

Histocompatibilidad, citomegalovirus y trasplante renal

Martín Correa, Jorge E. Ossa, Luis Fernando García, Mario Arbeláez

Se utilizó el cultivo mixto de linfocitos (CML) para tratar de establecer la correlación entre alorreactividad, rechazo e infección por citomegalovirus (CMV) y la posible reactivación del virus *in vitro*. Se practicaron CML clásicos para estudiar la respuesta proliferativa y en paralelo, CML para los estudios de reactivación viral. El período de seguimiento clínico de los pacientes osciló entre tres meses y un año y durante el cual se pudo corroborar la fuerte asociación entre rechazo e infección por CMV ($p=0.001$). Se probaron, para el aislamiento viral, 144 sobrenadantes de combinaciones de CML con resultados negativos.

En general, la correlación entre CML Y HLA fue pobre; si bien fue significativa para HLA-(A+B), no lo fue para DR. Tampoco hubo asociación entre el rechazo y los parámetros clínicos rutinarios para el seguimiento de los pacientes (BUN, creatinina, depuración de creatinina), al igual que con la clase y el número de transfusiones.

El porcentaje promedio de respuesta relativa (%RR) fue mayor cuando la relación con el donante era paternal que cuando era fraternal ($p=0.05$) y la mayoría de los episodios de infección por CMV y rechazo se presentaron en los pacientes que recibieron trasplante de origen paterno.

Dr. Martín R. Correa: Sección de Virología y Laboratorio Central de Investigaciones; Dr. Jorge E. Ossa: Sección de Virología y Laboratorio Central de Investigaciones; Dr. Luis Fernando García: Sección de Virología y Laboratorio Central de Investigaciones, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia; Dr. Mario Arbeláez: Jefe Sección de Nefrología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Solicitud de separatas al Dr. Correa.

INTRODUCCION

La reacción de rechazo y la infección por citomegalovirus (CMV) son las dos dificultades principales en el área de los trasplantes en la actualidad. El rechazo es la expresión clínica de la alorreactividad o aloagresión, que se refiere al hecho sorprendente de que un gran número de linfocitos de un individuo no inmunizado responden activamente, cuando se ponen en presencia de células alogénicas (1).

In vitro, el fenómeno de la alorreactividad se puede detectar y medir mediante el cultivo mixto de linfocitos (CML) y la linfocitotoxicidad, pero ninguna técnica es capaz de medir todos los aspectos del problema. El CML se considera como el modelo clásico de la respuesta inmune alogénica *in vitro* y está basado en el reconocimiento por parte de un número de linfocitos de moléculas estimuladoras en células alogénicas. Sólo diferencias alogénicas codificadas por el CML son capaces de estimular tal respuesta, con excepción del ratón, en el cual el locus Mis (antígenos menores estimuladores de linfocitos) también codifica antígenos estimuladores potentes (1-5).

El significado fisiológico de la alorreactividad no se conoce. La única exposición natural a células alogénicas ocurre durante la reproducción, particularmente de los mamíferos (por el semen, durante el embarazo y en el momento del parto). Pero, actualmente, por la aplicación terapéutica de trasplantes como tratamiento de elección en un sinnúmero de patologías, ha surgido el problema del rechazo y la enfermedad de injerto contra huésped, como el mayor reto para el éxito de los trasplantes. En consecuencia, además de curiosidad científica, el esclarecimiento de los fenóme-

nos de alorreactividad y tolerancia se ha convertido en una necesidad imperiosa (1, 6-9).

Existen dos hipótesis principales para explicar el mecanismo de reconocimiento alogénico: el receptor de los linfocitos T respondedores reconoce el aloantígeno en el contexto de sus propios antígenos de histocompatibilidad (como ocurre en todos los demás casos de reconocimiento antigénico por parte de linfocitos T); o bien, el receptor del linfocito respondedor reconoce directamente el CML sobre las células estimuladoras. Cualquiera que sea la teoría que finalmente resulte comprobada, el linfocito T respondedor entra en un estado de activación caracterizado, entre otras cosas, por síntesis de macromoléculas, transformación blástica y proliferación (2, 3, 9-11).

El CMV humano (CMVH) es un miembro de la familia *Herpesviridae*, y como todos en esta familia, se caracteriza por la latencia como su principal estrategia para sobrevivir. Se desconocen aspectos fundamentales de su epidemiología y de su patobiología, pero se sabe que está ampliamente distribuido en la población y es causa de enfermedad principalmente *in útero* (por reactivación o por infección primaria de la madre) y en inmunosuprimidos (12-15).

En el trasplante se reúnen aspectos predisponentes de la infección como son los procedimientos médicos (diálisis, transfusiones, etc.), la inmunosupresión terapéutica y el trasplante mismo. El trasplante juega un doble papel en este caso, pues además de ser portador potencial del virus (si proviene de un individuo infectado), tiene aloantígenos que "estimularán una respuesta alogénica creando circunstancias propicias para la reactivación viral, bien a partir del receptor o, con mayor frecuencia, a partir del donante. No se sabe con certeza cuál es la secuencia de eventos que conduce a la reactivación y, lo que es más interesante, algunos investigadores sospechan que sea la respuesta alogénica misma la que induce la reactivación mientras que otros creen que la reactivación del virus es el evento desencadenante del rechazo (16-28).

La relación entre CMV y rechazo se vuelve crítica en el momento de establecer una terapia

para el paciente trasplantado y con síndrome febril. Tanto la infección como el rechazo se manifiestan por síntomas y signos inespecíficos y no existen métodos diagnósticos que aclaren oportunamente el problema. En estas condiciones se procederá a aumentar la inmunosupresión si se cree que el problema es un rechazo o se procederá a disminuirla si el diagnóstico presuntivo es una infección por CMVH (16-28).

Con estos dos problemas en mente, el rechazo y la infección, se utilizó el CML para tratar de establecer la correlación entre alorreactividad y rechazo en parejas de trasplantados, y en segundo lugar, determinar la posible reactivación del virus *in vitro*. Aprovechando la posibilidad de manipular el CML, utilizando diferentes subpoblaciones celulares o agregando drogas como ciclosporina o glucocorticoides sería posible, una vez lograda la reactivación *in vitro*, entrar a estudiar la secuencia de eventos celulares y moleculares involucrados en este proceso.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

Se estudiaron 24 candidatos a trasplante renal y sus respectivos donantes, apareados por el grupo de trasplantes del Hospital Universitario San Vicente de Paúl (HUSVP) y tomados al azar entre los trasplantes intrafamiliares realizados en un período de nueve meses (noviembre 1988-agosto 1989).

A estas parejas se les practicó estudio serológico para CMV y CML pretrasplante en el momento de la determinación de anticuerpos citotóxicos (una o dos semanas antes del trasplante). Se logró realizar CML a nueve parejas, dos meses después de efectuado el trasplante. Los pacientes trasplantados fueron estudiados clínicamente y mediante pruebas de laboratorio clínico: nitrógeno ureico (BUN) (método de diacetil monoxime), creatinina (método de Jaffé) y depuración de creatinina. Igualmente, cuando se presentó un síndrome febril se practicó análisis citológico en orina en búsqueda de células de inclusión compatible con CMV.

Para determinar la posible reactivación del virus y su posible relación con la alorreactividad, se

realizaron CML entre los pacientes y sus respectivos donantes, y entre individuos normales con HLA y serología para CMV conocidos. De estos CML se obtuvieron resultados de porcentaje promedio de respuesta relativa (%RR). Simultáneamente, para la detección de la reactivación del CMV *in vitro*, se practicaron CML en las mismas condiciones, cultivados por cinco días, sin adición de timidina y congelados a -70°C , en un volumen final de 2 ml. Adicionalmente, para efectos del aislamiento viral, se hicieron mezclas de mononucleares sin irradiar, de tal suerte que la reactividad era de doble vía.

Se determinó el HLA por la técnica de microtoxicidad de Terasaki (29).

Serología de Citomegalorivirus: se determinó IgG utilizando un ELISA comercial (Bghringwerke AG) o un ELISA estandarizado en nuestro laboratorio (30-31).

Cultivo mixto de linfocitos (33)

Se tomaron 20 cc de sangre venosa de cada individuo, en erlenmeyer con perlas de vidrio (5-10); se agitó suavemente por diez minutos hasta formar un coágulo. La sangre desfibrinada se diluyó en proporción 3:1 (v/v) en solución salina fosfatada (PBS) 0.15 M/pH 7.2 estéril. Se centrifugó a 800 g/15 min sobre un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Pharmacia) en una proporción de 3:1 (v/v). Las células mononucleares obtenidas se lavaron con 10 ml de PBS, tres veces. Se determinó el número y la viabilidad, utilizando un hemocitómetro y azul de tripano (Aldrich) al 0.2% en solución salina. Las células se resuspendieron a la concentración requerida, en medio de cultivo RPMI 1640 (Difco) suplementado con 25 mM Hepes, 24 M bicarbonato (pH 7.4), 10% de mezcla de suero humano CMV negativos (mínimo de tres hombres), filtrado e inactivado a $56^{\circ}\text{C}/30$ min más 100 U/ml de penicilina y 50 ug de gentamicina.

Finalmente se emplearon células de uno de los miembros de la pareja como respondedoras y las del otro como estimuladoras y viceversa. La mezcla se hizo por triplicado en microplatos de 96 pozos de fondo redondo (Nunc) estériles, con 100 ul (1×10^6 cel/ml) de células respondedoras y 100 ul (0.5

$\times 10^6$ cel/ml) de células estimuladoras para un volumen final de 200 ul.

Las células estimuladoras fueron irradiadas (2500 rads). Como controles se emplearon células autólogas y una mezcla de células de tres personas sanas, no relacionadas con la pareja, ni entre sí. Los cultivos se incubaron a $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$, en cámara humidificada por cinco días, al cabo de los cuales se pulsaron por 8 horas/ $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ con 0.5 uCi/pozo de timidina tritiada ($^3\text{Htdr}$) (Amersham, actividad específica 17 uCi/mol).

Posteriormente, las células pulsadas con el isótopo radiactivo se recuperaron en filtros de vidrio, utilizando un colector de células (PHD Cambridge). Los filtros se colocaron en omniviales con 2 ml de coctel de centelleo. La radioactividad se determinó en un contador 8 de centelleo líquido (LKB, modelo 1211). Se calcularon las medias de cuentas por minuto (cpm) de cada combinación y el porcentaje de respuesta relativa (%RR). Para calcular el %RR se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%RR = \frac{\text{cpm alogénico} - \text{cpm autólogo}}{\text{cpm mezcla} - \text{cpm autólogo}}$$

Para el efecto de los CML postrasplante, se siguió el mismo proceso descrito anteriormente, pero además de la prueba con mezcla de suero humano CMV negativo, se realizó una prueba adicional, con 10% de suero autólogo no inactivo del paciente, tomado el mismo día del cultivo.

Aislamiento del citomegalovirus (34-35)

Se inocularon 200 ul del sobrenadante del CML, por duplicado en monocapas o en suspensión de fibroblastos de pulmón humano (HLF), en platos de 24 pozos (Nunclon) o en tubos Leighton (Nunclon). En cada pozo o tubo se colocaron 10^5 células en 1 ml de medio de crecimiento MEM al 10% de SBF, suplementado con vitaminas, aminoácidos, penicilina (100u/ml) y estreptomycinina (100ug). En algunos casos los platos inoculados en monocapas fueron centrifugados durante el periodo de absorción, a 3000 g/30min, para aumentar las posibilidades de detección del virus. Las células inoculadas se incubaron a $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ en cámara humidificada. Se realimentó

con medio de mantenimiento MEM al 3% SBF y se hicieron observaciones frecuentes por un período mínimo de tres semanas. Como controles negativos se dejaron pozos sin inocular y algunas veces se incluyó un control de citomegalovirus (cepa AD-169), para probar la susceptibilidad de las células y para lograr la familiarización con el efecto citopatológico esperado.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se aplicaron pruebas de chi cuadrado para estudiar la correlación entre pacientes con rechazo y presencia de CMV en orina y análisis de regresión múltiple entre los datos de BUN y creatinina. Se empleó la prueba ANOVA para el análisis entre variables cuantitativas y cualitativas (%RR, cpm, rechazo, BUN, creatinina, serología e infección por CMV, RR pretrasplante, postrasplante).

RESULTADOS

Se estudiaron 24 parejas de receptores/donadores cuyo rango de edad fue de 7 a 53 años; el promedio y la mediana fueron de 29 años.

Para los estudios virológicos se realizaron un total de 295 combinaciones de CML, de los cuales se lograron probar para el aislamiento viral 144 muestras con resultados negativos. En 53 de estas muestras se hizo un pasaje ciego con idénticos resultados. Para correlacionar con la posible reactivación del virus *in vitro* se obtuvieron resultados de %RR en CML de 59 parejas, incluidos los trasplantados.

Las Tablas 1 y 2 indican el estado serológico y la relación entre rechazo e infección por citomegalovirus;

Tabla 1. Estado serológico, rechazo e infección por citomegalovirus en trasplantado.

		Rechazo / Infección CMV				Total
		+/+	+/-	-/+	-/-	
S E R O L O G Í A	C M V	2	2	0	15	19
	R ⁺	1	1	0	0	2
	R ⁻	0	0	1	1	2
	D ⁺	1	0	0	0	1
Total		4	3	1	16	24

* Receptor ** Donante

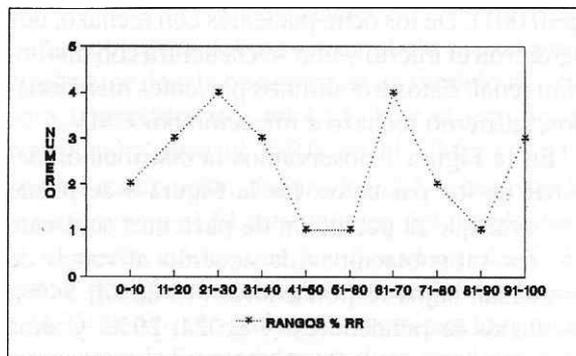


Figura 1. Cultivos mixtos de linfocitos de pacientes. Frecuencia de respuesta relativa.

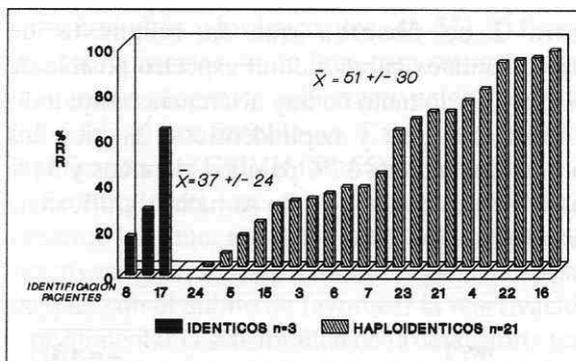


Figura 2. Distribución %RR en CML idénticos y haploidentícos (AxB*).

galovirus; como puede observarse la mayor frecuencia de rechazos se presenta en las parejas R+/D+ con cuatro de ocho rechazos, seguida por la pareja R+/D- con tres de ocho rechazos. La Tabla 2 señala específicamente la correlación entre rechazo e infección encontrándose que cuatro de cinco individuos con infección viral sufrieron rechazo, lo cual arroja una correlación altamente significativa

Tabla 2. Correlación, rechazo e infección por citomegalovirus en trasplantados.

		Infección CMV	
		+	-
R E C H A Z O	+	4	4
	-	1	15

Correlación (Rx - CMV p=0.01)

(p=0.001). De los ocho pacientes con rechazo, dos perdieron el injerto y uno se encuentra con disfunción renal. Estos tres últimos pacientes mencionados, sufrieron rechazo e infección por CMV.

En la Figura 1 observamos la distribución del %RR en los pacientes. En la Figura 1 se puede observar que la población de pacientes se divide en tres subpoblaciones de acuerdo al rango de respuesta: bajos respondedores (13 de 24, 54%); medianos respondedores (7 de 24, 29%) y altos respondedores (4 de 24, 16%).

Las Figuras 2, 3 y 4 muestran la distribución de respuestas de los pacientes según el número de incompatibilidades HLA (A+B) y DR. En la Figura 2 se observa que la respuesta de haploidénticos cubre todo el espectro posible de %RR y por lo tanto no hay diferencias entre individuos idénticos y haploidénticos. Si bien los promedios indican 37% para los idénticos y 51% para los haploidénticos, no se halló significancia estadística (p = 0.4).

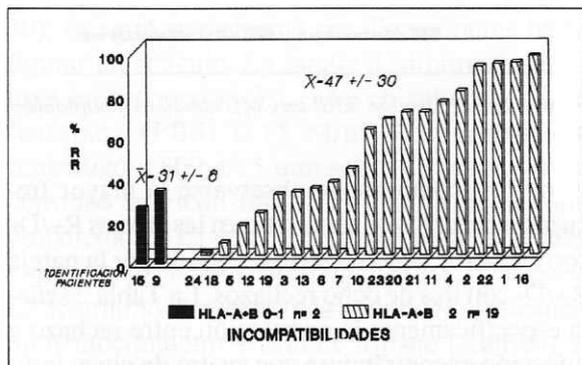


Figura 3. % RR CML Haploidénticos según incompatibilidad HLA - A+B (AxB*). * = 2.500 rads.

En la Figura 3 se muestra la distribución para individuos con una y dos incompatibilidades HLA (A+B), encontrándose que el promedio es 31% para una diferencia y 47% para dos diferencias; pero de nuevo el rango de respuesta de los individuos con dos diferencias es muy amplio, lo que enmascara cualquier grado de significancia estadística.

La Figura 4 compara el %RR para cero y una incompatibilidad DR. Se encontró que, contrario a

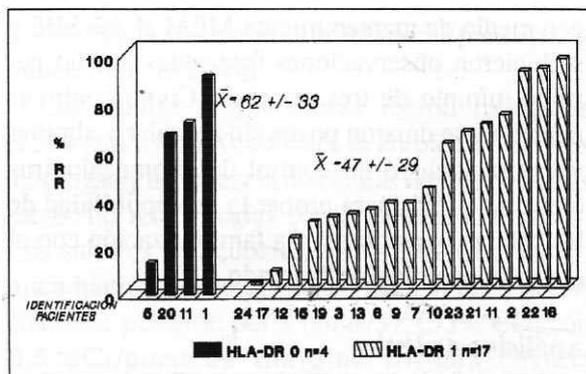


Figura 4. % RR CML Haploidénticos según incompatibilidad HLA - A+DR (AxB*)

lo esperado, se obtuvo un mayor promedio (62%) de %RR para individuos con cero diferencias y menos promedio (47%) para individuos con una diferencia a este nivel.

La distribución de respuestas según el parentesco y sexo del donante y la incidencia de rechazo e infección por CMV se encuentra en la Figura 5. El promedio de respuesta fue mayor en el caso de padres donantes (63% ± 27) que en el de hermanos donantes (39% ± 28). En todos los casos excepto uno, el donador fue la madre, y en los dos casos en los que el donante fue un hijo, ambos fueron hombres. Contrario a lo esperado, la diferencia de respuesta entre hermanos fue menor cuando había diferencia de sexo (36% ± 24) que cuando no la había (44% ± 33).

La mayoría de eventos de rechazo se concentró en la subpoblación con relación de parentesco paterna (cinco de ocho casos). En cuanto a la

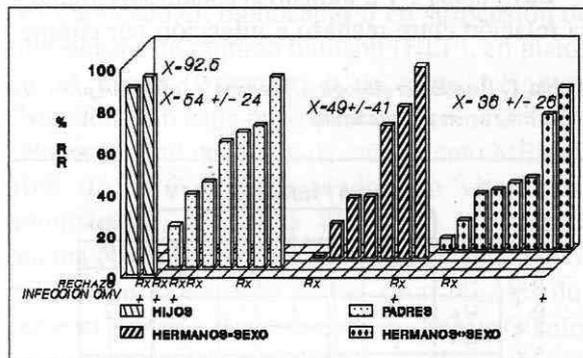


Figura 5. % RR en pacientes según parentesco del donante e incidencia de rechazo e infección.

presencia de infección por CMV, se destaca que la mayoría de casos (tres de cinco), se presentaron también en la relación paterna, mientras los otros dos casos se presentaron: uno, en la relación fraterna de igual sexo, en aquel de más alto %RR en su grupo y otro en la relación fraternal de sexo diferente, también el de más alto %RR en su categoría, aunque no hubo significancia estadística ($p=0.2$).

El número desigual y escaso de individuos en las diferentes categorías impide cualquier correlación para determinar el efecto de las transfusiones sobre el %RR; sin embargo, es interesante observar que los rechazos y la infección por CMV se distribuyen en todos los grupos, aparentemente, en forma independiente de las transfusiones.

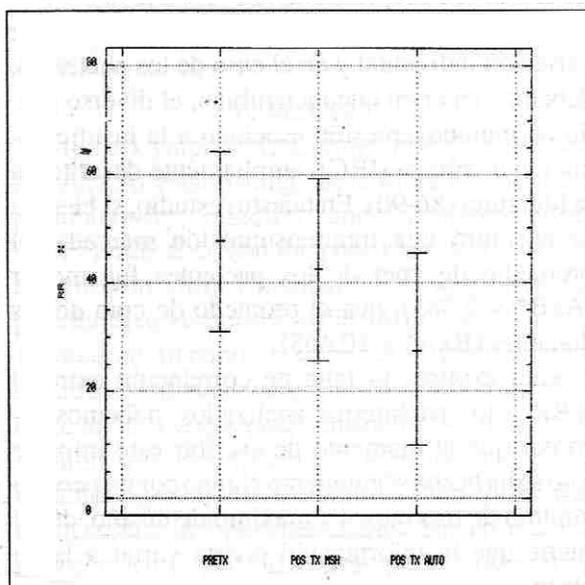


Figura 6. Intervalo Tukey del 95% para medias de %RR en CML. Pretrasplante y postrasplante renal.

En la Figura 6 se puede apreciar el promedio de %RR de los pacientes pretrasplante y de los mismos pacientes postrasplante con mezcla de suero humano CMV negativo y con suero autólogo. Como puede observarse, los valores del %RR fueron menores en los pacientes postrasplante, y notoriamente más bajos en presencia de suero autólogo; sin embargo, no se lograron niveles de significancia estadística.

DISCUSION

Los objetivos del presente trabajo fueron principalmente dos: la búsqueda de un modelo *in vitro* para la reactivación del CMVH y el estudio de correlación entre el %RR en el CML y 1) La posible reactivación viral *in vitro* 2) La reactivación viral *in vivo* y 3) El curso clínico del trasplante.

El marco teórico que justifica el uso del CML como posible modelo para la reactivación del CMVH *in vitro*, lo podemos resumir en los puntos siguientes: 1) En modelos murinos similares se ha logrado la reactivación del CMV y del retrovirus tipo C (38-45). 2) Aunque se desconoce el sitio de latencia del CMVH existe una amplia asociación entre este virus y los leucocitos (46-51). 3) Existe una fuerte asociación no bien caracterizada entre la reacción alógena y la reactivación del virus (52-54) y 4) Los linfoblastos T son susceptibles a la infección por CMVH (55-56).

En la primera fase de este estudio, objeto del presente informe, todos los resultados de posible reactivación viral *in vitro* fueron negativos a pesar de que, con el ánimo de favorecer la reactivación y de aumentar la sensibilidad de la detección viral, se practicaron CML de doble vía, cocultivos de CML con fibroblastos de pulmón humano y pasajes ciegos. Sin embargo, faltan muchas manipulaciones experimentales por ensayar como serían la adición de corticoides, ciclosporina, mitógenos, etc., y lo que es más importante, la utilización de técnicas más sensibles para la detección del virus como la reacción de polimerasa en cadena (RPC), cuya sensibilidad alcanza una copia de DNA viral en 40.000 células (57-61). Con este fin hemos hecho contacto con el CDC de Atlanta (USA), para determinar la presencia del genoma viral.

Se encontró, acorde con las hipótesis de este estudio, que existe una correlación altamente significativa entre infección por CMVH y rechazo. Igualmente se encontró que las reactivaciones se concentraron en el subgrupo de pacientes cuyo donante fue alguno de los padres; los rechazos estuvieron asociados con este mismo subgrupo; en el caso de donación entre hermanos, sólo se presentaron dos casos de reactivación viral en individuos con un alto %RR.

Estos hallazgos apuntan nuevamente a la asociación entre reactivación del virus y alorreactividad; dado que el promedio de reactividad era mayor cuando los padres fueron los donantes (63%) que en el caso de donantes hermanos (39%), alcanzándose significancia estadística ($p=0.05$); lo cual era de esperarse, pues los padres comparten menos antígenos de histocompatibilidad con los hijos que los hermanos entre sí.

Se encontró, además, que el rechazo y la infección se presentaron en los receptores más jóvenes (7-24 años). En niños se han descrito algunas características inmunológicas que explican el aumento en ellos de la alorreactividad, como un mayor número de linfocitos T, un incremento en la blastogénesis espontánea y una potenciación, en general, de la respuesta inmune celular (62). En cuanto a la asociación de infección por CMV con la edad, en trasplantados, no existe información en la literatura. Si esta asociación es real podríamos explicarla por el hecho de que la experiencia inmunológica del paciente más joven con el CMV debe ser menor, puesto que se ha expuesto a menos reinfecciones y/o reactivaciones; pero estas afirmaciones son altamente especulativas y su comprobación requeriría de estudios básicos sobre la epidemiología de la infección y la patogénesis de la reactivación.

En general, la correlación entre CML y HLA fue pobre; si bien fue significativa para HLA-(A+B), no lo fue para HLA DR, que tradicionalmente se ha asociado más estrechamente con el %RR. Por este motivo se les llamó originalmente antígenos linfocito-dependientes (LD) (63). Tampoco hubo asociación entre el %RR y rechazo o reactivación viral, ni con los valores de creatinina y BUN.

Además de la respuesta relativa, también se analizaron los resultados por cpm e índice de estimulación, pero ninguno de estos métodos de tratamiento de los datos arrojó diferencias significativas a las dadas con %RR.

Los CML postrasplante se practicaron con el objetivo de aumentar las posibilidades de la reactivación del CMV *in vitro*, teniendo en cuenta

las nuevas condiciones que podrían favorecer más este hecho (cirugía, drogas inmunosupresoras). Los resultados de un menor %RR en los CML con suero autólogo no inactivado se deben a la inmunosupresión por las drogas.

A pesar de que existe un amplio consenso sobre la asociación de %RR con CML, histocompatibilidad y con el éxito del trasplante, no todos los estudios lo han confirmado (66-76). Tampoco se han caracterizado todas las variables que participan en el CML y que podrían explicar estos resultados disímiles (77-81); es necesario caracterizar el papel de factores bloqueadores del CML y su impacto sobre el curso clínico del trasplante (82-85) y el papel de las células citotóxicas que podrían destruir las células estimuladoras, interfiriendo en la linfoproliferación (69, 70, 73).

El CML se caracteriza por un alto grado de variación individual y en el caso de los pacientes, debemos tener en cuenta también, el diverso grado de inmunosupresión asociado a la insuficiencia renal crónica (IRC), ampliamente descrito en la literatura (86-90). En nuestro estudio, si bien no se encontró una inmunosupresión marcada, el promedio de cpm de los pacientes fue menor ($AxB^* = 7.385$), que el promedio de cpm de los donantes ($BxA^* = 10.465$).

Para explicar la falta de correlación entre el %RR y los parámetros analizados, debemos recordar que al momento de escribir este informe sólo se ha hecho seguimiento clínico por un periodo mínimo de tres meses y máximo de un año, de tal suerte que la información podría variar a largo plazo.

El CML permite controlar las subpoblaciones de células estimuladoras, efectoras, accesorias, pero tiene sus limitaciones porque al fin y al cabo es un método reduccionista, *in vitro*, de una compleja situación *in vivo*. A pesar de esto, la respuesta proliferativa alogénica en el CML representa un modelo *in vitro* de rechazo de aloinjerto y constituye una prueba potencial para cuantificar la histocompatibilidad celular, especialmente a nivel de los antígenos clase II. Consecuentemente, el CML puede servir para seleccionar el mejor donador intrafamiliar y para definir el esquema de

preparación pretrasplante y el tipo y esquema de terapia inmunosupresora postrasplante (63-67).

En un contexto más amplio, el CML permite determinar el efecto *in vitro* de drogas, de factores como citoquinas y la manipulación de poblaciones celulares para esclarecer interacciones y establecer los mecanismos de los fenómenos estudiados (33, 63, 65, 77).

El seguimiento de este grupo de pacientes y los estudios básicos sobre los mecanismos de reactivación viral continuarán en nuestro laboratorio, tratando de agotar todos los recursos para favorecer la reactivación *in vitro*. El impacto científico y la trascendencia clínica de un modelo como el propuesto, conjuntamente con los renovados informes de la literatura asociando el CMV con la reactividad del sistema inmune, son suficiente justificación para continuar la investigación.

SUMMARY

Mixed Lymphocyte Culture (MLC) was used in order to establishing the correlation between alloreactivity, rejection and cytomegalovirus (CMV) infection, and the possible reactivation of the virus *in vitro*. Classical MLC were used for proliferative responses while MLC without ³H-Thymidine, in parallel, were run to attempt CMV isolation. Patients were followed for period of three to 12 months post-transplant. A strong correlation was found between rejection and CMV infection (p=0.001). Isolation of the virus was unsuccessful in 144 supernatants. The correlation between MLC and HLA was poor; however, it was significant for HLA- (A+B) while its was not for DR. On the other hand, the correlation between rejection and clinical parameters (BUN, creatinine, creatinine clearance) and with number of transfusions was also non significant.

AGRADECIMIENTOS

A las profesoras Ana E. Arango y Luzmila Acebedo del Laboratorio de Virología, a los profesores Gabriel Agudelo y Abel Díaz del Departamento de Matemáticas, al personal del Laboratorio Central de Investigaciones, a Colciencias entidad financiadora del proyecto 1115-05-88-86.

REFERENCIAS

1. **Carbone FR, Bevan MJ.** Major histocompatibility complex control of T cell recognition. In: Paul W, ed. *Fundamental Immunology*, New York: Raven Press Ltd.; 1989: 541-567.
2. **Matzinger P, Bevan MH.** Why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell Immunol* 1977; **29**: 1-5.
3. **Bevan MJ.** High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol Today* 1984; **5**: 128-130.
4. **Abe R, Hodes RJ.** Properties of the Mis system. A revised formulation of Mis genetics and an analysis of T-cell recognition of Mis determinants. *Immunol Rev* 1989; **109**: 5-28.
5. **Festentein H, Kumur S, Biasi G.** Mis and tolerance. *Immunol Rev* 1989; **109**:29-59.
6. **Hall BM.** Transplantation tolerance: a 1988 perspective. *Transplant Proc* 1989; **21**:816-819.
7. **Klein J.** Natural History of Major Histocompatibility Complex. New Yode: John Wiley & Sons; 1986: 775.
8. **Silvers WK, Kimura H, Desquenne-Clark L, Miyamoto M.** Somew perspectives on transplantation immunity and tolerance. *Immunol Today* 1987; **8**: 118-122.
9. **Hall BM.** Tolerance and specific unresponsiveness in organ transplantation. *Immunol Aller Clin North Am* 1989; **9**: 61-77.
10. **Coeshott CM, Chesnut RW, Kubo RT, et al.** Ia-specific mixed lymphocyte reactive T cell hybridomas: Analysis of their specificity by using purified class II MHC molecules in a synthetic membrane system. *J Immunol* 1986; **136**: 2832-2838.
11. **Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al.** Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; **329**:506-512.
12. **Marrack P, Kappler J.** The T cell receptor. *Science* 1987; **1073**:1079.
13. **Sissons JGP, Borysiewicz LK, Rodgers B, Scott D.** Cytomegalovirus. Its cellular immunology and biology. *Immunol Today* 1986; **7**: 57-61.
14. **Griffiths PD, Grundy JE.** Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem J* 1987; **241**: 313-324.
15. **Forbes B.** Acquisition of cytomegalovirus infection: an update. *Clin Microbiol Rev* 1989; **2**: 204-216.
16. **Preiksaitis JK.** Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Immunol Aller Clin North Am* 1989; **9**:137-151.
17. **Simmons RL, Weil R, Tallent MB.** Do mild infections trigger the infection of renal allograft? *Transplant Proc* 1970; **2**: 419-423.
18. **López C, et al.** Association of renal allograft rejection with virus infections. *Am J Med* 1974; **56**: 280-289.
19. **Peterson PK, Balfour HH, Marker SC, et al.** Cytomegalovirus disease in renal allograft recipients: a prospective study of the clinical features, risk factors and impact on renal transplantation. *Medicine* 1980; **59**:283-300.
20. **Glenn J.** Cytomegalovirus infection following renal transplantation. *Rev Infec Dis* 1981; **3**: 1151-1178.
21. **Richardson WP, Colvin RB, Cheesman SH, et al.** Glomerulopathy associated cytomegalovirus viremia in renal allografts. *N Engl J Med* 1981;**305**:57-63.
22. **Herrera GA, Alexander RW, Cooley CF, et al.** Cytomegalovirus glomerulopathy: a controversial lesion. *Kidney Int* 1986; **29**: 725-733.
23. **Grundy JE, Reid MF.** The effect of primary and secondary infection with cytomegalovirus on the host responses to alloantigens. *Trans Proc* 1985;**17**:592-594.
24. **Von Willebrand E, Petterson E, Ahonen J, Hayry P.** Cytomegalovirus infection, class II expression and rejection during the course of the cytomegalovirus infection. *Trans Proc* 1986; **18**: 32-34.
25. **Vander BW.** Cytomegalovirus antigenemia: rapid diagnosis and relationship with CMV-associated clinical syndromes in renal allograft recipients. *Trans Proc* 1989; **21**: 2061-2064.
26. **Rook AH.** Virus specific cytotoxic lymphocyte response are predictive of outcome of CMV infections of renal transplant recipients. *Trans Proc* 1984; **16**: 1466-1469.

27. **Rook AH, Quinnan GV, Frederick WJR, et al.** Importance of cytotoxic lymphocytes during cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Am J Med* 1984; **76**: 385-439.
28. **Gaston JS, Waer M.** Virus-specific MHC-restricted T lymphocytes may initiate allograft rejection. *Immunol Today* 1985; **6**: 237-241.
29. **Terasaki PI, McClellan JD.** Microdroplet assay of human serum cytotoxic. *Nature* 1964; **204**: 998-1000.
30. **Correa MR, Ossa JE.** Estandarización de un método de ELISA para Citomegalovirus Humano (CMVH). *Acta Med Colom* 1990; **4**:180-186.
31. **Ardoin P.** Méthode ELISA et son application a la virologie. *Virus et diagnostic virologique*. Paris: Maloine SA; 1983: 841-855.
32. **Voiler A, Bieweel D.** Enzyme-linked immunoabsorbent assay. In: Rose NR, Friedman H, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3ed ed Washington DC: American Society of Microbiology; 1986: 99-109.
33. **Dubey DP, Yunis I, Yunis EJ.** Cellular typing: mixed lymphocyte response and cell-mediated lympholysis. In: Rose NR, Friedman H, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1986: 847-858.
34. **Ardoin P.** Cytomegalovirus. En: *Virus et diagnostic virologique*. Paris: Maloine SA; 1983: 83-96.
35. **Grist NR, Bell EJ, Follette EAC, Urquhart GED.** Diagnostic methods in clinical virology. 3rd ed. Blackwell Scientific Publications; 1979:320.
36. **Hudson JB.** Further studies on the mechanisms of centrifugal enhancement of cytomegalovirus infectivity. *J VirolMethods* 1988; **19**:97-108.
37. **Jansen HP, Van Loon AM, Meddens MJ, et al.** Immunological detection of cytomegalovirus early antigen on monolayer inoculated with urine specimens by centrifugation and cultures on 6 days as alternative to conventional virus isolation. *J Clin Microbiol* 1988; **26**: 1313-1315.
38. **Hirsch MS, Phillips SM, Solnick C, et al.** Activation of leukemia viruses by graft versus host and mixed lymphocyte reactions in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; **69**: 1069-1071.
39. **Armstrong MYK, Ruddle NH, Lipman MB.** Tumor induction by immunologically activated murine leukemia vims. *JExp Med* 1973; **137**: 1163-1179.
40. **Hirsch MS, Ellis DA, Kelly AP.** Activation of C-type viruses during skin graft rejection in the mouse. Interrelationships between immunostimulation and immunosuppression. *Int J Cancer* 1975; **15**: 493-502.
41. **Hirsch MS, Ellis DA, Black PH.** Leukemia virus activation during homograft rejection. *Science* 1973; **180**: 500-502.
42. **Hirsh MS, Black PH, Tracy GS.** Leukemia virus activation in chronic allogenic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; **67**:1914-1917.
43. **Moroni C, Schuman G.** Lypopolysaccharide induces C-type virus in short term cultures of BALB/X spleen cells. *Nature* 1975; **254**: 60-61.
44. **Greenberger JS, Phillips SM, Stephenson JR.** Induction of mouse type-C RNA virus by lypopolysaccharide. *J Immunol* 1975; **115**: 317-320.
45. **Moroni C, Schumann G, Robert-Guroff M.** Induction of murine C-type virus in spleen cell cultures treated with mitogens and 5-bromo-2 deoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 535-538.
46. **Shrier RD, Nelson JA, Oldstone MBA.** Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science* 1985; **230**: 1048-1051.
47. **Tolpin MD, Stewart JA, Warren D, et al.** Transfusion transmission of cytomegalovirus confirmed by restriction endonuclease analysis. *J Pediatr* 1985; **107**: 953-956.
48. **Wilhelm JA, Matter AJ, Schopper K.** The risk of transmitting cytomegalovirus to patients blood transfusions. *J Infect Dis* 1986; **154**: 169-171.
49. **Hirsch MS.** Cytomegalovirus-leukocyte interactions. *Birth Defects Orig Art Ser* 1984; **2**: 161-173.
50. **Tutinen LL, Saltzman R, Jordan MC, Haase AT.** Interactions of human cytomegalovirus with leukocytes in vivo: analysis by *in situ* hybridization. *Microb Pathogen* 1987; **3**: 287-297.
51. **Rice GPA, Schrier RD, Oldstone MBA.** Cytomegalovirus infects human lymphocytes and monocytes: virus expression is restricted to immediate-early gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**:6134-6138.
52. **Wu BC, Dowling JN, Armstrong JN, Ho M.** Enhancement of mouse cytomegalovirus infection during host-versus-graft reaction. *Science* 1979; **190**:56-59.
53. **Olding LB, Jensen FC, Oldstone MB.** Pathogenesis of cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 1975; **141**: 561-572.
54. **Pass RF, Whitley RJ, Diethelm AG, et al.** Cytomegalovirus infection in patients with renal transplants: potentiation by antithymocyte globulin and an incompatible graft. *N Engl J Med* 1986; **314**: 1414-1418.
55. **Reiser H, Kuhn J, Doerr WH, et al.** Human cytomegalovirus replicates in primary human bone marrow cells. *J Gen Virol* 1986; **67**: 2595-2604.
56. **Braun RW, Reiser HC.** Replication of human cytomegalovirus in human peripheral blood T cells. *J Virol* 1986; **60**: 29-36.
57. **Cassol SA, Poon M, Pal R, et al.** Primer-mediated enzymatic amplification of cytomegalovirus (CMV) DNA. Application to the early diagnosis of CMV infection in marrow transplant recipients. *J Clin Invest* 1989; **83**:1109-1115.
58. **Kanesaki T, Baba K, Tanka K, Ishibashi M, Yabuchi H.** Characterization of cytomegalovirus isolates recovered during repeated infection in renal transplant recipients. *J Med Virol* 1989; **28**: 140-143.
59. **Olive MD, Mufti SA, Simsek M, Fayed H, Hakib WA.** Direct detection of human cytomegalovirus in urine specimens from renal transplant patients following polymerase chain reaction amplification. *J Med Virol* 1989; **29**: 232-237.
60. **Demier GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May R.** Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 1988; **158**: 1177-1184.
61. **Shibata D, Martin NJ, Appleman MD, et al.** Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988; **158**: 1185-1192.
62. **Ettenger RB, Fine RN.** Renal transplant in children. In: Morris PJ, ed. *Kidney Transplantation: Principles and Practice*. 3rd ed. London: Grune and Stratton; 1989: 636-691.
63. **Bach FH, Bach ML, Sondel PM.** Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation. *Nature* 1976; **259**:273-281.
64. **Perdijn GG, Hendriks GJF, Van Rood JJ.** HLA matching, blood transfusion and renal transplantation. *Clin Immunol Aller* 1984; **4**: 535-565.
65. **Festenstein H, Ollier B.** Cellular typing and functional heterogeneity of MHC-encoded products. *British Med Bull* 1987; **43**: 122-155.
66. **Morris PJ, Fuggle SV, Ting A, Wood KJ.** HLA and organ transplantation. *British Med Bull* 1987; **43**: 184-202.
67. **Hansen JA, Beatty PG, Anasetti C, et al.** Transplantation of hematopoietic stem cells (HSC). *British Med Bull* 1987; **43**: 203-216.
68. **Harmon WE, Parkman R, Lavin PT, et al.** Comparison of cell-mediated lympholysis and mixed lymphocyte culture in the immunologic evaluation for renal transplantation. *J Immunol* 1982; **129**: 1573-1577.
69. **Santiago-Delpin E A, Nettleship E, Ruiz ML.** Pretransplant predictors of future kidney rejection. *Transplant Proc* 1983; **15**: 1787-1788.
70. **Pouteil-Noble C, Betuel H, Freidel AC, Dubernard JM, Touraine JL.** Correlation between the allogenic proliferative response and the outcome of renal transplantation. *Transplant Proc* 1987; **19**: 3637-3639.
71. **Opelz G, Terasaki PI.** Significance of mixed leukocyte culture testing in cadaver kidney transplantation. *Transplantation* 1977; **23**: 375-380.
72. **Carpenter CHB, Mildord EL.** HLA matching in cadaveric renal transplantation. *Immunol Aller Clin North Am* 1989; **9**: 45-60.
73. **Lazda VA, Jonasson O, Mozes MF.** Relationship of mixed lymphocyte culture (MCL) response and kidney graft survival in living related donor transplants. *Transplant Proc* 1981; **12**: 949-952.
74. **BejerleMJ, Smidtke RM, Ferguson RM, Simmons RL, Najarian JS.** Prognostic significance of mixed lymphocyte culture reactivity in renal transplantation. *Transplant Proc* 1978; **10**: 451-453.
75. **Shons AR, Etheredge EE, Schmidtke JR, Najarian JS.** The mixed lymphocyte response in human renal transplantation. *Transplant Proc*

- 1973;5:337-340.
76. **Cullen PR, Lester S, Rouch J, Morris PJ.** Mixed lymphocyte reaction and graft survival in forty cadaveric renal transplants. *Clin Exp Immunol* 1977; **28**:218-221.
 77. **Uren S, Boyle W.** Stimulation of allogenic and autologous MLR by subpopulations of human monocytes. *Transplant Proc* 1989; **21**:208-210.
 78. **Simpson E.** The role of H-Y as a minor transplantation antigen. *Immunol Today* 1982; **3**: 97-106.
 79. **Boneville M, Moreau JF, Blokland E, et al.** Products of HLA class I and class II (A, B, C, DP, DQ, DR) genes all contribute to induction of anti-donor responses in rejected kidneys. *Transplant Proc* 1988; **20**:193-196.
 80. **Song QL, Gregersen PK, Karr RW, Silver J.** Recombination between DQ and DQ6 genes generates human histocompatibility leukocyte antigen class II haplotype diversity. *J Immunol* 1987; **139**: 2993-2988.
 81. **Bushell A, Wood KJ, Morris PJ.** Restriction enzyme analysis identifies class II mismatches in serologically DR compatible human renal allografts. *Hum Immunol* 1988; **23**: 191-197.
 82. **Burlingham WJ.** What is known about blocking factors in renal allograft recipients. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; **16**: 15-20.
 83. **Miller J, Lifton J, Rood F, Hatler BG.** Blocking versus cytotoxic antibody in HLA and mixed lymphocyte culture-Identical and non-identical human renal transplant recipients. *Transplantation* 1975; **20**: 53-62.
 84. **Southantranm N, Gailunas P, Fagan G, et al.** Detection of anti-donor Fc antibodies: A strong correlate of rejection. *Transplant Proc* 1978; **10**: 605-607.
 85. **Forwell MA, Cocker JE, Peel MG, et al.** Correlations between high molecular weight serum Fc-receptor blocking factors and renal allograft survival. *Transplant Proc* 1985; **17**: 2572-2573.
 86. **Stewart E, Miller TE.** Host immune status in uremia. Cell-mediated immune mechanisms. *Clin Exp Immunol* 1980; **41**: 115-129.
 87. **Raskova J, Morrison AB, Shea SM, Raska K.** Humoral inhibitors of the immune response in uremia. II. Further characterization of an immunosuppressive factor. *Am J Pathol* 1979; **97**: 277-290.
 88. **Bansal VK, Robinson JA.** T-lymphocytes in chronic renal failure. *J Medicine* 1979; **10**: 457-466.
 89. **Klinger M, Kuczera J, Kruzel E.** The influence of uremic sera on the blast transformation of lymphocytes of healthy subjects stimulated with non-specific mitogens. *Arch Immunol Therap Exp* 1980; **28**: 73-82.
 90. **Garcia Moreno LF.** Estudios inmunológicos en pacientes con insuficiencia renal crónica. *Colombia Med* 1982; **13**: 10-16.