicamente, inicia una cascada de eventos que pueden conducir a daño celular adicional, más allá del provocado por la isquemia. La lesión por reperfusión se caracteriza por respuestas inflamatorias y autoinmunes, incluyendo el reconocimiento de neoantígenos por anticuerpos naturales y la posterior activación del sistema de complemento. Durante la reoxigenación se generan nuevas lesiones por el aumento en la producción de las especies reactivas del oxígeno (ERO) y el nitrógeno en las células parenquimatosas, endoteliales, plaquetas y leucocitos activados que infiltran la zona. Durante la fase isquémica, las enzimas involucradas en la transferencia de electrones sufren proteólisis; tras la reperfusión, se produce una transferencia de electrones al oxígeno por las enzimas dañadas, lo que resulta en la formación de ERO. En condiciones normales, los efectos nocivos del superóxido son prevenidos por la superóxido dismutasa, que convierte al anión en peróxido de hidrógeno. Luego, la glutatión peroxidasa y la catalasa convierten al peróxido de hidrógeno en agua. Durante la reperfusión, esta defensa natural se ve superada y el peróxido de hidrógeno es convertido en radical hidroxilo, capaz de dañar una amplia variedad de moléculas, incluyendo aminoácidos, proteínas de transporte de membrana, lípidos, citocromos, y ácidos nucleicos lo que lleva a la disfunción o muerte celular. La muerte puede darse por necrosis o apoptosis, pudiéndose activar ambas vías tanto la intrínseca como la extrínseca. La apoptosis consiste en una cascada de señalización de caspasas que induce a un programa regulado de muerte celular. En cambio, en la necrosis, se producirá la exposición y reconocimiento de DAMPs, llevando a la infiltración de células inflamatorias y a la producción de citoquinas proinflamatorias. Esto hace que todo el daño celular que ocurre durante el período de reperfusión, además, induzca y perpetúe la respuesta inflamatoria.

Es importante tener cuenta que la lesión tisular o la exposición de la matriz permitirá la activación de la cascada de la coagulación, la cual tratará de reparar la lesión vascular. Sin embargo, la

activación de los factores de la coagulación puede activar al sistema de complemento, incrementando el daño tisular a través de un mecanismo de retroalimentación positiva.



**Figura 4.** Mecanismo de retroalimentación positiva entre la cascada de coagulación y la cascada del complemento. Blood 2017 129:2847-2856; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-709865>

### Respuesta inmune en el daño por isquemia reperusión

Las consecuencias de la isquemia-reperusión son muy similares a la activación de una respuesta inflamatoria del huésped dirigida a microorganismos invasores. Sin embargo, es una respuesta inflamatoria aséptica que puede ser iniciada por los restos de células dañadas. En este proceso se activan eventos de señalización a través de moléculas de reconocimiento de patrones, tales como receptores tipo Toll (TLR), reclutamiento y activación de las células del sistema inmune innato y adaptativo y la activación del sistema del complemento. Como la respuesta inmune desencadenada provoca un efecto adverso y genera un daño en el injerto, el tratamiento dirigido contra su activación es una alternativa terapéutica emergente en el tratamiento de la isquemia-reperusión.

### Respuesta inmune innata

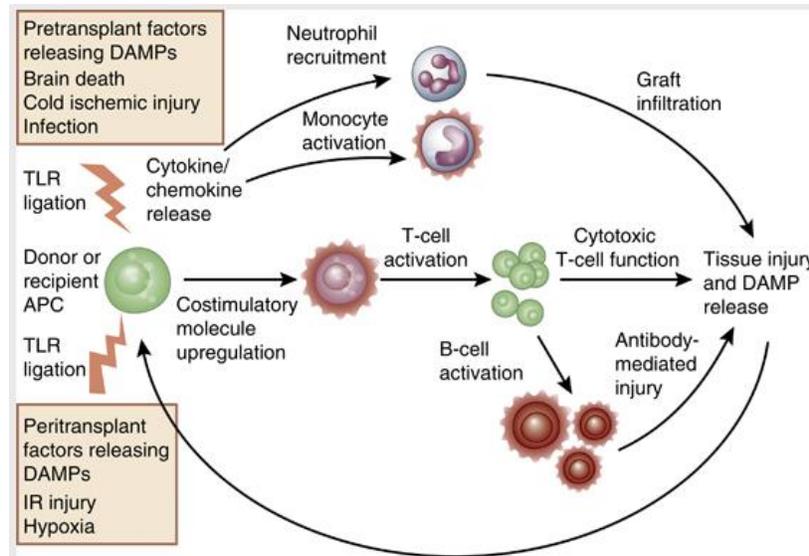
La respuesta inflamatoria desencadenada por muerte celular, como ya se mencionó tiene muchas similitudes con lo observado durante las infecciones microbianas. En particular, receptores que median la respuesta a los microorganismos como los receptores TLRs, pueden ser activados por moléculas endógenas (DAMPs) en ausencia de compuestos microbianos en el contexto de daño o muerte celular; como ocurre durante la isquemia-reperusión, participando en la activación de la inflamación aséptica. La unión de los ligandos de TLRs conduce a la activación de vías de señalización, incluidas las de NF- $\kappa$ B y proteínquinasa activada por mitógenos (MAPK), lo que resulta en la inducción de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas (Figura 4). Estos ligandos reciben el nombre de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Muchos de estos ligandos como la proteína del grupo de alta movilidad Box1 (HMGB1) o la proteína de shock térmico 70 (HSP70) se encuentran normalmente secuestrados en el espacio intracelular, pero cuando hay daño tisular, se liberan al compartimiento extracelular

donde pueden activar la respuesta inmune. De esta forma, la respuesta inflamatoria puede iniciarse a partir del reconocimiento de DAMPs a través de los receptores celulares o también a partir de la activación celular, especialmente la de macrófagos, células dendríticas y células endoteliales, que son activadas por la secuencia de anoxia y re-oxigenación debido al aumento de  $Ca^{++}$  citosólico. Mediadores como las moléculas de adhesión, citoquinas y quimiocinas pueden ser expresados por estas células endoteliales activadas provocando el reclutamiento de células del torrente sanguíneo. Las moléculas de adhesión celular en la superficie de los leucocitos interactúan con sus ligandos en las células endoteliales e inician una secuencia altamente coordinada que conduce, en última instancia, a la emigración de leucocitos desde el torrente sanguíneo. Las células endoteliales, macrófagos y mastocitos, entre otros, reciben señales de daño tisular y responden produciendo citoquinas proinflamatorias tales como  $TNF-\alpha$ , IL-1 y quimiocinas como el factor activador de plaquetas (PAF), leucotrieno B4 e IL-8. Inicialmente, los neutrófilos son atraídos al sitio de inflamación por medio de estas señales quimiotácticas. A su vez, el endotelio puede ser activado, no sólo por mediadores proinflamatorios sino también por factores de la coagulación como la trombina, lo que resulta en la expresión en su superficie de la P-selectina, la interacción entre los ligandos de P-selectina de los neutrófilos (PSGL-1) y las P-selectinas de las células endoteliales da lugar a que los neutrófilos rueden con lentitud a lo largo del recubrimiento endotelial de los vasos. Las quimiocinas que fueron generadas en respuesta al daño se unen a glucosaminoglicanos en la cara luminal del endotelio vascular y cuando los neutrófilos ruedan sobre el endotelio, sus receptores para PAF e IL-8 se estimulan provocando una transducción de señales que lleva a la activación de las integrinas. Esto genera un cambio de estado de las integrinas (principalmente LFA-1 y Mac-1) de la membrana de los neutrófilos, que pasan de una conformación de baja afinidad a una conformación de alta afinidad. Por otro lado, la IL-1 y el  $TNF-\alpha$  aumentan la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 sobre las células endoteliales, favoreciendo la unión de estas moléculas a las integrinas presentes sobre la superficie de neutrófilos y monocitos, promoviendo la adhesión firme de los mismos al endotelio. Por último, las quimiocinas, actúan sobre los leucocitos adheridos al endotelio y estimulan su migración a través de los espacios interendoteliales hacia el sitio dañado. Después de atravesar el endotelio, los neutrófilos y monocitos rompen la lámina basal, probablemente segregando colagenasas, y entran en el tejido extravascular. Para ello, se adhieren a la matriz extracelular mediante la unión de sus integrinas y CD44, a las proteínas de la matriz.

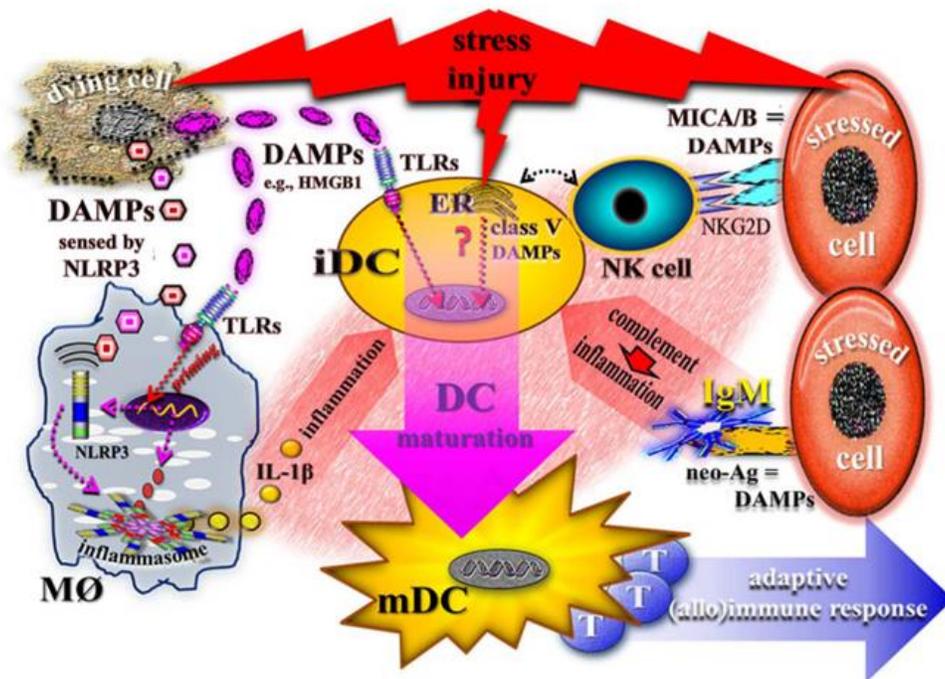
La acumulación inicial de granulocitos debe ser muy controlada, ya que unos pocos granulocitos son capaces de impedir la adecuada reparación de los tejidos, mientras que un exceso de granulocitos puede promover la inflamación descontrolada y el daño tisular. Existen varios mecanismos por los cuales los neutrófilos pueden tener efectos nocivos, que incluyen la secreción de enzimas proteolíticas como la elastasa de gránulos citoplasmáticos; la producción de radicales libres a través del estallido respiratorio y la obstrucción de la microcirculación a nivel capilar provocando así la extensión del daño producido por la isquemia.

En el foco inflamatorio, además de granulocitos y monocitos, también se encuentran células dendríticas convencionales. Luego de la isquemia-reperfusión estas células experimentan un proceso de maduración independiente del antígeno inducido por DAMPs (Figura 6). Por ahora la importancia de estas células en el fenómeno de daño por isquemia reperfundida no es del todo claro. En un trabajo publicado, se observó que las células dendríticas podrían favorecer el daño a

través de la producción de mediadores proinflamatorios tales como TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 y RANTES; mientras que, en otro, su depleción en este contexto llevó a un aumento de la inflamación y la lesión tisular.



**Figura 5:** Vías Aoinmunes activadas por TLR. La injuria aguda por stress oxidativo (por muerte cerebral o isquemia) inducen DAMPs que activan TLR expresados sobre cél. Mononucleares, los que producen citoquinas y factores de crecimiento, amplificando la activación de TLR.



**Figura 6.** Modelo simplificado que muestra el efecto de varias clases de DAMP en la maduración y activación de células dendríticas y de la respuesta inmune adaptativa aloreactiva T. Las Células dendríticas se pueden activar por DAMP como HMGB1 por señalización directa o los DAMP son detectados por NLRP3/inflamasoma creando un medio proinflamatorio a través de la secreción de IL-1b. Pero también, las células estresadas expresan los DAMPs MICA/MICB que son reconocidos por las células NK que ayudan en la maduración de DC. Algunos neoantígenos se comportan como DAMPs y activan el complemento que, a su vez, contribuye a la inflamación. American Journal of Transplantation 2016; 16: 3338–3361.

### Respuesta inmune adaptativa

Mientras que la activación del sistema inmune innato toma lugar en cuestión de minutos, la respuesta inmune adaptativa se evidencia días después del acontecimiento. Dicha respuesta involucra entre otros tipos celulares a los linfocitos T. Varios estudios han demostrado que las células T se acumulan durante la isquemia-reperfusión. Las células T se localizan en una zona que limita la zona isquémica, dentro de las 24 hs post-reperfusión, y se acumulan por un lapso de alrededor de 7 días, disminuyendo su número después del día 14. Estudios en ratones deficientes en poblaciones específicas de linfocitos mostró que tanto los T CD4+ y CD8+ tienen un papel perjudicial en la isquemia-reperfusión del cerebro, corazón y riñón. Además, un estudio reciente sugiere un papel fundamental para la IL-17 producida por las células T $\gamma\delta$ . A su vez, niveles elevados de esta citoquina fueron encontrados en individuos que sufrieron un accidente cerebrovascular, así como en ratones expuestos a isquemia-reperfusión cerebral.

El mecanismo por el cual las células T antígeno específicas son activadas durante la inflamación aséptica, no se conoce bien todavía, pero evidencia emergente indica la contribución de ambos mecanismos de activación, antígeno dependiente e independiente. Por ejemplo, las células T se

pueden activar a través de radicales libres de oxígeno, citoquinas o RANTES de una manera antígeno inespecífica, o mediante la activación por interacción con células presentadoras de antígenos. En este último caso, se observó que el bloqueo de la coestimulación disminuyó el daño en modelos animales de IRI. En contraste, las células Treg parecen tener un papel protector en IRI. Un estudio reciente utilizando un modelo de accidente cerebrovascular experimental mostró que la depleción de las células Treg aumentaba el daño cerebral y causaba un deterioro en el resultado funcional final.

### **Repercusión clínica del daño por isquemia-reperfusión**

Una vez realizada la cirugía, se espera que el funcionamiento del órgano sea inmediato. Sin embargo, en la mayoría de los distintos tipos de trasplantes de órganos sólidos vascularizados está descrito la posible ocurrencia de un fenómeno en el cual el injerto no responde como lo esperado debido al daño al que se somete. Este fenómeno llamado disfunción del órgano es definido de forma diferente según el órgano trasplantado, e incluso, para un mismo tipo de trasplante, entre distintos centros y en la literatura. Independientemente del órgano trasplantado, el retraso en el funcionamiento de los órganos, se corresponde fuertemente con una mayor inmunogenicidad, menor supervivencia del injerto a largo plazo y con un mayor riesgo de rechazo agudo. Lo que condiciona un mayor riesgo de pérdida del injerto y una disminución de la supervivencia del paciente a largo plazo.

Para el trasplante renal, por ejemplo, este proceso se denomina retraso de la función del injerto (DGF, *delay graft function*) y la definición más aceptada es la necesidad de diálisis dentro de la primera semana post-trasplante. El DGF es descrito como una discrepancia entre la capacidad funcional del injerto y de las necesidades fisiológicas del receptor, siendo una forma de insuficiencia renal aguda que resulta en oliguria post-trasplante. Alrededor del 30-50% de los trasplantados renales sufren DGF. Sin embargo, en nuestro país la cifra de pacientes con DGF asciende al 60-70%. Con respecto a la relación entre DGF y la supervivencia del injerto, se sabe que la vida media de un riñón con DGF es de 8,6 años en comparación con la vida media de 14,1 años de un riñón sin DGF.

Los términos, DGF y necrosis tubular aguda (NTA) se utilizan a menudo para definir el mismo trastorno, aunque el primero es un diagnóstico clínico y el segundo es una característica histopatológica. La degeneración de las células epiteliales tubulares, exfoliación de las células tubulares, edema intersticial e infiltración celular intersticial se observan generalmente en las biopsias de pacientes con DGF. Estos parámetros histológicos se asocian a una disminución de la filtración glomerular que genera una pérdida de la capacidad del injerto para excretar los desechos, concentrar la orina, conservar electrolitos y mantener el balance de líquidos.

En el trasplante hepático se describe un fenómeno similar denominado síndrome de post-reperfusión (SPR) que es una consecuencia directa del daño por isquemia-reperfusión. Este SPR es una causa conocida de disfunción primaria del injerto. Aunque muchos de los órganos que sufren disfunción pueden recuperarse, aproximadamente el 5% no logran abastecer las necesidades del receptor y sólo el trasplante urgente puede salvar al paciente.

Como se describió previamente, el desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno trae como consecuencia un déficit de energía que compromete la integridad estructural y funcional de

las membranas, las cuales muestran una incapacidad para mantener las concentraciones fisiológicas de electrolitos, enzimas, y mediadores, en sus respectivos compartimientos. Una vez restituido el flujo sanguíneo, los componentes liberados al medio extracelular y la súbita carga de sangre fría, acidótica, con elevados niveles de enzimas y mediadores inflamatorios alcanzan la circulación periférica, llegando en segundos hasta el corazón del receptor, pudiendo generar un desacoplamiento ventrículo-arterial. A su vez, muchos mediadores inflamatorios tienen un efecto vasoconstrictor sobre las arteriolas pulmonares, provocando un aumento repentino de la presión arterial pulmonar. Al mismo tiempo, el efecto global sobre la circulación sistémica es una reducción de la resistencia vascular. De esta forma se pueden observar consecuencias clínicas inmediatas tales como colapso circulatorio, arritmias y muerte del paciente.

El SPR aparece típicamente en los minutos que siguen a la retirada de las pinzas quirúrgicas de los gruesos vasos venosos que ingresan y emergen del hígado trasplantado. Clínicamente se ha definido como una disminución de la presión sanguínea arterial sistémica mayor al 30%, durante al menos 1 minuto durante los primeros 5 minutos post-reperfusión. Es una de las causas de la disfunción primaria del injerto hepático (más del 10% de los casos), afectando los resultados globales del trasplante, se vincula con una mayor incidencia de rechazo tanto agudo como crónico y una elevada morbimortalidad en el post-operatorio. Casos severos de SPR pueden provocar una falla multiorgánica y en este contexto uno de los principales órganos afectados es el riñón.

### **Mecanismos inmunológicos de iniciación de la respuesta inmune alógena de rechazo de los injertos**

El análisis de los mecanismos de rechazo inmunológicos requiere tener en cuenta dos tipos diferentes de pacientes: i) no sensibilizados, y ii) previamente sensibilizados. En el primer caso, el rechazo del injerto se produce siempre y cuando se genere una respuesta inmune alógena primaria. En tanto que en los pacientes previamente sensibilizados, se producirá complejos inmunes aloantígenos-aloanticuerpos que activarán la vía clásica del complemento y, también, se podrán activar células de memoria que se diferenciarán en células efectoras.

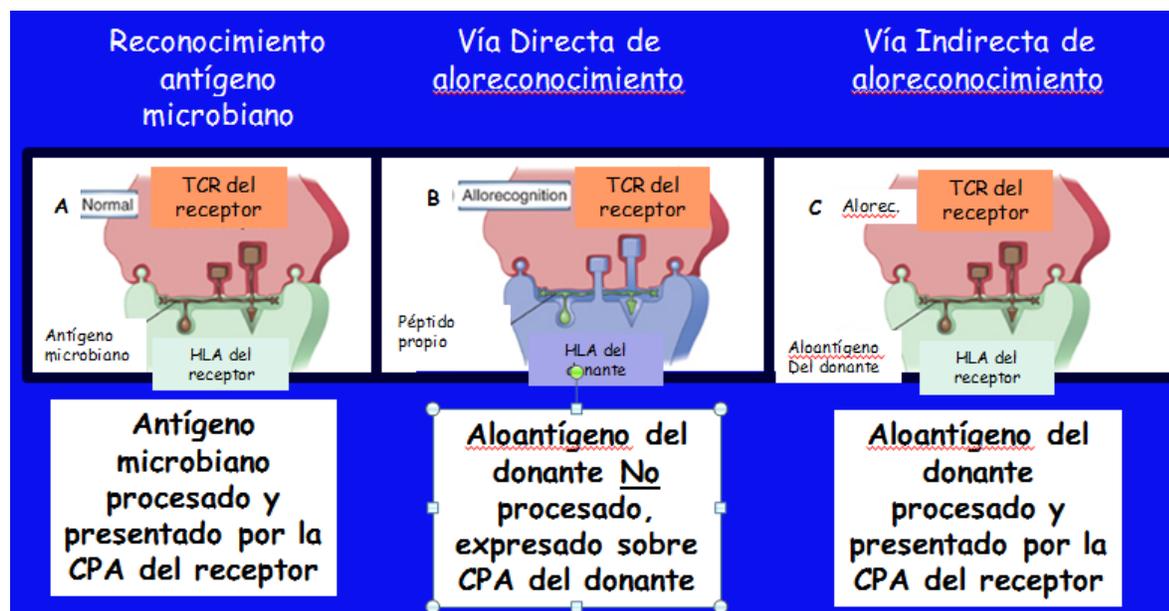
### **Respuesta aloinmune primaria (en pacientes no sensibilizados)**

Los pacientes no sensibilizados carecen de aloanticuerpos o de células de memoria contra los aloantígenos. Una vez realizado el trasplante, se iniciará una respuesta inmune primaria frente a los aloantígenos, la que requerirá una etapa inicial de reconocimiento de los aloantígenos (alorreconocimiento), su procesamiento y la activación de los linfocitos T y/o B aloreactivos. La posible activación de linfocitos T y B naive que expresen TCR y BCR específicos para los aloantígenos del donante, se comprende por la ausencia de los aloantígenos del donante durante el proceso de selección negativa en el timo. Es decir que en el repertorio de linfocitos T y B de cualquier individuo podrán existir linfocitos T y B naive aloreactivos contra los aloantígenos de los donantes. En estos casos, los aloantígenos del donante serán procesados y presentados por CPA profesionales del receptor en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad del receptor a los LT perteneciente al receptor del trasplante. Este tipo de procesamiento y

presentación es similar al que ocurriría con un antígeno microbiano y se denomina vía de aloreconocimiento indirecta. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el aloreconocimiento puede ocurrir por mecanismos diferentes a los ya descritos para los antígenos microbianos. Es así que reconocemos mecanismos de reconocimiento de aloantígenos por vía directa, semidirecta, que se describirán en los siguientes párrafos.

**Vía directa de aloreconocimiento**

Como se mencionó más arriba, el trasplante de órganos sólidos vascularizados, implica el injerto de diferentes tipos celulares que forman parte del parénquima tisular. Todas ellas son CPA y, algunas como por ejemplo las células dendríticas (CDs), serán CPA profesionales derivadas del donante. Una vez realizado el trasplante, éstas CDs del donante, favorecidos por el microambiente isquémico, madurarán y migrarán hacia los órganos linfáticos secundarios del receptor, dando inicio a una respuesta inmune alogeneica. La interacción entre las CDs del donante y los linfocitos T del receptor (en los órganos linfáticos secundarios), permite la interacción directa del TCR con las moléculas de clase I y clase II del CMH presentes en la membrana de las CDs del donante. Este reconocimiento se denomina “alorreconocimiento” o “reconocimiento alogeneico” y es una excepción a uno de los paradigmas de la respuesta inmune denominado “restricción por el CMH”, por el cual el TCR únicamente reconoce un antígeno siempre que el mismo estuviera presente en el contexto de moléculas CMH propias. En el aloreconocimiento, la CDs y el linfocito T corresponden a diferentes individuos. En estos casos, la activación T en el aloreconocimiento se debe a la existencia de complementariedad estructural (“encaje”) entre el TCR del receptor y las moléculas del CMH alogenicas, llevando a la activación del linfocito T (Figura 7).



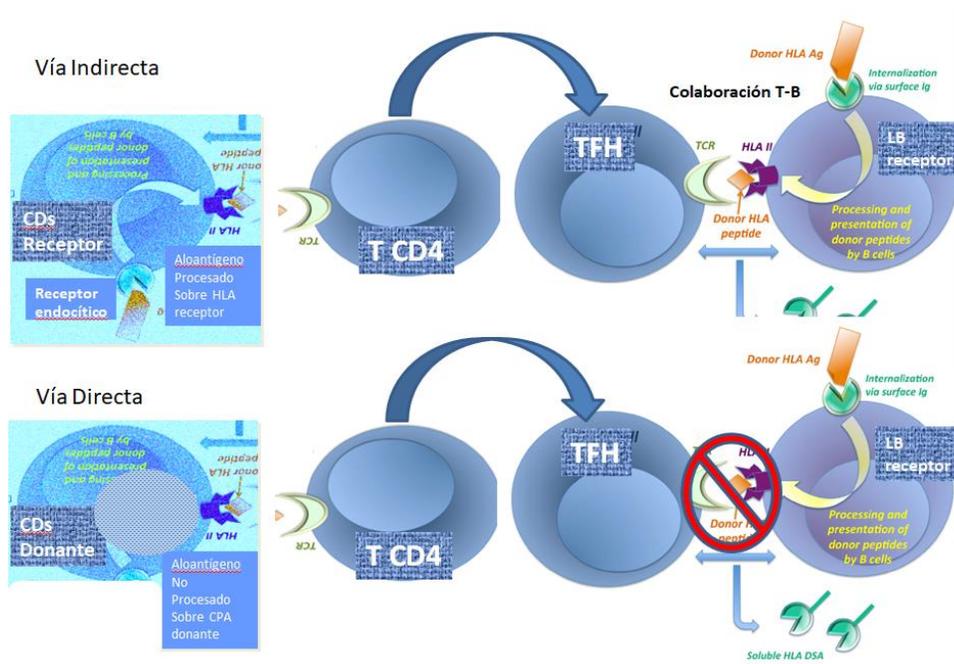
**Figura 7.** Complementariedad estructural de la molécula MHC del donante (B) con respecto a la molécula de MHC del receptor que aloja un antígeno microbiano (A) o un aloantígeno derivado del donante (C).

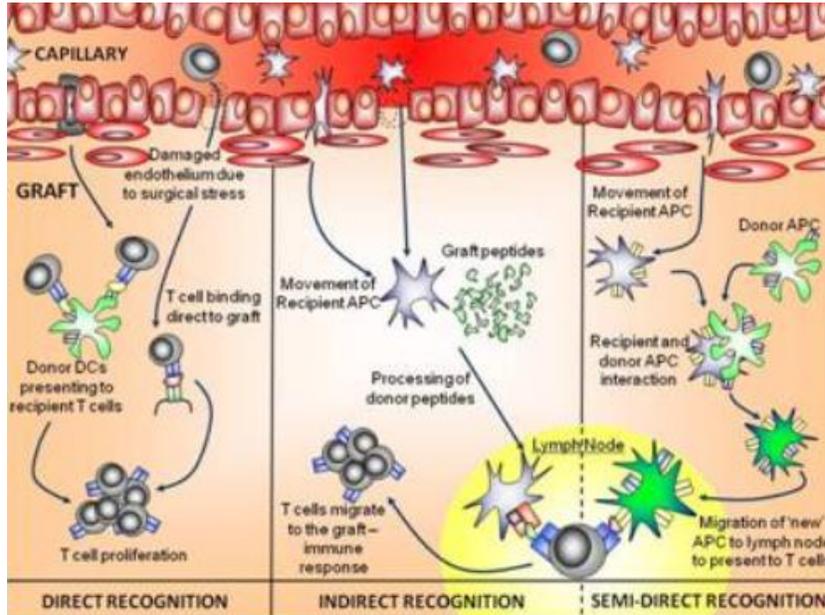
Esta respuesta alógena, activada por la vía directa, se caracteriza por ser de alta intensidad ya que hay alta frecuencia de linfocitos T respondedores. Esta alta frecuencia de células respondedoras (1/100 comparado con 1/10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> de células T Ag específicas) es producto de la manera en que pueden ser reconocidos los diferentes complejo péptido-CMH presentes en la superficie de las células del aloinjerto. Por lo tanto, finalmente la interacción entre CDs derivadas del donante y linfocitos T del receptor, permitirá la activación de las células T al recibir la señal 1, 2 y 3 de activación. Este reconocimiento se conoce como la vía directa de activación linfocitaria (Figura 7).

Una vez activados los linfocitos T, éstos proliferarán y se diferenciarán en células T efectoras, las que migrarán al órgano trasplantado, el cual infiltran y desarrollan sus funciones efectoras. Los linfocitos T CD4 contribuirán a generar una respuesta pro-inflamatoria que promueve el reclutamiento y activación de macrófagos, y los linfocitos T CD8 desarrollarán funciones citotóxicas contra células endoteliales y del parénquima del órgano trasplantado. En su conjunto, estos fenómenos llevan a la destrucción tisular y pérdida de funcionalidad del órgano, lo que se manifiesta clínicamente y se clasifica como rechazo. Como el número de CDs en el órgano trasplantado es finito, esta vía de activación es de mayor relevancia en el denominado rechazo celular agudo del injerto. Las terapias inmunosupresoras de depleción de linfocitos T (por ejemplo, el uso de timoglobulina) tienden a reducir las probabilidades de activación de las mismas por CDs derivadas del donante.

Es importante señalar que esta vía de activación, nunca podrá colaborar en la activación de los linfocitos B2. Esto se debe a que los linfocitos T CD4 no son activados por Ag el procesamiento del aloantígeno, sino por la complementariedad estructural de la MHC alógena. Por lo tanto, en el supuesto caso que el linfocito T CD4, activado por vía directa, se diferencie en un linfocito TFH, éste no expresará un TCR con capacidad de reconocer al aloantígeno procesado y presentado por los linfocitos B en el contexto de las MHC del receptor (Figura 8).

**Figura 8.** Colaboración T-B en la vía indirecta de aloreconocimiento pero no en la vía directa.





**Figura 9.** Vías de activación en los mecanismos de aloreconocimiento.

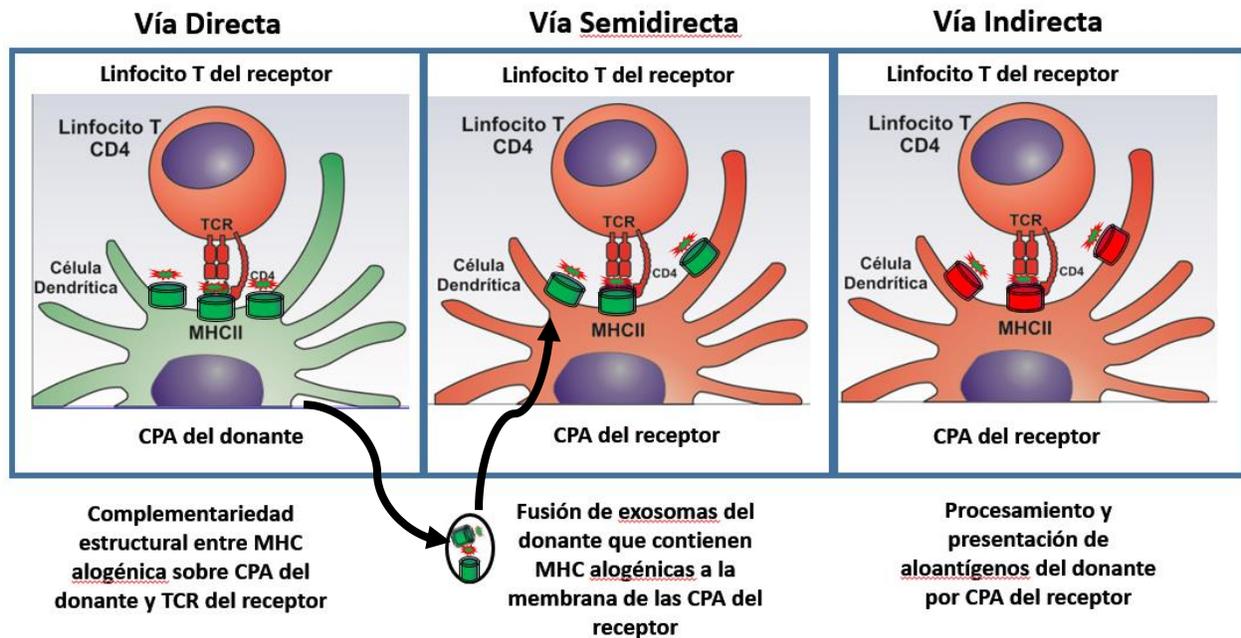
### Vía Indirecta

Simultáneamente a la migración de las CD del donante a los órganos linfáticos regionales del receptor, las CD del receptor o sus precursores infiltrarán el injerto (Figura 9). Este fenómeno se ve facilitado por el estado de activación del endotelio vascular debido a la IRI. Una vez reclutadas las CD del receptor en el injerto, las CD comenzarán a procesar, madurar y presentar aloantígenos derivados del donante. Estas CD se encontrarán con nuevos estímulos de maduración que surgen de las reacciones inflamatorias locales producidas como consecuencia de la respuesta inmune allogeneica generada por la vía directa de activación linfocitaria o incluso por la respuesta inmune innata desencadenada por los procesos de daño por isquemia-reperfusión. Los restos de células del órgano trasplantado (Ag del donante) serán fagocitados por estas CD del receptor, destacándose entre ellos los antígenos polimórficos tales como las moléculas alógenicas del CMH del donante que no están presentes en el receptor. Como ya fue mencionado, pero es importante remarcar, no existe tolerancia hacia esos aloantígenos, ya que son antígenos a los que el receptor nunca antes estuvo expuesto y, por lo tanto, los linfocitos T aloreactivos no sufren selección negativa en el timo. Estas CD del receptor, una vez que hayan madurado, llegarán a los órganos linfoides secundarios del receptor, presentando péptidos derivados de proteínas del donante. Este reconocimiento se conoce como la vía indirecta de activación linfocitaria (Figura 7 y Figura 9). Por lo tanto, en la vía indirecta, las células T y las CD, que interactúan son del receptor y los aloantígenos (alelos de HLA) procesados serán presentado en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad del receptor, de igual manera como se procesan los antígenos microbianos. Este tipo de activación cumple con el paradigma de restricción por el CMH y la frecuencia de activación de linfocitos T será similar a la generada por una infección microbiana. La única diferencia es el antígeno, que en lugar de ser un antígeno microbiano, corresponde a un aloantígenos del donante del trasplante. Este proceso puede ocurrir a lo largo de la vida del receptor, ya que el injerto se irá poblando de CD propias que, al

encontrarse con fragmentos celulares y estímulos madurativos, podrán fagocitar, madurar y migrar al ganglio drenante donde serán capaces de presentarlos a linfocitos T, generándose clones T capaces de reconocer proteínas del donante (Figura 7 y 9). Estos linfocitos T efectores desarrollarán funciones efectoras, colaborando con los macrófagos y CDs para generar una respuesta pro-inflamatoria que daña al órgano de manera continua, con manifestaciones subclínicas o clínicas. La estimulación crónica promueve el reclutamiento y activación de macrófagos, los que además comienzan a secretar factores tróficos para las células de la capa muscular de los vasos sanguíneos del órgano trasplantado, promoviendo su engrosamiento. Como en el caso anterior, estos fenómenos llevan a la destrucción tisular y pérdida de funcionalidad del órgano, lo que se manifiesta clínicamente y se clasifica como rechazo. Debido a que se requiere de un cierto tiempo para que los órganos trasplantados sean repoblados con un número suficientemente alto de CDs del receptor como para permitir que esta reacción se desarrolle, se cree que la vía indirecta de activación linfocitaria es de mayor importancia en el rechazo crónico del órgano trasplantado. Asimismo, la vía indirecta permite la generación de células T CD4 colaboradoras para la activación de linfocitos B que se diferencian a plasmocitos secretores de aloanticuerpos (Figura 7). Vale la pena mencionar que la vía indirecta es la vía de activación T normal frente a cualquier Ag extraño, mientras que la vía directa es un proceso que sólo se da en trasplantes pero no en la respuesta inmune contra agentes infecciosos. Por lo tanto, la frecuencia de clones T aloreactivos capaces de ser activados por CDs del receptor que infiltran el órgano trasplantado es similar a la de cualquier respuesta antígeno específica ( $1/10^5$  o  $10^6$ ). Además, la vía indirecta es capaz de generar linfocitos TFH con capacidad de colaborar en la activación de linfocitos B2, ya que las CDs del receptor y los linfocitos B2 son capaces de procesar y presentar el mismo aloantígeno (Figura 8).

### **Vía semi-directa**

Esta vía fue recientemente descrita y se refiere al proceso por el cual las células presentadoras de antígeno (CPA) del receptor adquieren moléculas de CMH, de clase I y/o de clase II, del donante a través de un proceso denominado cross-dressing. En este proceso, el contacto célula a célula entre CPA del donante y el receptor puede permitir la transferencia de componentes de la membrana incluyendo CMH intactos del donante a CPA del receptor (Figura 8 y 10). Por otro lado, las CPA del donante pueden liberar pequeñas vesículas llamadas exosomas, conteniendo CMH, las cuales pueden fusionarse con la membrana plasmática de CPA del receptor. La CPA del receptor, ahora quimérica, puede estimular células CD4 y CD8 tanto por vía directa como indirecta (Figura 8 y 9).

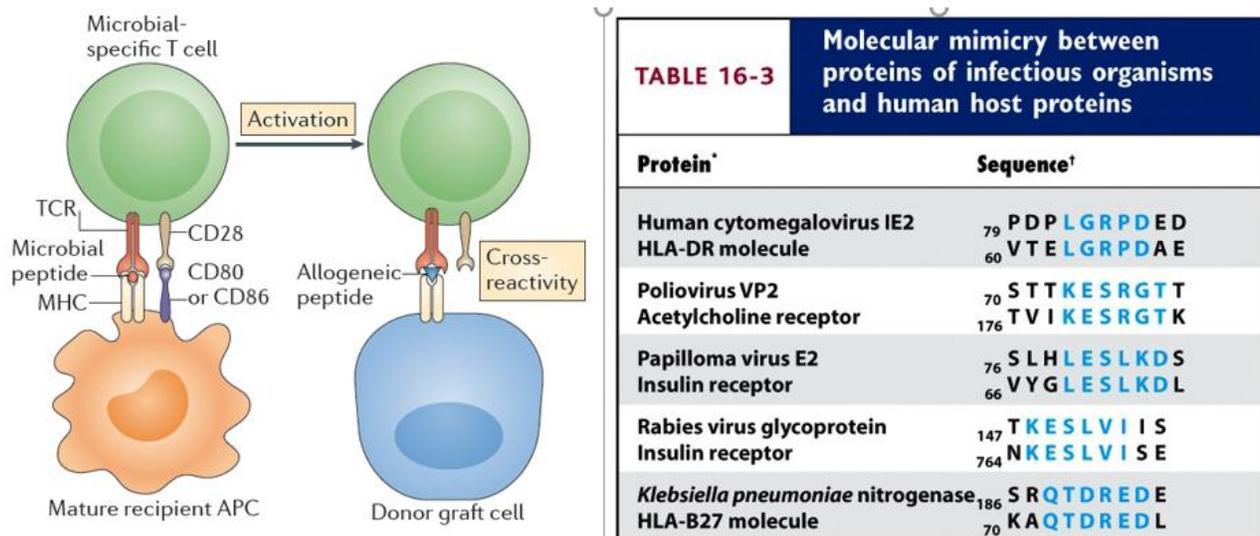


**Figura 10.** Comparación en la activación de las vías de aloreconocimiento.

### Respuesta aloinmune en pacientes sensibilizados

Muchos pacientes en lista de espera se encuentran sensibilizados a los aloantígenos del donante, pudiendo presentar aloanticuerpos y/o linfocitos T y B aloreactivos de memoria. Las causas de la alosensibilización se pueden deber a diferentes mecanismos. En primer lugar, se debe tener en cuenta que un paciente en lista de espera es una persona que ha sufrido o sufre una patología que, en muchos casos, necesitan de transfusiones de sangre. En estos casos la transfusión de sangre favorece la sensibilización a antígenos menores presentes en el eritrocito, que forman parte de los grupos sanguíneos Kell, Duffy, Kidd, entre otros. La transfusión de plaquetas, al expresar moléculas de HLA, favorece la sensibilización hacia estos aloantígenos. Otras causas de sensibilización deben buscarse en los embarazos múltiples o retransplantes. La patología de base del paciente también lo puede predisponer a mayor número de infecciones microbianas. La memoria inmunológica es consecuencia de las respuestas inmunes contra microorganismos. Por lo tanto, las infecciones pre-trasplante marcan el repertorio de linfocitos T de memoria, los que pueden activarse sin necesitan de grandes señales coestimuladoras. De esta manera se denomina inmunidad heteróloga al fenómeno inmunológico por el cual la exposición a algunos organismos puede alterar la respuesta del huésped a la posterior exposición a antígenos no relacionados (Figura 11). La base de la inmunidad heteróloga la da el mimetismo molecular y la plasticidad del repertorio T, siendo el mimetismo molecular la capacidad que tiene un TCR específico para un péptido antigénico microbiano de reconocer la misma secuencia en proteínas propias del huésped. Por otro lado, se denomina plasticidad del TCR a la capacidad que tienen algunos TCR de moldear sus sitios de anclaje de tal manera de poder interactuar con distintos puntos de unión para reconocer CMH alógenas-peptido endógeno y CMH singeneico-peptidos virales.

Un dato a tener en cuenta para poder entender la alta frecuencia de LT aloreactivos, es que el 50 % de la aloreactividad está mediada por LT naive y el otro 50 % por LT de memoria. Estos LT de memoria violan los criterios de activación de la respuesta inmune primaria, ya que no necesitan residir en los órganos linfáticos secundarios y tampoco necesitan tanta coestimulación para activarse. Por lo tanto, la respuesta alogénica mediada por LT de memoria permite que los mecanismos efectores sean mucho más fuertes que para las respuestas antígenos T específicas. Es importante mencionar que ninguna de las terapias inmunosupresoras actuales es capaz de disminuir el repertorio de linfocitos T de memoria. Por otro lado, se ha propuesto que existen linfocitos T de memoria del donante, en el parénquima del injerto, los que pueden activarse, migrar y generar algún fenómeno similar al que ocurre en la enfermedad injerto contra huésped. Otro aspecto interesante a destacar es el hecho que las personas mayores tienen un mayor repertorio de linfocitos de memoria, lo cual supondría que los receptores añosos de trasplante tendrían más eventos de rechazo. Por el contrario, como se mostró en la figura 3, los receptores añosos tienen menos porcentaje de rechazos agudos. Aún así, los receptores de trasplante en personas mayores, presentan una menor sobrevida del injerto. Se ha sugerido que esta menor sobrevida del injerto se debe a cambios que ocurren en los linfocitos T CD4 y CD8 a lo largo de la vida. Aparentemente, los individuos añosos tendrían un menor potencial de alorespuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>. En los individuos añosos, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> producirían menos IL-2, expresan menos CD28 y tendrían un mayor número de receptores NK (NKG2D); en tanto que los linfocitos CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>, tendrían mejor capacidad citotóxica, expresan CD57 y receptores de células NK (CD94/NKG2E). En conjunto, estas células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en personas añosas, serían menos eficientes en su capacidad de respuesta aloespecíficas y mucho más eficientes en la respuesta inmune citotóxica inespecífica.



**Figura 11.** Inmunidad heteróloga. Fenómeno por el cual un TCR específico para un péptido antigénico microbiano es capaz de reconocer una misma secuencia en moléculas de HLA propias y moldear sus sitios de anclaje a las moléculas del CMH alogénicas.

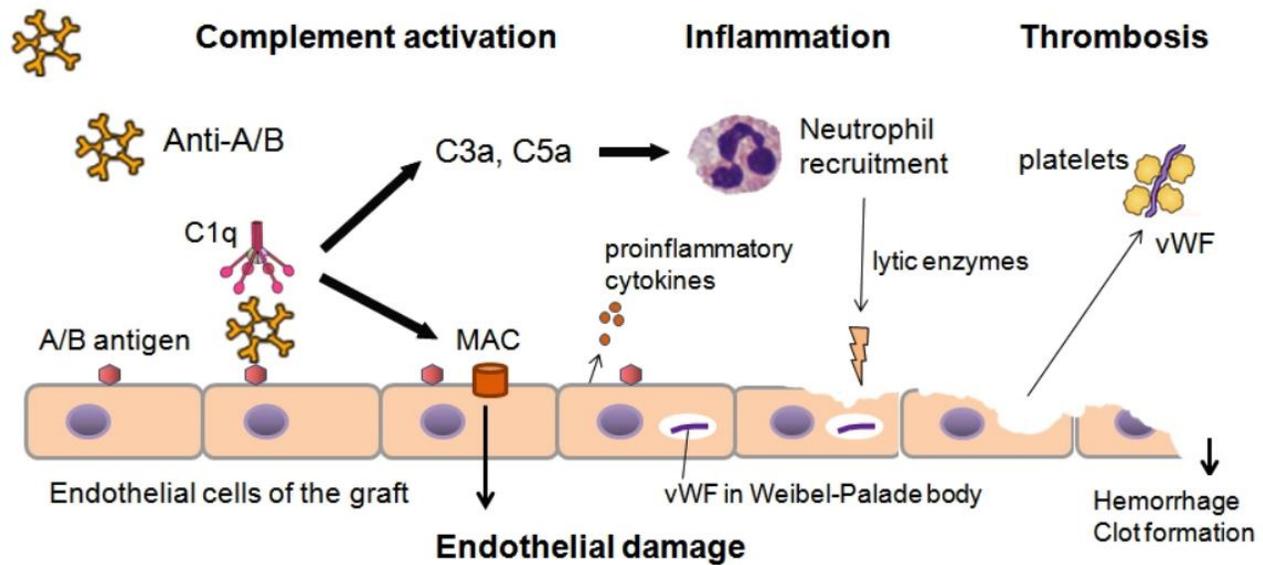
## **RECHAZO DEL ÓRGANO TRASPLANTADO**

Una vez realizado el trasplante, el rechazo del órgano es una de las principales complicaciones y es inevitable sin una terapia inmunosupresora adecuada. Los mecanismos efectores de una reacción de rechazo son múltiples y comprenden los mismos mecanismos efectores de una respuesta inmune convencional contra diferentes agentes infecciosos. La diferencia se observa en: i) la manera en que se produce la activación de estas células, ii) los antígenos reconocidos, iii) la frecuencia de activación de clones capaces de activarse y, iv) las consecuencias de dicha respuesta inmune.

Según la velocidad con la que aparecen los signos de rechazo, los mismos se clasifican en hiperagudos, agudos y crónicos. El rechazo hiperagudo puede manifestarse unos pocos minutos después del desclampeo y la revascularización del injerto y hasta 1 semana tras el trasplante del tejido. El rechazo agudo se inicia dentro de los primeros meses después del trasplante. El rechazo crónico puede aparecer meses o años después del trasplante, y contribuye a la pérdida paulatina de la función del órgano. Las causas del rechazo hiperagudo son siempre humorales, es decir están mediados por anticuerpos. En cambio, los rechazos agudos y crónicos pueden ser celulares y/o humorales.

### **Rechazo Hiperagudo**

El rechazo hiperagudo es un cuadro clínico grave que actualmente se puede prevenir en el mayor número de los pacientes trasplantados realizando un ensayo denominado “cross match” previo al trasplante. Este ensayo permite la detección (previa al trasplante) de anticuerpos aloreactivos preformados (ver sección laboratorio en trasplante). En general, se considera rechazo hiperagudo a aquel que se produce dentro de la primera semana post-trasplante. Este tipo de rechazo siempre está mediado por anticuerpos preformados presentes en el receptor del trasplante y que están dirigidos contra los antígenos de grupo sanguíneo ABO o contra las moléculas del CMH alogeneicas del donante; aunque se han visto casos de rechazos hiperagudos por anticuerpos anti-endotelio. Es un fenómeno que no se acompaña por infiltrado celular. En épocas pasadas, era frecuente observar este tipo de rechazo en la sala quirúrgica durante el proceso de desclampeo y reperusión. La perfusión de sangre proveniente del receptor al órgano trasplantado, permite la interacción de los aloanticuerpos a los aloantígenos presentes en el endotelio vascular del donante. La formación de los complejos antígeno-anticuerpo activa los mecanismos efectores tempranos tales como la activación del complemento. Si el proceso se mantiene en el tiempo, se producirá la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (Figura 12). Debido a la naturaleza tan intensa del estímulo, las proteínas regulatorias del complemento que controlan la activación sobre células propias no son suficientes para evitar la lisis celular. En la actualidad, este tipo de rechazo es infrecuente, gracias a los estudios en el período pretrasplantes y a las nuevas terapias inmunosupresoras.



**Figura 12.** Rechazo Hiperagudo. En un individuo sensibilizado, los anticuerpos se unirán a la superficie de las células que expresen el antígeno, formando los complejos inmunes antígeno-anticuerpo, llevando a la activación del complemento por la vía clásica. Luego se produce la migración de neutrófilos, el daño endotelial, la activación plaquetaria, la trombosis, la oclusión vascular, seguido por la isquemia tisular que agrava el daño tisular.

### Rechazo Agudo

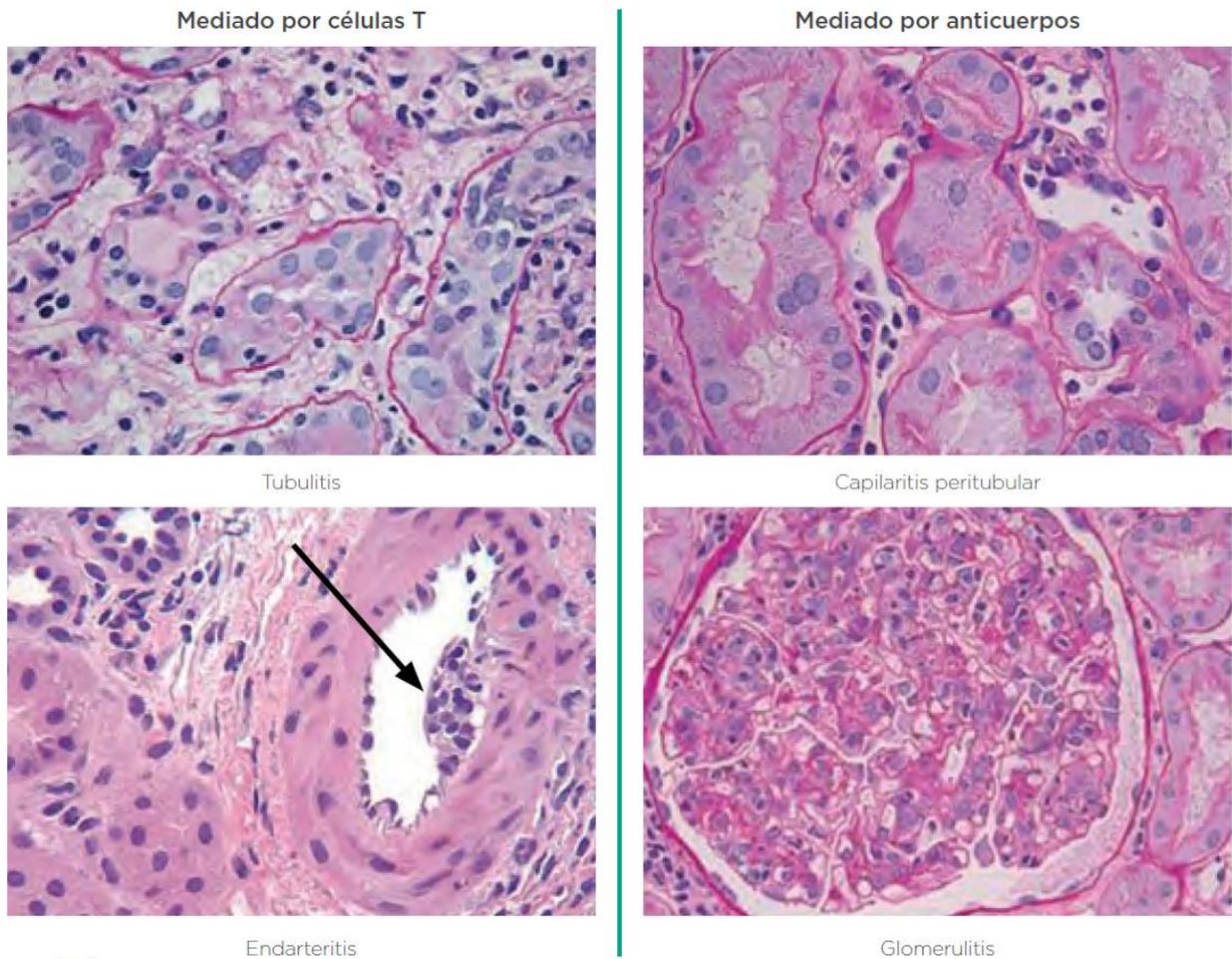
A diferencia del rechazo hiperagudo que es mediado por anticuerpos, el rechazo agudo puede ser mediado por células y/o anticuerpos, y se denominan rechazo celular, humoral o mixto. En el Además, estos cuadros se pueden presentar con o sin signos de actividad inmunológica. Para los trasplantes renales, cada uno de estos cuadros se diagnostican en base a criterios histológicos establecidos por un grupo de consenso conformado por patólogos denominado grupo Banff y que se van actualizando año tras año.

En el rechazo humoral agudo, los eventos comienzan cuando los anticuerpos donante específicos DSA (donor specific antibodies) (pre-existentes o *de novo*) se ponen en contacto con las células endoteliales. La formación de los complejos inmunes antígeno-anticuerpo activará la cascada del complemento con la formación de opsoninas, anafilotoxinas, factores quimioattractantes y, finalmente, con la formación del complejo de ataque lítico, que termina por desestabilizar osmóticamente a las células endoteliales y desemboca en la edematización y la necrosis celular. A estos eventos se suma la activación de la cascada de la coagulación, con el depósito de fibrina, la oclusión de la luz del capilar (por trombosis) y la presencia de eritrocitos y células inflamatorias. En resumen, el rechazo humoral agudo conduce a la activación del complemento que provoca la lesión lítica de la célula y la necrosis, la cascada de la coagulación que causa trombosis y el reclutamiento de las células inflamatorias, que se manifiesta como glomerulitis y capilaritis (Tabla 6).

**Tabla 6.** Características de los rechazos humorales agudos en trasplante renal

<b>Características del rechazo humoral agudo</b>	
<b>Evento histológico</b>	<b>Mecanismo</b>
Necrosis	Por activación de la cascada del complemento
Trombosis	Por activación de la cascada de la coagulación
Glomerulitis - Capilaritis	Por reclutamiento de leucocitos

En la Imagen 1 puede apreciarse una glomerulitis con varias células con los núcleos multilobulados (neutrófilos) y los capilares ocluidos por las células inflamatorias y el edema celular. En la capilaritis se observa una acumulación de los núcleos de las células inflamatorias y la línea rosada representa la membrana basal de los túbulos. Este es un proceso agudo activo que daña al endotelio.

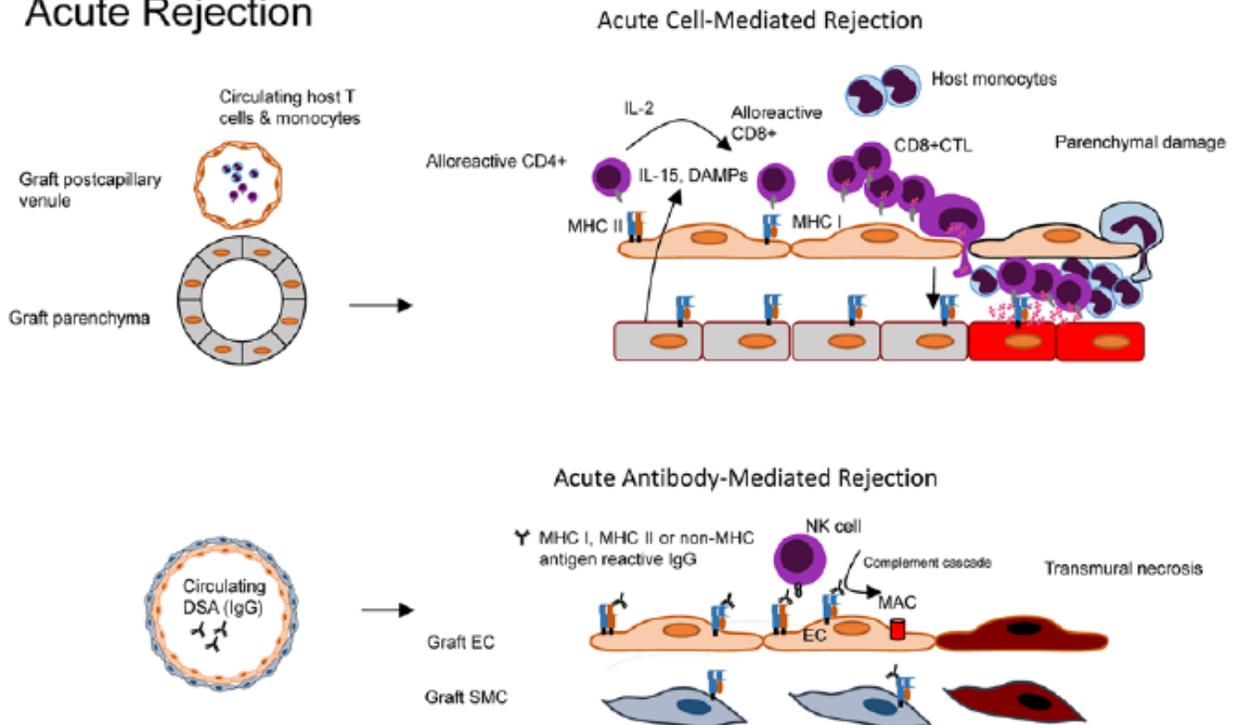


Los rechazos agudos celulares agudos (Imagen 1), se desencadenan de una manera aloantígeno específica, pero los mecanismos efectores que conducen a la destrucción del injerto no son específicos. La característica principal es la presencia de un gran infiltrado inflamatorio, predominantemente de linfocitos T citotóxicos, acompañados de monocitos/macrófagos a nivel tubular. Probablemente estas células T citotóxicas, provengan de la activación de linfocitos T

CD8 naive o de la reactivación de linfocitos T CD8 de memoria. Aparentemente, las señales coestimulantes CD40/CD154 juegan un papel importante en este proceso. Una vez que los LT citotóxicos migran al sitio del injerto e identifican las moléculas alogénicas de clase I, liberarán el contenido de sus gránulos que contienen perforina y granzima B y aumentan la expresión de FasL, promoviendo la muerte celular por apoptosis. Las células Th1 aloantígeno específicas también contribuyen a la fase efectora del rechazo de aloinjerto a través de un fenómeno de hipersensibilidad retardada, que se caracteriza por la producción de mediadores solubles, incluidas las citoquinas proinflamatorias IL-1, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . El daño al injerto ocurre como resultado de la infiltración de leucocitos activados y la producción de mediadores no específicos, como óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno.

En la siguiente tabla (Tabla 7 y Figura 13) se resumen un cuadro comparativo con los criterios histopatológicos utilizados para el diagnóstico de rechazo renal celular y humoral agudo.

## Acute Rejection



**Figura 13.** Mecanismos fisiopatológicos de los rechazos celulares (A) y humorales agudos (B).

**Tabla 7.** Características de los rechazos agudos del trasplante renal

<b>Mediado por células T</b>	<b>Mediado por anticuerpos</b>
Inflamación túbulo-intersticial (células T, monocitos/macrófagos, eosinófilos)	Inflamación microvascular (neutrófilos, macrófagos, entre otras)
TUBULITIS	GLOMERULITIS Y CAPILARITIS
Edema intersticial (vacuolas claras en el intersticio)	Trombosis capilar, necrosis fibrinoide y arterial (en casos severos)
Endarteritis o arteritis de la íntima	Endarteritis
	C4d (en capilares peritubulares) <sup>1</sup>

<sup>1</sup>La presencia de C4d es de ayuda en el diagnóstico de rechazo agudo mediado por anticuerpos, pero la ausencia de C4d no descarta el rechazo humoral cuando en la biopsia se observa inflamación microvascular y se ha confirmado la presencia de anticuerpos contra el donante.

La activación del complemento es un evento que acompaña a los rechazos humorales agudos. En este sentido, el componente C4d se genera al activarse el sistema de complemento por la formación de los complejos inmunes antígeno-anticuerpo; en estos casos formados por los anticuerpos anti-HLA y las moléculas de HLA sobre las células endoteliales. El C4d posee la particularidad de permanecer estable sobre las células endoteliales, y se puede poner en evidencia por inmunohistoquímica en tejidos fijados o por inmunofluorescencia en tejidos frescos; este último método presenta una sensibilidad considerablemente mayor. La presencia de C4d puede ser de ayuda en el diagnóstico del rechazo agudo mediado por anticuerpos, aunque la ausencia de este componente no descarta el rechazo humoral. Cuando el C4d es negativo, es importante reconocer las lesiones endoteliales características del rechazo humoral, ya que algunas de ellas estarán presentes aun cuando el C4d sea negativo. En otras palabras, es posible llevar a cabo el diagnóstico de rechazo humoral incluso en ausencia de dicho componente.

Con la introducción de nuevas terapias inmunosupresoras, se comenzó a observar que la mayoría de los rechazos ocurrían durante el año posterior al trasplante. Según los criterios establecidos, se arribó a la conclusión de que los rechazos celulares y humorales puros eran relativamente raros. Desde el punto de vista histológico, muchos rechazos presentaban tubulitis y capilaritis, con o sin depósito del factor de complemento denominado C4d, dando lugar a los cuadros histológicos mixtos. De todas formas, lo que queda en claro es que la capilaritis, con o sin C4d, constituye un indicador de la presencia de anticuerpos asociado con una peor sobrevida del injerto. A partir de esta información se estableció que para el diagnóstico de rechazos humorales agudos se requería la presencia de: capilaritis, trombosis capilar, necrosis tubular, C4d positivo o negativo, señal de daño endotelial a nivel molecular y anticuerpos anti HLA donante específicos (DSA, *donor specific antibodies*) detectables en suero. Por lo tanto, la presencia de los DSA es clínicamente muy relevante. Se conoce que, entre los pacientes hiperinmunizados, el 30% desarrollará rechazo humoral agudo, el 45% rechazo humoral crónico al año y el 30% perderá el riñón en un período de 5 años. En los pacientes trasplantados no hiperinmunizados, el 20% desarrollará DSA en 3-4 años y el 15% glomerulopatía del trasplante. Por otra parte, el riesgo se incrementa de forma proporcional con el transcurso del tiempo. Un 25% a un 80% de los pacientes con glomerulopatía del trasplante perderá el riñón; existen

algunos factores de riesgo como, por ejemplo, niveles de DSA pretrasplante, episodios de rechazos agudos, edad (el riesgo es mayor en jóvenes), mala adherencia al tratamiento, entre otros. Las manifestaciones histológicas son mayores cuando hay anticuerpos contra HLA de tipo II. No obstante, la relación no es absoluta, y tanto el tipo I como el tipo II pueden causar daño en el injerto. Además de los DSA contra HLA, también se han descrito otros anticuerpos que pueden provocar rechazo humoral, como, por ejemplo, aquellos contra el grupo sanguíneo ABO, contra el receptor de angiotensina II de tipo 1 (angiotensin II receptor type 1, ATR1), contra MICA (MHC class I-like chain A) y otros anticuerpos contra el endotelio no del todo definidos.

### Rechazo Crónico

Con respecto a los rechazos crónicos, también se clasifican en celulares y humorales. Conceptualmente, el proceso de rechazo renal crónico sufrió importantes cambios a lo largo de los últimos años. Tradicionalmente se pensaba que el rechazo celular agudo evolucionaba con el tiempo hacia el rechazo celular crónico, en tanto que el rechazo humoral agudo se convertía en rechazo humoral crónico. Este concepto tuvo que ser revisado, debido a que el 70% de los pacientes que presentaban un cuadro histológico de rechazo humoral crónico carecían de evidencias ciertas de episodios de rechazos humorales agudos. De esta manera, era probable que la mayoría de los rechazos humorales crónicos progresaran de manera subclínica o bien como rechazos celulares no resueltos. Ambos casos son difíciles de probar en la clínica, aunque no quedan dudas respecto al aumento que se observa en los niveles de anticuerpos contra HLA de clase I y, fundamentalmente, de clase II luego de los episodios de rechazo. De esta manera, se puede concluir que el rechazo celular agudo puede resultar en rechazo celular crónico (pero actualmente es poco frecuente). El rechazo celular agudo también predispone a la formación de anticuerpos contra el injerto que, años más tarde, puede resultar en rechazo humoral crónico. El rechazo humoral agudo muy frecuentemente progresa hacia el rechazo humoral crónico. La mayoría de los pacientes con rechazo humoral crónico no presentan antecedentes de rechazo agudo, lo que sugiere que el daño renal mediado por anticuerpos puede progresar de forma subclínica. El rechazo humoral crónico se encuentra claramente relacionado con inmunosupresión insuficiente; esto significa la minimización de los fármacos inmunosupresores por el médico o por el propio paciente.

Desde el punto de vista histopatológico, los cambios crónicos pueden ser específicos (de alguna patología) o inespecíficos. Los mismos se resumen en la Tabla 8 y se muestran en la imagen 2.

**Tabla 8.** Cambios crónicos observados en el trasplante renal

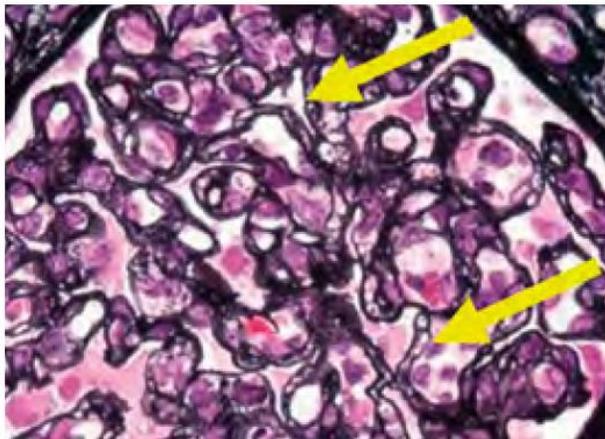
<b>Específicos</b>	<b>Inespecíficos</b>
Arteriopatía crónica del trasplante.	Fibrosis intersticial y atrofia tubular (IF/TA).
Glomerulopatía del trasplante <sup>1</sup>	Esclerosis arterial (por ejemplo, hipertensión arterial).
CD4 en capilares peritubulares <sup>1</sup>	Esclerosis glomerular.

Multilaminación en capilares peritubulares <sup>1</sup>	Hialinosis arteriolar.
Recidivas de glomerulonefritis <sup>2</sup>	
Nefropatía por BK <sup>2</sup>	
Desarrollo de diabetes mellitus (de novo o recurrencia) <sup>2</sup>	
Otras causas definidas (ejemplo, reflujo) <sup>2</sup>	

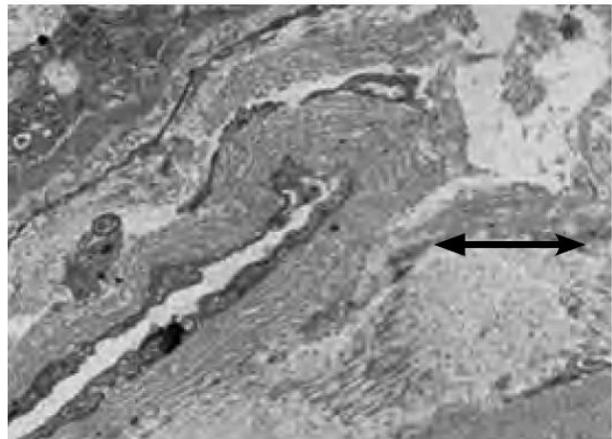
<sup>1</sup>Cambios relacionados con el rechazo humoral crónico; <sup>2</sup>Etiología específicas que causan daño renal.

Dentro de los cambios específicos existen alteraciones que se producen como consecuencia de la respuesta inmune celular y otras a causa de la respuesta inmune humoral. El daño celular se manifiesta como una arteriopatía crónica del trasplante (aunque infrecuente), que puede ser activa (cuando se observa fibrosis e infiltrados inflamatorios) o inactiva (cuando predomina la fibrosis).

Imagen 2. Cambios crónicos específicos (rechazo humoral).



Glomerulopatía del trasplante



Multilaminación

Desde el punto de vista histopatológico, en el proceso humoral crónico, el endotelio también es el blanco de acción de los anticuerpos. En estos casos, las células endoteliales se encuentran edematizadas y pierden las fenestraciones (Imagen 2), que constituye una manifestación subaguda del contacto continuo del anticuerpo con el endotelio. Luego de este período inicial, las células se separan gradualmente de la membrana basal, por lo que se genera un espacio donde se acumulan desechos celulares y material proteico, y comienza a formarse una segunda membrana basal. Este proceso forma parte de una remodelación tisular que define al rechazo humoral crónico. La membrana basal del capilar peritubular también se ve afectada, observándose una acumulación de capas produciendo imágenes denominadas “multilaminación”. De esta manera, la definición de lo que constituye el rechazo crónico es dada por el remodelamiento que acompaña a las células inflamatorias, que se pueden encontrar tanto en las manifestaciones agudas como en las crónicas. A las lesiones microvasculares crónicas de remodelamiento se las denomina “glomerulopatía” y “capilaropatía” del trasplante, y se caracterizan por imágenes de duplicación de la membrana basal glomerular y multilaminación de

la membrana basal peritubular, respectivamente. Como parte del proceso crónico se observa una acumulación de células inflamatorias, adquiriendo las características de una glomerulitis y capilaritis.

De esta manera, las lesiones microvasculares crónicas se manifiestan de acuerdo con las siguientes características:

<b>Tabla 9. Características de las lesiones microvasculares crónicas</b>	
Duplicación de la membrana basal glomerular	Glomerulopatía del trasplante
Multilaminación de la membrana basal peritubular	Capilaropatía del trasplante
Acumulación de células inflamatorias	Glomerulitis - Capilaritis

Recientemente se ha reconocido que también puede haber daño endotelial en las arterias de mayor calibre (arteritis intimal), aunque esta última también puede ser encontrada en los rechazos celulares. En los rechazos humorales crónicos se debe considerar que, además de la presencia del componente primario crónico, también será posible observar de forma concomitante un proceso agudo activo. De esta manera, las imágenes histológicas presentarán una combinación de componentes de remodelamiento y un elemento agudo, activo. Estas situaciones corresponden al rechazo crónico activo.

### **Estrategias Terapéuticas para favorecer la sobrevida del injerto**

Existen varias instancias en las que se puede intervenir para evitar la pérdida del injerto trasplantado y/o aumentar la sobrevida del aloinjerto. Estas instancias van desde el proceso de mantención del donante cadavérico con muerte encefálica, pasando por la etapa de ablación y procuración del órgano, seguida por el mantenimiento del órgano, el trasplante y el tratamiento del receptor del injerto previo y posterior al trasplante. Algunas de estas etapas más relevantes se detallan a continuación.

### **Técnicas de conservación y líquidos de preservación**

Como se describió previamente los órganos que se utilizan para trasplantar sufren una gran alteración de su homeostasis cuyo efecto se pone en evidencia en la recuperación funcional del injerto en el post-trasplante. Existen diferentes técnicas de preservación y líquidos de perfusión que tratan de mitigar el impacto de la isquemia. En Argentina, el método de preservación utilizado para minimizar el daño es la preservación hipotérmica estática cuyo fundamento es la reducción del metabolismo celular, colocando el órgano a 4°C. Sin embargo, la preservación de los órganos sólidos vascularizados comienza previo a la ablación reemplazando la sangre con una solución diseñada específicamente para optimizar la tolerancia del órgano a la hipotermia y a la falta de oxígeno. Existen diversas soluciones de preservación, por ejemplo la solución de la Universidad de Wisconsin (UW), EuroCollins (EC) y HTK (Histidina-Triptofano-Cetoglutarato). La solución de la UW es la más aceptada y se suele utilizar en trasplante renal, hepático y pancreático. Estos líquidos de preservación son soluciones que tratan de evitar la edematización celular dada por la inactividad de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, mantienen una osmolalidad y pH similar al plasma, evitan el edema intersticial y el colapso capilar y la oxidación de las estructuras celulares. Además de los métodos de preservación hipotérmicos estáticos también existen

máquinas de perfusión hipotérmica, la cual permite una preservación en frío más prolongada y efectiva debido al aporte continuo de oxígeno, sustratos para la síntesis de ATP y otros metabolitos, y facilita el lavado de los desechos del metabolismo celular. Con esta técnica se logra mejorar la recuperación funcional del injerto y aumentar la sobrevida del órgano a largo plazo.

### **Prevención del rechazo alógeno**

Previo a realizar un trasplante se debe valorar la compatibilidad antigénica entre el receptor y el donante, con la finalidad de optimizar la sobrevida del injerto y minimizar posibles reacciones inmunológicas. Para lograr este objetivo, normalmente se realizan cuatro determinaciones. En primer lugar, es necesario establecer la compatibilidad del grupo sanguíneo ABO/Rh. Sin embargo, en circunstancias especiales de riesgo de vida inminente (por ejemplo, falla fulminante hepática) se puede considerar realizar el trasplante ABO incompatible, previa eliminación de los anticuerpos a través de la realización de plasmaféresis perioperatoria y el uso de fármacos anti-linfocitos B como el rituximab (anticuerpos anti-CD20). Además de establecer la compatibilidad del grupo sanguíneo, también se debe proceder a la tipificación de los antígenos HLA clase I y II, buscando la máxima compatibilidad posible entre el donante y el receptor.

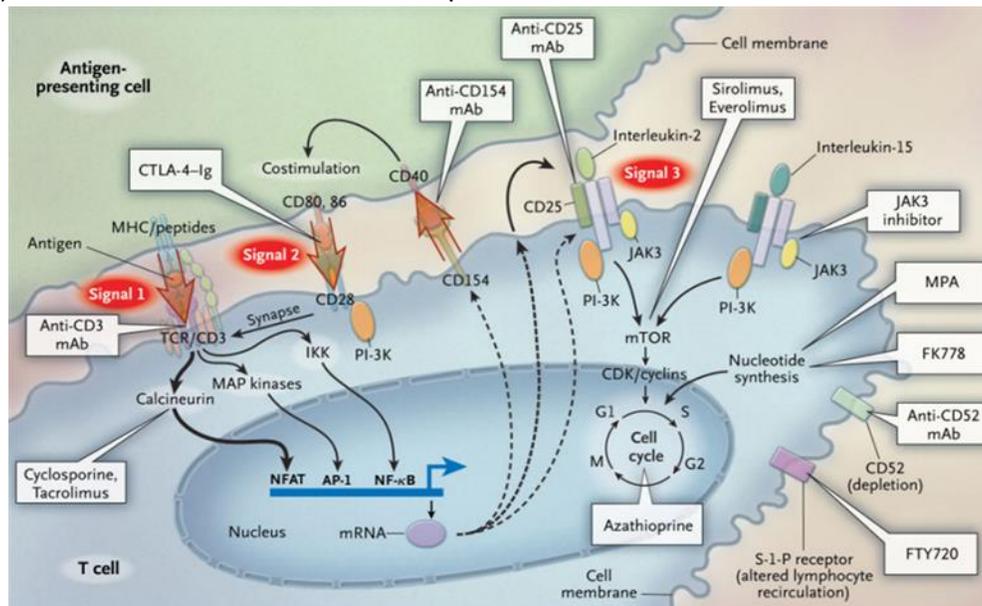
También es fundamental determinar la existencia de anticuerpos preformados contra antígenos HLA. Para lo cual se realizan pruebas específicas denominadas “cross match o prueba cruzada” que consiste en incubar el suero de un posible receptor con linfocitos del donante (ver más abajo). Estos linfocitos se obtienen del bazo o ganglios linfáticos si se trata de un donante cadavérico o de sangre periférica si se trata de un donante vivo. En el caso de tener una reacción positiva, esta se interpreta como la existencia de anticuerpos específicos contra el donante (DSA, *donor specific antibody*), descartando la intervención. Por el contrario, en trasplante hepático, no siempre suele realizarse la prueba cruzada. Esto es debido a que no está clara su relevancia en este tipo de trasplante, sumado a que el número de donantes como el tiempo de isquemia que tolera este tipo de órganos es menor y usualmente suelen darse en situaciones de urgencia.

Una vez que se establece la compatibilidad, y se procede con el trasplante, es necesario comenzar con la inmunosupresión del receptor. Dicho tratamiento será necesario mientras el paciente posea el injerto ya que el objetivo es prevenir y controlar la respuesta inmune del receptor. El tratamiento debe ser individualizado existiendo múltiples combinaciones adaptables a las características clínicas y serológicas de cada paciente, al momento en curso del trasplante y a la experiencia de cada centro. El tratamiento inmunosupresor tiene dos etapas. En la etapa inicial, denominado tratamiento de inducción, se trata de lograr una inmunosupresión potente e intensa para prevenir el rechazo en la fase de máxima respuesta inmunológica que se produce en las primeras semanas post-trasplante.

Los fármacos que se utilizan en el tratamiento de inducción son: i) timoglobulina o rATG (policlonal anti-T) que depletan de linfocitos, ii) basiliximab (anticuerpo bloqueante de CD25) o daclizumab (anticuerpo bloqueante de CD25) que bloquean la acción de la IL-2, iii) alemtuzumab (anticuerpo monoclonal humanizado contra CD52) que también depleta de linfocitos. En la mayoría de los protocolos de inmunosupresión de inducción se utiliza una combinación de tres fármacos (“triple terapia”): i) un inhibidor de la calcineurina, ii) un antiproliferativo y iii) esteroides. La inducción con un anticuerpo poli- o monoclonal (“terapia cuádruple”) está indicada para

pacientes con elevado riesgo inmunológico o en aquellos pacientes en los que es conveniente evitar el uso de los anticalcineurínicos en la fase de inducción. En otras situaciones, de menor riesgo inmunológico, se decide reemplazar las terapias depletoras de linfocitos con bloqueantes de los receptores de IL-2, como por ejemplo el Basiliximab.

Luego de la terapia inmunosupresora de inducción, le sigue una terapia inmunosupresora denominada de mantenimiento que tiene como objetivo conseguir a largo plazo una buena función del injerto con la máxima supervivencia y calidad de vida del receptor. Es necesario que el tratamiento sea lo menos agresivo posible y se encuentre correctamente regulado, ya que una sobre-inmunosupresión favorecerá la aparición de infecciones oportunistas y tumores, en tanto que una sub-inmunosupresión favorecerá el rechazo del injerto. Para las terapias de mantenimiento existen una serie de drogas inmunosupresoras que se utilizan habitualmente en trasplante. Cada una de ellas difiere en sus mecanismos de acción que se resumen en las Figuras 14. Las drogas inmunosupresoras de mantenimiento más difundidas son los corticosteroides, los inhibidores de calcineurina tales como la Ciclosporina A y el FK506 (Tacrolimus), los inhibidores de otras vías de señalización linfocitaria tales como la rapamicina (Sirolimus), los inhibidores de biosíntesis de purinas tales como el micofenolato mofetil.



**Figura 14.** Mecanismo de acción de drogas inmunosupresoras.

El mecanismo de acción de los inhibidores de calcineurina, como la ciclosporina y el tacrolimus (FK506) es a través de su capacidad de unión a la calcineurina. Esta es una fosfatasa intracelular que se encuentra en las células T y que funciona defosforilando ciertas proteínas reguladoras de la transcripción de genes, capaces de activar la transcripción de ciertas citoquinas (IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) que promueven la activación de las células T. La ciclosporina se une al receptor citoplasmático llamado ciclofilina, mientras que el tacrolimus se une al receptor citoplasmático conocido como proteína de unión al FK (FKBP: FK-binding protein). Tanto la ciclosporina-ciclofilina y el tacrolimus-FKBP se unen a la calcineurina, evitando su funcionamiento normal y de esta forma bloqueando la activación de las células T (Figura 14).

Otra de las drogas inmunosupresoras que suelen recibir los pacientes trasplantados son los inhibidores de la síntesis de las purinas, como la azatioprina o el micofenolato mofetil. Estas drogas, suprimen el proceso de replicación génica y proliferación celular por la inhibición de la síntesis de ARN y ADN (Figura 14). La azatioprina es un análogo de las purinas, mientras que el micofenolato mofetil inhibe en forma reversible a la inosina monofosfato dehidrogenasa (IMPDH) que es crítica en la síntesis de dichas moléculas (Figura 14). Existen otras drogas inmunosupresoras que tiene otros blancos de acción. Por ejemplo, la rapamicina actúa sobre una quinasa denominada mTOR, que es importante en la regulación del ciclo celular. La inhibición de la quinasa por rapamicina, sirolimus (SRL) o everolimus bloquea la señal de proliferación en las células T, impidiendo su ingreso en la fase S del ciclo celular (Figura 14). Resulta interesante señalar que la rapamicina, tiene efectos inmunosupresores sobre la respuesta inmune adaptativa, pero también presenta efectos inmunoestimuladores que se resumen en la siguiente tabla 9:

<b>Inmunosupresores</b>	<b>Inmunoestimuladores</b>
Diferenciación a LTreg	CDs mieloides tratadas con Rapamicina aumenta la IL-12
Cambio en el tráfico celular	Aumenta la presentación antigénica por la autofagia inducida por Rapamicina
Suprime la diferenciación y la maduración de CDs	Favorece la diferenciación de LT CD8 de memoria

**Tabla 9.** Efectos inmunosupresores e inmunomoduladores por la inhibición de mTOR.

A pesar de los efectos benéficos que tienen las drogas inmunosupresoras para evitar el rechazo de los órganos trasplantados, también tienen múltiples efectos adversos. Uno de los efectos más importantes de los inhibidores de calcineurina es la nefrotoxicidad, que puede manifestarse en forma aguda o crónica. En la forma aguda muestra cambios hemodinámicos reversibles en la vasculatura glomerular y lesiones como la vacuolización isométrica de las células tubulares y la hialinosis arteriolar. En la forma crónica se ve fibrosis intersticial y atrofia tubular con la eventual pérdida del injerto. La principal estrategia para hacer frente a dicha nefrotoxicidad incluye la minimización o eliminación de este tipo de fármacos, con o sin la conversión a rapamicina.

Actualmente, se dispone de otro tipo de terapias inmunosupresoras, que consiste en la utilización de biológicos que tratan de evitar la activación T, al bloquear la coestimulación. Algunos de los cuales se utiliza en la terapia de inducción y en la desensibilización mencionados más arriba. El primero de los productos biológicos fue el Alemtuzumab (Campath) que es un anticuerpo monoclonal humanizado contra CD52. Alemtuzumab provoca el agotamiento rápido y profundo de linfocitos T y B. Otro de los fármacos biológicos es el basiliximab el cual es un anticuerpo

monoclonal dirigido contra CD25 (cadena alfa de alta afinidad del receptor de IL-2). El rituximab es un anti-CD20 expresada en los linfocitos pre-B y B maduros pero no en células hematopoyéticas, células pro-B y células plasmáticas normales. También están los anticuerpos policlonales como la globulina anti-linfocítica. Estos anticuerpos tienen su blanco de acción sobre linfocitos T y B, CD8, NK y células endoteliales. No afecta a los granulocitos, y la depleción de linfocitos T en sangre y tejidos linfoides está mediada a través de la lisis por complemento y apoptosis por activación del Fas-FasL.

Otra droga que ha sido recientemente introducida es el belatacept. Esta se trata de una proteína de fusión constituida por moléculas de CTLA-4 fusionados con fragmentos de Fc y tienen como objetivo unirse a las moléculas CD80 y CD86, para evitar que las mismas activen a la molécula CD28 presente en la membrana de los linfocitos T. De esta manera se bloquean las señales coestimuladoras mediadas por CD80 y CD86. El belatacept es un potente inmunosupresor. Los costos del mismo son elevados y aparentemente tendrían una mejor sobrevida del paciente al evitar los problemas de adherencia al tratamiento y los efectos adversos de los inmunosupresores clásicos (nefrotoxicidad y cardiovasculares), ya que en estos casos la administración de la droga es mensual en los centros de trasplante. Aun así, se ha informado que los pacientes tratados con bloqueantes de moléculas coestimuladoras presentan un número mayor de episodios de rechazos en la fase aguda y mayor incidencia de infecciones.

Los problemas asociados a todos estos tratamientos son la inmunosupresión generalizada, las infecciones, la alta incidencia de recidivas y la aparición de enfermedades malignas (debido al efecto negativo de los inmunosupresores sobre las células del sistema inmune que ejercen la inmunovigilancia contra tumores) y, en muchos casos, no se conocen los efectos que estas drogas tienen sobre el rechazo crónico a largo plazo o la toxicidad. Por ejemplo, la Ciclosporina A y el tacrolimus ha mostrado tener cierta toxicidad sobre el riñón a largo plazo. Estos problemas hacen que la búsqueda de nuevas estrategias de inducción de tolerancia específica contra los antígenos del HLA del órgano trasplantado (en el caso del trasplante de órganos sólidos vascularizados) siga siendo la meta final en las investigaciones en este campo. En la actualidad, nos conformamos con realizar tipificaciones de alelos del HLA de buena calidad para seleccionar pares donante-receptor con el menor número de disparidades posibles, tratamos de reducir el tiempo de isquemia realizando operativos de trasplante eficientes, optimizamos las determinaciones de anticuerpos e instauramos eficientes terapias inmunosupresoras. Gracias a todos estos procedimientos de seguridad, las tasas de rechazo agudo han disminuido notablemente, mejorando de esta manera los resultados del trasplante a corto plazo. Sin embargo, por desgracia, a largo plazo las tasas de sobrevida del trasplante más allá de 5 años no han logrado una mejoría significativa en la última década. Una de las hipótesis que se maneja para esta discrepancia, es que los mismos tratamientos inmunosupresores que son efectivos en las etapas tempranas favorecen los mecanismos de fibrosis a largo plazo, responsables de la disfunción crónica del injerto.

### **Tratamiento del paciente sensibilizado**

Todo paciente trasplantado es sometido a tratamientos inmunosupresores que lo exponen a una mayor vulnerabilidad a infectarse con diferentes patógenos. Como fue mencionado, el

tratamiento es de inducción (previo al trasplante) y de mantenimiento (posterior al trasplante). Pero hay pacientes sensibilizados (es decir que tienen altos títulos de aloanticuerpos) que no pueden ser trasplantados por la alta probabilidad de inducir un rechazo hiperagudo. En estos pacientes sensibilizados, para que puedan ser trasplantados se intenta la desensibilización a través de algunos protocolos de desensibilización que consisten en: i) la remoción de anticuerpos por plasmaféresis, ii) la inhibición de la producción de anticuerpos con un anticuerpo monoclonal que tiene su blanco de acción en la molécula CD20 expresada en linfocitos B (Rituximab) o (anti-CD20) o induciendo la apoptosis de linfocitos B al inhibir el proteosoma (Bortezomib), iii) la inhibición del complemento utilizando un anticuerpo monoclonal quimérico contra C5a (Eculizumab), iv) la administración de IVIG (ver más abajo mecanismo de acción), o v) realizando una esplenectomía.

De todos ellos resulta llamativo la utilización terapéutica de las inmunoglobulinas humanas. La gammaglobulina humana es una fracción del plasma, desarrollada para uso terapéutico, que incluye la mayoría de los anticuerpos presentes en el plasma. Esta misma fracción está constituida en su mayoría por inmunoglobulina G (IgG) pura; de ahí el antiguo nombre de gammaglobulina y la actual identificación como IgG. Cuando la preparación es adecuada para el uso intravenoso se denomina gammaglobulina humana endovenosa (IGIV).

La IgG corresponde a más del 90% de la fracción gamma de las proteínas del suero, por lo que los beneficios obtenidos de la terapia con gammaglobulinas son debidos a la acción de la IgG sobre sus blancos en el organismo. Las características más relevantes de la IgG para su acción terapéutica son:

- La IgG comprende cerca del 15% de las proteínas del suero y alrededor del 80% de los anticuerpos séricos totales.
- Su vida media es prolongada: entre 20 y 30 días
- Difunde muy bien a los tejidos
- Tiene una buena actividad anti bacteriana, anti viral, anti toxina y anti protozoaria
- Los receptores para la fracción Fc gamma se encuentran en múltiples células involucradas en la respuesta inmune
- Es la única que cruza la placenta

La IGIV se obtiene del plasma de voluntarios sanos recolectado de un mínimo de 1000 donantes (idealmente entre 5000 y 10000 donantes) para asegurar una alta concentración y una adecuada diversidad de anticuerpos contra agentes infecciosos y toxinas. Además el producto debe estar libre de actividad precalicreína, kininas, plasmina, agregados de proteínas y preservativos y debe contener un rango de concentración normal de subclases de IgG con al menos un 90% de IgG intacta, con buena actividad biológica y un amplio espectro de anticuerpos, principalmente contra tétanos y sarampión.

Además de la IGIV, también existe una gammaglobulina estándar para administración muscular. Ambas presentaciones de gammaglobulina se obtienen por el mismo proceso de separación, pero la IGIV difiere de la gammaglobulina estándar en los siguientes aspectos que se detallan en la tabla 10:

**Tabla 10.** Diferencias entre la gammaglobulina endovenosa y la standard

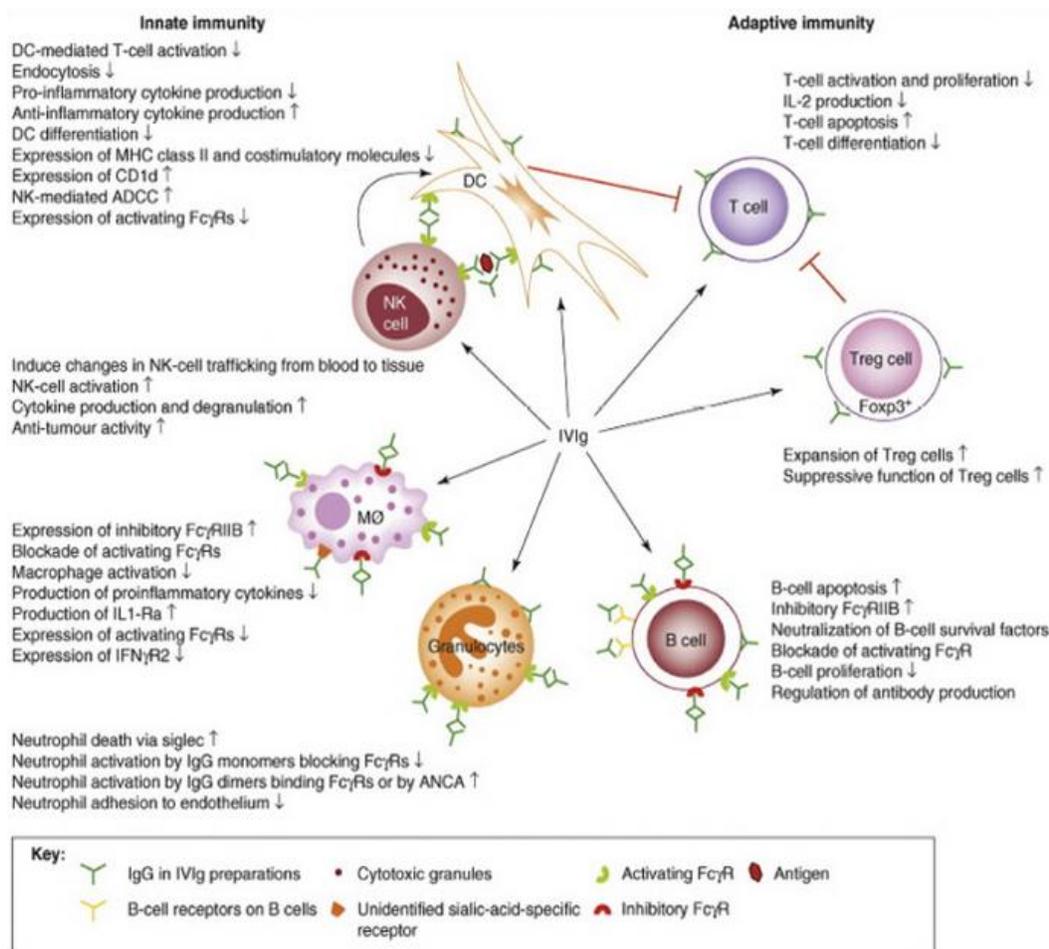
	<b>IVIG</b>	<b>IG estándar</b>
<b>Agregados de IgG</b>	No	Si
<b>Activación de complemento</b>	No	Si
<b>Dosis</b>	Hasta 2000 mg/kg	100 mg/Kg
<b>Nivel de IgG sérica</b>	Se eleva inmediatamente	Se incrementa lentamente
<b>Vías de administración</b>	IV, intratecal	IM, SC

Durante la separación de las proteínas plasmáticas algunas moléculas de IgG forman agregados o complejos que tienen la capacidad de activar el complemento aún sin reaccionar con el antígeno; este mecanismo genera reacciones anafilácticas inmediatas después de la infusión venosa. Como la porción Fc de la IgG está intacta, las dos formas de gammaglobulina pueden activar el complemento y reaccionar con los receptores Fc gamma de las células fagocíticas después de la interacción por la porción Fab con el antígeno.

Las propiedades de la IgG aplicada por vía venosa no solo se deben a su capacidad de reconocer y fijar en forma específica diferentes determinantes antigénicos. Actualmente se reconocen múltiples acciones moduladoras de la IGIV sobre la inmunidad inespecífica y la específica. Los principales mecanismos de acción establecidos son los siguientes (Figura 15):

- Actividad antígeno específica: se estima que posee anticuerpos con 10 millones de especificidades diferentes, los cuales cumplen funciones de opsonización, neutralización y activación del complemento
- Acción inmunomoduladora, a través de varios mecanismos. Por ejemplo, la inhibición de la secreción de citocinas por macrófagos y linfocitos T como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ . Aumenta la producción de IL-8 y del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1 Ra). Tiene anticuerpos contra IL-1, TNF $\alpha$ . Disminuye la expresión del receptor IL-2. Inhibe la activación de los linfocitos T y B, y disminuye la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B. Finalmente, inhibe la activación de los linfocitos T mediada por superantígenos.
- Ejerce interacciones reguladoras idiotipo/anti idiotipo en la red idiotípica.
- Bloquea los receptores para el Fc gamma presentes en macrófagos, linfocitos T y B.
- Ayuda a la solubilización de complejos inmunes circulantes y depositados en tejidos.
- Inhibe la síntesis de autoanticuerpos por los linfocitos B autoreactivos.
- Disminuye el consumo de complemento por los autoanticuerpos patogénicos.

El uso de la IVIG como inmunomodulador difiere en la dosis utilizada para prevenir las infecciones en los inmunodeficientes, pues para lograr los efectos inmunorregulatorios se requieren usualmente cantidades mayores de IgG/ Kg (entre 1 y 2 g IgG/ Kg). Las indicaciones de la IVIG son: las inmunodeficiencias primarias, la leucemia linfocítica crónica de células B, la infección pediátrica por el VIH, la enfermedad de Kawasaki y el trasplante de médula ósea reciente en adultos. El Instituto de salud de EEUU (NIH) acepta todas las indicaciones anteriores, y además agrega la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica. Otras instituciones agregan otras indicaciones como la púrpura pos-transfusional.



**Figura 15.** Mecanismos de acción propuestos para la IVIG.

## MANEJO DEL PACIENTE POST-TRASPLANTE

Los pacientes trasplantados una vez dados de alta, deben ser monitoreados periódicamente, evaluándose los valores sanguíneos de marcadores de funcionalidad del órgano trasplantado. Una modificación en los parámetros de función (por ejemplo, valores séricos elevados de creatinina en trasplante renal) estaría indicando la presencia de fenómenos de rechazo o infección. La sospecha de rechazo obliga al médico a realizar una biopsia y su confirmación deberá acompañarse con un aumento del tratamiento inmunosupresor. Si éste evoluciona favorablemente con buen funcionamiento del órgano, sin manifestación de signos de rechazo, el médico irá disminuyendo gradualmente el nivel de inmunosupresión. En cambio, la sospecha de infecciones debería acompañarse en una reducción del tratamiento inmunosupresor. Es importante tener en cuenta que muchas veces, los cuadros infecciosos en los pacientes trasplantados no se acompañan de fiebre, por lo que se dificulta el correcto diagnóstico y la terapéutica apropiada.

En la actualidad no existe ningún ensayo que permita establecer de manera cierta si un paciente se encuentra demasiado o poco inmunosuprimido. Es por esto que en la clínica se utiliza el dosaje sérico de los inmunosupresores como único parámetro indirecto del nivel de inmunosupresión. Sin embargo, no siempre estos niveles se correlacionan de manera cierta con el estado de competencia inmunológica. Claramente los dos objetivos de las terapias inmunosupresoras (prevención del rechazo y evitar las infecciones y los procesos tumorales) están en continua oposición, por ello las dosis de inmunosupresores deben estar equilibradas para obtener resultados óptimos de modo que eviten el rechazo pero que a la vez minimicen el riesgo de infección. En trasplante renal, la existencia de diferentes protocolos inmunosupresores, en los diferentes centros de salud, nos indica que ninguno de ellos puede ser reconocido como ideal. Por lo tanto, un objetivo importante en el trasplante de órganos y tejidos, es buscar estrategias que promuevan la "tolerancia", entendiéndose como tolerancia como un estado fisiológico de ausencia de respuesta inmune específica hacia epítopes propios (o hacia aloantígenos, en el caso de trasplantes alogénicos). Sin embargo, esta definición "básica" de tolerancia, contrasta con la definición clínica (mucho menos ambiciosa) y que define a la tolerancia como el mantenimiento estable de la función del injerto sin inmunosupresión. Es decir, que la meta buscada en trasplante, es lograr un estado inmunológico en el cual el sistema inmune del huésped pueda ser reprogramado para aceptar un trasplante sin la necesidad de inmunosupresión a largo plazo. En esta búsqueda, los protocolos clínicamente aplicables pretenden inclinar la balanza a favor de la regulación, ya sea por la expansión *in vivo* de las células T con actividad reguladora o la infusión de células reguladoras expandidas *ex vivo*. En trasplante renal, no siempre ha existido una clara asociación entre Treg (medido por expresión de Foxp3), y la presencia de tolerancia o la ausencia de rechazo. Actualmente hay ensayos clínicos que están tratando de probar la eficacia de la inducción de tolerancia administrando Treg en pacientes con trasplante renal, y aunque el éxito de los mismos, en humanos, aún no ha sido probado, existen en la actualidad la denominada "tolerancia parcial o inmunosupresión mínima", que en inglés la han denominado "prope tolerance". Esto permite un uso mínimo de los fármacos inmunosupresores, lo que resulta en menos riesgos de infección, neoplasia, o efectos adversos relacionados con el inmunosupresor.

Actualmente, no hay duda que la falta de adherencia al tratamiento inmunosupresor, lleva al rechazo y a la pérdida del injerto. Sin embargo, en un número excepcionalmente bajo de individuos, en el mundo, se ha observado que mantienen una buena función del injerto habiendo dejado de tomar el tratamiento inmunosupresor. En estos casos, se dice que el paciente presenta tolerancia operacional y permiten suponer que existe alguna posibilidad a futuro de lograr la tolerancia del aloinjerto en ausencia de tratamiento inmunosupresor.

## **El laboratorio en los trasplantes**

Resulta fundamental hacer una correcta determinación en la compatibilidad entre un posible donante y receptor. Antiguamente, se utilizaban métodos fenotípicos que comprendían los ensayos serológicos de microlinfocitotoxicidad y la tipificación tisular a través del ensayo denominado cultivo mixto linfocitario (CML). El método serológico consiste en poner en contacto linfocitos aislados del sujeto a estudiar con un panel de aloanticuerpos o anticuerpos

monoclonales anti-HLA capaces de reconocer determinadas especificidades antigénicas. Este método está basado en el empleo de células viables y consisten en realizar pruebas de microlinfocitotoxicidad en placas de Terasaki que se basa en una reacción de fijación del complemento y la estimación del porcentaje de células muertas. El ensayo de microlinfocitotoxicidad tiene ventajas y desventajas, siendo las primeras, la de tratarse de una técnica fácil que no requiere de un equipamiento costoso, que se realiza en aproximadamente 3 h y se obtienen resultados aceptables de bajo nivel de resolución. Las desventajas son que se requieren mayores volúmenes de sangre, es necesaria la viabilidad de los linfocitos y por último que es difícil encontrar antisueros para los individuos que presentan especificidades raras. No existen sueros contra alelos poco frecuentes, los sueros no son monoespecíficos y presentan reactividad cruzada con otros alelos lo que dificulta la interpretación. Además, no es adecuada para tipificación de donantes cadavéricos en trasplante de médula ósea y presenta ambigüedades (no se pueden definir determinadas combinaciones de alelos). La técnica denominada CML, se basa en la realización de un cultivo de células mononucleares de sangre periférica del posible donante irradiadas junto con células mononucleares de sangre periférica del receptor. Las primeras actúan como CPA (estimuladoras), en tanto que las células del receptor responden proliferando, en caso que el donante y el receptor fueran incompatibles en las MHC de clase II, o provocando la citotoxicidad, en caso que fueran incompatibles en las MHC de clase I. La cuantificación de la proliferación celular se determina a través de la incorporación de timidina tritiada al ADN celular. Sin embargo, existen otros métodos de cuantificación de activación linfocitaria, tales como la medición de  $IFN\gamma$  por parte de las células respondedoras; ya sea por un ensayo de ELISA en el sobrenadante de cultivo, por RT-PCR o por citometría de flujo). Un tercer método que permite evidenciar la activación celular es la citometría de flujo para marcadores de activación celular tales como CD69. Las incompatibilidades en las moléculas de CMH de clase I, se manifiestan por la activación y proliferación de linfocitos CD8 citotóxicos. En estos casos, la presencia de esta población celular se pone de manifiesto a través de ensayos de liberación de  $^{51}Cr$  de células marcadas susceptibles a la lisis por las células T CD8 citotóxicas. Actualmente, las técnicas de tipificación fenotípica ya no se utilizan en la rutina clínica por presentar serias limitaciones, que para el caso del CML son imposibilidad de evaluar la presentación indirecta, la necesidad de un tiempo prolongado de incubación de aproximadamente 5 días, importantes volúmenes de sangre y células viables. En base a las limitaciones técnicas de los métodos fenotípicos, ya no se utilizan y se prefieren los métodos genotípicos de tipificación de alelos de HLA que son descriptos en la próxima sección.

### **Técnicas moleculares de tipificación de alelos del HLA.**

Las técnicas de tipificación de HLA son estudios mediante el cual se determinan cuáles de todas las variantes conocidas del locus HLA están presentes en un individuo determinado. Para la realización de estos estudios se requiere la extracción de sangre entera, anti-coagulada con EDTA.

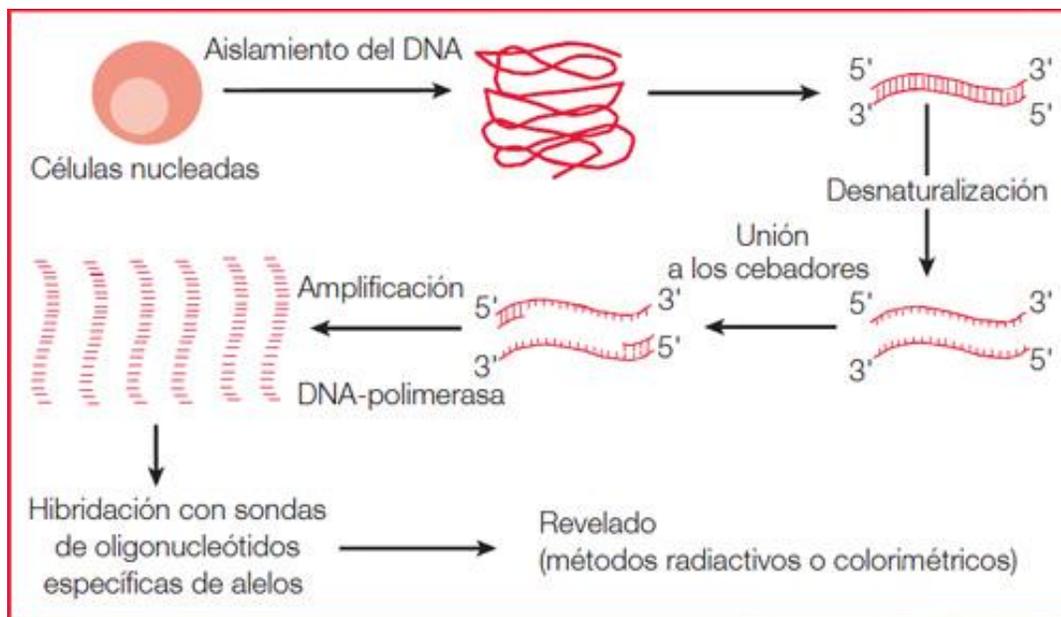
Estas técnicas moleculares, están basadas en el empleo de ADN de sangre o tejidos y consisten en ensayos de reacción en cadena de la polimerasa denominados PCR (Figura 16). Estas a su vez pueden ser de diferentes tipos. Así es que se reconocen los métodos PCR SSP (Primers de

secuencia específica), PCR SSOP (Sondas de oligonucleótidos de secuencia específica), el LUMINEX y SBT (Tipificación basada en la secuencia).

El método SSP, son PCR con cebadores específicos de secuencia. Tiene resolución igual o mayor que las técnicas serológicas pero un costo significativamente más bajo. Es adecuada para la tipificación de donantes cadavéricos para el caso de trasplantes de órganos sólidos, pero no para la tipificación de donantes de médula ósea no relacionados. También presenta ambigüedades.

El método SSOP, son PCR con cebadores específicos de locus e hibridación con sondas específicas de alelos marcadas. Es una técnica basada en una primera PCR para amplificar cada loci del HLA y luego una hibridación con sondas marcadas específicas para cada alelo. Posee alta resolución, es posible detectar homocigosis y es adecuada para la tipificación de donantes cadavéricos. La interpretación es compleja debido a la reactividad cruzada entre sondas y a que la detección de determinadas combinaciones de alelos produce patrones similares.

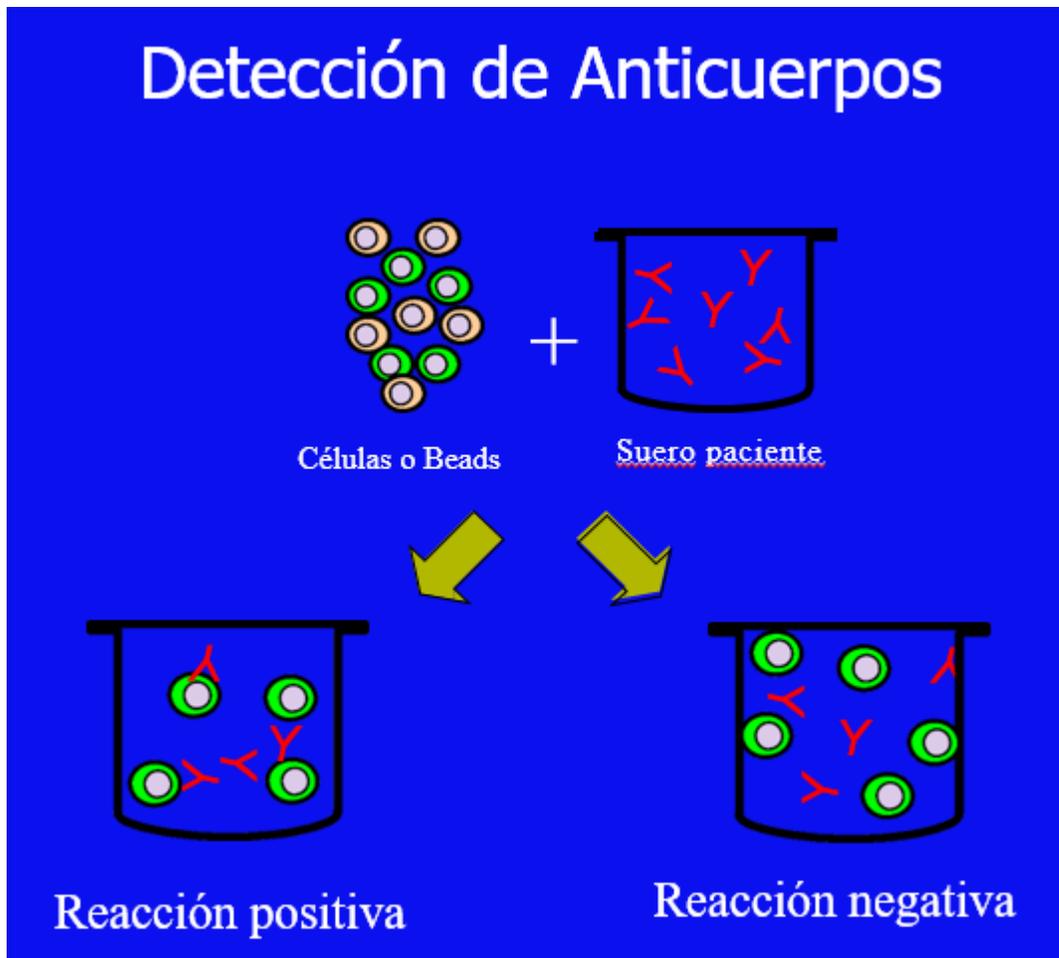
Por último, el método SBT o secuenciación directa es una técnica de máxima resolución, ideal para la detección de homocigosis y para la tipificación de donantes cadavéricos. La interpretación es automatizada, pero es una técnica muy costosa que requiere de un secuenciador automático de ADN.



**Figura 16.** Técnicas moleculares de tipificación de HLA. La PCR consiste en la multiplicación de una pequeña cantidad de ADN utilizando una ADN-polimerasa, que en ciclos repetidos de desnaturalización (separación de las dos hebras del ADN) y síntesis de la cadena complementaria llega a formar millones de copias iguales. Tras este proceso la utilización de sondas de oligonucleótidos específicos de diferentes alelos del sistema HLA permite detectar las especificidades alélicas presentes en el ADN estudiado.

## **Técnicas de tipificación y detección de anticuerpos donantes específicos.**

Un individuo puede o no presentar anticuerpos anti-HLA donante específicos (DSA, donor specific antibodies) al momento del trasplante. En caso de presentar DSA positivo, se lo considera un individuo sensibilizado. La sensibilización pudo haber ocurrido por embarazos, transfusiones, trasplantes previos y/o infecciones cruzadas. En estos casos se contraindica el trasplante ya que la presencia de DSA en el receptor de un trasplante puede inducir el rechazo hiperagudo del injerto. Otra posibilidad es que el individuo a trasplantar no presente DSA. En estos casos se dice que el paciente es DSA negativo previo al trasplante. En caso que exista incompatibilidad entre alelos de HLA entre donante y receptor, se puede inducir la producción de DSA *de novo*, transformando al individuo DSA negativo en DSA positivo. La relevancia clínica de este fenómeno es muy importante, ya que los individuos con DSA *de novo* tienen una significativa reducción en la sobrevida del injerto. Por todo esto, es muy importante poder detectar DSA. Los pacientes en lista de espera de trasplante renal deben ser estudiados de manera periódica para detectar la presencia de los mismos. La determinación de las especificidades de HLA, nos permiten seleccionar aquellos individuos que no presentan reactividad contra los antígenos HLA del donante y, para el monitoreo postrasplante con el objeto de detectar anticuerpos *de novo*, identificando así, a los pacientes con mayor riesgo inmunológico. Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-HLA preformados, presentes en el suero del receptor, se realiza la prueba de reactividad cruzada o cross match, que consiste en la incubación del suero del paciente con células o partículas que expresen determinados HLA. La presencia de interacciones entre anticuerpos presentes en el suero de un paciente en lista de espera o paciente trasplantado con las células o partículas que expresen determinado HLA, genera una reacción positiva, la cual podrá ponerse en evidencia por diferentes métodos (Figura 17). Estos ensayo se denominan “cross match” y tienen por objetivo determinar la presencia de anticuerpos específicos contra alelos de HLA en el suero de los pacientes. El cross match puede ser final contra panel (PRA, *panel reactive antibody*) o contra donante (ver abajo).



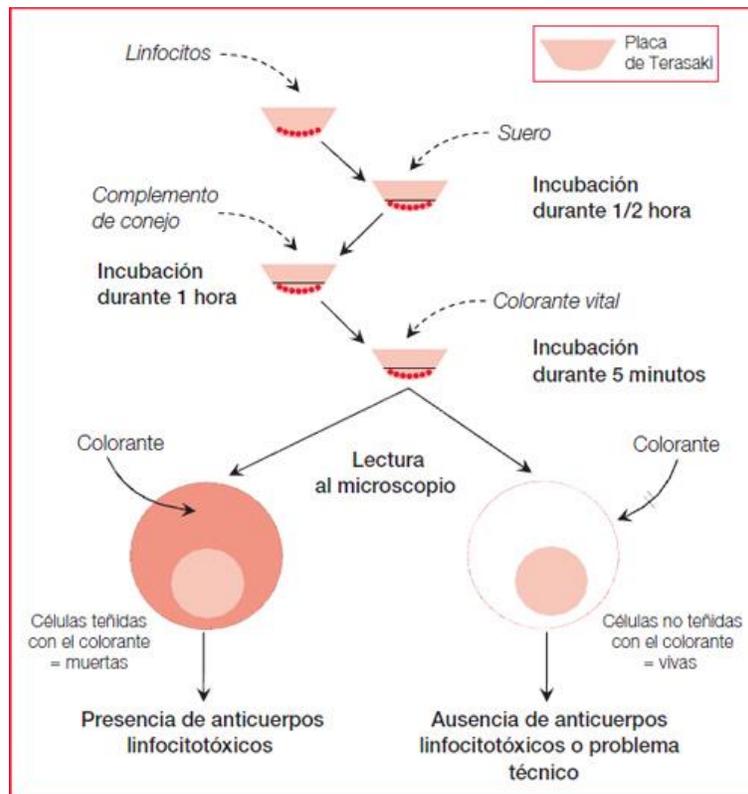
**Figura 17.** Principio de los ensayos de determinación de anticuerpos en el suero de los pacientes en lista de espera.

### **Cross match contra panel (PRA)**

En el PRA se detecta el porcentaje de reactividad del suero del paciente frente a un panel de células o antígenos y una medida del grado de sensibilización. De esta manera, se identifica la reactividad del suero del paciente que está en lista de espera para ser trasplantado (contra los antígenos del HLA más frecuentes en la población). Basado en este ensayo se clasifican los receptores con un índice PRA. Cuanto más elevado es el PRA, más amplia es la gama de antígenos del HLA reconocida y más difícil le será a ese paciente conseguir un donante compatible para el trasplante. Del resultado de esta prueba, los pacientes con un PRA < al 20 % son clasificados como pacientes de bajo riesgo, los que tienen un PRA > 30 % son de elevado riesgo en tanto que los pacientes con PRA > 70 % se los considera pacientes hipersensibilizados. Por ejemplo, un PRA del 20 % para un paciente en lista de espera para un trasplante, significa que el individuo podría resultar crossmatch positivo con 20 % de los posibles donantes en una población dada. Por otro lado, un paciente con un PRA > 90 % tiene una muy

baja probabilidad de ser trasplantado. En estos casos, a estos pacientes se les puede ofrecer tratamientos de desensibilización previo a la realización de un trasplante.

El cross match contra panel se puede realizar pre y pos-trasplante utilizando las técnicas de CDC (citotoxicidad dependiente de complemento, ELISA, citometría de flujo y Luminex). La técnica de CDC se realiza por ensayos celulares, que tienen como base la fijación de complemento por complejos inmunes antígenos-anticuerpos, visualizándose la reacción con la utilización de un colorante (Figura 18).



**Figura 18.** Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

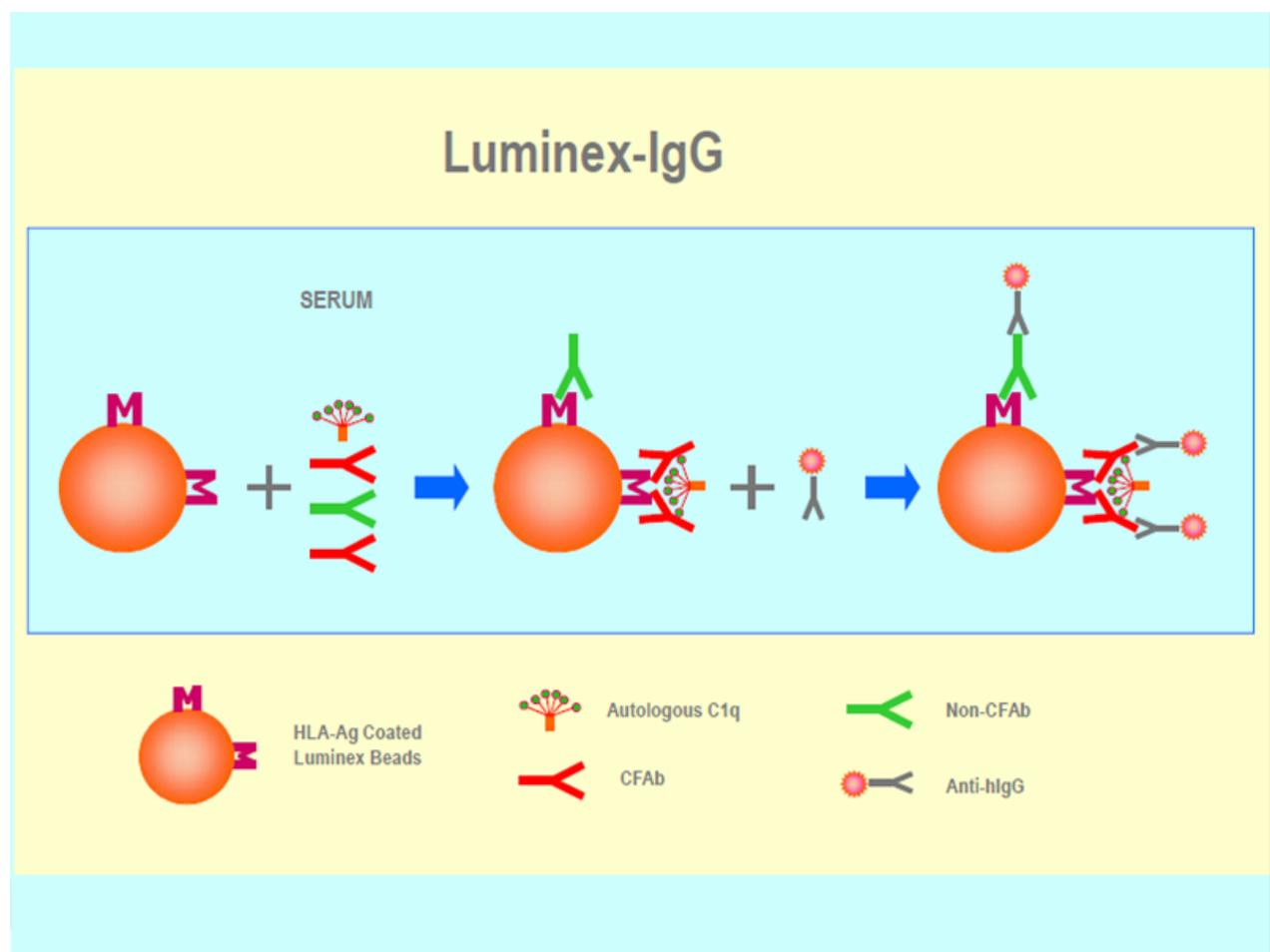
La fuente de antígenos es una suspensión de linfocitos y la fuente de anticuerpos es el suero del paciente. Esta técnica nos permite detectar la presencia de anticuerpos citotóxicos (fijadores de complemento: IgG e IgM) contra antígenos HLA sobre la superficie de los linfocitos. El suero puede ser tratado con DTT con el objeto de eliminar IgM y discriminar las interacciones entre IgG de las IgM. La reacción se cuantifica según el porcentaje de lisis celular. Esta técnica presenta limitaciones ya que se requieren linfocitos viables, sólo detecta anticuerpos anti HLA fijadores de complemento y de alto título, no permite diferenciar anticuerpos relevantes de los no relevantes para el trasplante, requiere un panel amplio de células (entre 30-50) que cubra todas las especificidades y es operador dependiente. Las ventajas son que no requiere un equipo sofisticado y es más económico.

A diferencia del cross match contra panel por CDC, en el cross match contra panel por ELISA los antígenos HLA purificados están adheridos a un soporte sólido y la visualización de la unión Ag-Ac se realiza mediante un segundo anticuerpo marcado con una enzima y el agregado de un sustrato generando una reacción colorimétrica. Las ventajas son que los antígenos unidos a las

pocillos de las placas cubren todas las especificidades, no se necesitan de células viables, sólo detectan IgG, detectan Ac contra clase I y II, detecta Ac HLA específicos y anticuerpos HLA que no unen complemento, es de mayor sensibilidad porque detecta anticuerpos de bajo título, es operador independiente y es posible realizar el cross match después del tratamiento inmunosupresor con Timoglobulina y anti CD20. Las limitaciones son que requiere un lector de placas de ELISA y es más costoso.

La técnica por citometría de flujo (FlowPRA) es una metodología en fase sólida que utiliza antígenos HLA purificados adheridos a microesferas. Tiene mayor sensibilidad que las pruebas anteriores.

La técnica de Luminex (Figura 19) se basa en los principios del citómetro de flujo pudiendo medir de manera simultánea hasta 100 analitos. En este caso se utilizan esferas marcadas con un fluorocromos que tienen adheridos antígenos de HLA de clase I y II. La ventaja de esta técnica sobre las otras es que permite realizar un número mayor de determinaciones en un corto período de tiempo, en una única suspensión y en un mismo ensayo. La desventaja es que detecta tanto los anticuerpos fijadores como los no fijadores de complemento, siendo estos últimos no relevantes al momento de predecir el daño.



**Figura 19.** Técnica de Luminex para la detección de anticuerpos donante específicos. CFAb, anticuerpo fijador de complemento; Non-CFA Ab, anticuerpo no fijador de complemento; Anti-IgG, anticuerpo anti IgG humana.

### Cross match contra donante

El cross match contra donante también se puede realizar por CDC o citometría de flujo. El cross match contra donante por CDC se realiza una vez seleccionados el receptor y el donante por su grado de compatibilidad HLA y otros parámetros clínicos. Esta prueba consiste en la incubación del suero del receptor con linfocitos del donante en presencia de complemento. Si existe lisis celular, se interpreta como que el receptor está sensibilizado hacia el donante con un riesgo muy elevado de presentar un rechazo hiperagudo en caso de llevarse a cabo el trasplante. Los componentes que se utilizan para llevar adelante esta reacción son: i) linfocitos T y B del donante (que se obtiene de sangre periférica si es un donante vivo o del bazo o ganglio linfático si se trata de un donante cadavérico); ii) diluciones seriadas del suero del receptor; iii) tratamiento del suero con DTT (para eliminar IgM); iv) antiglobulina antihumana para aumentar la sensibilidad de la prueba al unirse a los posibles anticuerpos séricos adheridos a los antígenos de HLA en la superficie de las perlas; v) complemento de conejo; vi) sueros controles positivos y negativos; vii) colorantes que permitan identificar viabilidad celular como naranja de acridina y bromuro de etidio. Normalmente la prueba se realiza con el suero actual y con los sueros históricos. La prueba se considera positiva cuando se observa una lisis mayor al 20 %. Un cross match positivo frente a linfocitos T por aloanticuerpos contraindica el trasplante, no así contra linfocitos B, siempre y cuando se demuestren autoanticuerpos no HLA.

El cross match contra donante por citometría de flujo es similar al anterior pero utiliza los principios de la citometría de flujo. La diferencia con la técnica de CDC es que detecta bajas cantidades de anticuerpos preformados fijadores o no de complemento, por lo tanto es cien veces más sensible que el CDC, y permite identificar anticuerpos IgG de IgM.

En definitiva, siendo tan importante la detección de anticuerpos anti-HLA y habiendo distintas técnicas con diferentes sensibilidades, la decisión sobre la realización del trasplante queda a cargo del médico en base a un algoritmo que se muestra en la siguiente tabla 11.

**Tabla 11.** Determinación del riesgo de rechazo inmunológico por anticuerpos según el resultado del cross match previo al trasplante.

Determinación del riesgo de rechazo mediado por anticuerpos					
Resultado del cross match con:	Prueba de cross match utilizada	Conducta Médica	Consideración médica		
		Contraindicado	Alto Riesgo	Riesgo Intermedio	Bajo riesgo

<b>Suero Actual Positivo por:</b>	<b>Citotoxicidad</b>	<b>X</b>			
	<b>Citometría de flujo</b>		<b>X</b>		
<b>Suero histórico positivo por:</b>	<b>Citotoxicidad</b>		<b>X</b>		
	<b>Citometría de flujo</b>			<b>X</b>	
<b>Suero Actual e histórico negativo por:</b>	<b>Citotoxicidad</b>			<b>X</b>	
	<b>Citometría de flujo</b>				<b>X</b>

De esta manera se puede apreciar, que no siempre un cross match positivo contraindica la realización del trasplante. En base al riesgo inmunológico y cuestiones clínicas, el médico evaluará las posibilidades de éxito del trasplante, las que comunicará al paciente, quien en última instancia tendrá que decidir en aceptar o no el trasplante.