



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA  
DEPARTAMENT DE MEDICINA  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**MONITORIZACIÓN SÉRICA E HISTOLÓGICA  
DEL RECHAZO MEDIADO POR ANTICUERPOS  
EN TRASPLANTE RENAL**

Dolores Redondo Pachón

**Directores**

*Marta Crespo Barrio*

*Julio Pascual Santos*

**Tutor**

*Juan Pedro Botet Montoya*

Servicio de Nefrología

*Hospital del Mar*

*Institut Mar d'Investigacions Mediques*

*Barcelona*

2018



*“Tendrás que librar tus propias batallas, pero siempre estaré aquí para curar tus heridas”*

Mamá



A mis padres



## ÍNDICE

ÍNDICE .....	VII
AGRADECIMIENTOS .....	IX
FINANCIACIÓN .....	XI
RESUMEN DE LA TESIS .....	XIII
THESIS SUMMARY .....	XIV
LISTADO DE PUBLICACIONES .....	XV
ABREVIATURAS .....	XVII
TABLAS Y FIGURAS .....	XIX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Trasplante renal: importancia y causas de pérdida</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Anticuerpos anti-HLA y su impacto clínico</b> .....	<b>3</b>
1.2.1. <i>Sistema HLA (antígeno leucocitario humano)</i> .....	3
1.2.2. <i>Técnicas de detección de anticuerpos anti-HLA</i> .....	7
1.2.3. <i>Anticuerpos anti-HLA preformados</i> .....	13
1.2.4. <i>Impacto de los anticuerpos anti-HLA detectados postrasplante</i> .....	17
1.2.5. <i>Impacto clínico de otras características de los DSA detectados postrasplante</i> .....	22
1.2.6. <i>Anticuerpos HLA no clásicos: HLA-DP</i> .....	25
<b>1.3. Caracterización histológica del rechazo mediado por anticuerpos</b> .....	<b>26</b>
1.3.1. <i>Definición del rechazo mediado por anticuerpos en trasplante renal</i> .....	27
1.3.2. <i>Clasificación de Banff de las biopsias de trasplante renal y su evolución</i> .....	29
1.3.3. <i>Criterios diagnósticos del RMA según Banff</i> .....	33
1.3.4. <i>Incidencia e impacto clínico del RMA en trasplante renal</i> .....	36
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1. Impact of persistent and cleared HLA DSA on kidney transplant outcome</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2. Impact of preformed and de novo anti-HLA DP antibodies in renal allograft survival</b> .....	<b>57</b>
<b>3.3. Supervivencia del injerto renal según la categoría de Banff 2013 en biopsia por indicación</b> .....	<b>69</b>
<b>3.4. Impact of the Banff 2013 classification on the diagnosis of suspicious versus conclusive late antibody-mediated rejection in allografts without acute dysfunction</b> .....	<b>81</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>97</b>
<b>4.1. Impacto de la evolución postrasplante de los DSA preformados en el rechazo mediado por anticuerpos y supervivencia del injerto</b> .....	<b>97</b>
<b>4.2. Impacto de anticuerpos anti HLA-DP en la supervivencia del injerto</b> .....	<b>99</b>
<b>4.3. Supervivencia del injerto renal según la categoría diagnóstica de Banff 2013 en biopsias por indicación</b> .....	<b>101</b>



<b>4.4. Impacto de la nueva clasificación de Banff 13 en el diagnóstico del rechazo mediado por anticuerpos .....</b>	<b>103</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>6. PERSPECTIVAS DE FUTURO .....</b>	<b>114</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>118</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis ha sido posible gracias al apoyo y el trabajo de muchos compañeros de mi vida profesional y personal.

A Julio Pascual, por confiar en mí. Por darme la oportunidad de estar aquí, de unirme a su equipo. Por exigirme y sacar lo mejor de mí. Por aprender cada día a su lado, por el tiempo y la energía dedicada, por el apoyo brindado siempre. Por ser co-director de esta tesis.

A Marta Crespo, por ser mi mentora. Por enseñarme todo lo que sé del mundo del trasplante y los anticuerpos. Por todas las oportunidades y manos tendidas. Por todo el esfuerzo dedicado, sin horarios y siempre con disponibilidad absoluta. Por permitirme aprender de ella, y ser mejor nefróloga y persona. Por dirigir esta tesis.

A Marisa Mir por muchas enseñanzas, confianzas y chocoleches compartidos.

A Javier Gimeno y Carlos Arias por tantas horas de trabajo juntos, y por ponérmelo tan fácil.

A todos mis compañeros del Hospital del Mar por acogerme desde el primer día como una más del equipo. Por aprender de vosotros.

A mis compañeros del Hospital de Elche, en especial a Ricardo Enríquez por muchas enseñanzas nefrológicas, y de vida.

A Pedro Aljama y mis adjuntos del Hospital Reina Sofía por formarme como nefróloga y por dejarme dar esos primeros pasos junto a ellos. A mis residentes, grandes y pequeñas, por vivir una de las mejores etapas profesionales.

A María José Pérez, por ser mi compañera en la nefrología, y en la vida...; y por permitirme que caminemos juntas de forma incondicional, pase lo que pase. A Clara Barrios, por muchos comités de crisis resueltos.

A mis amigos de Córdoba, en especial a M<sup>a</sup> Carmen Pérez, por ser amigas de toda la vida.

A mis abuelos, por poner los cimientos para que esto sea posible y por ser las personas a las que más felices les haría esta tesis. A mis tíos y primos, por anclarme en mis raíces; especialmente a mis tíos Mari y Antonio, siempre presentes.

A mi hermana, por ser mi otro yo en la vida, por pelearnos y por no poder vivir la una sin la otra. A Miguel por Ángeles y por Arturo.

A mi madre, por enseñarme que todo es posible con esfuerzo y que, aunque no tengas estrella, puedes llegar a conseguirla si peleas por ello.

A mi padre, por estar siempre ahí. Por cuidarnos, por enseñarnos, por mimarnos, por apoyarnos en cada decisión. Pero sobre todo, porque esta tesis es tuya.



## FINANCIACIÓN

Estos estudios han sido financiados con los proyectos de investigación:

- ISCIII FIS-FEDER PI10/01370 → *Monitorización de la respuesta inmune humoral y celular en el trasplante renal y su correlación clínica*. IP Dr. Julio Pascual
- ISCIII FIS-FEDER PI13/00598 → *Análisis prospectivo de la respuesta humoral y celular en el trasplante renal y su impacto en la disfunción crónica del injerto*. IP Dr. Julio Pascual
- ISCIII FIS-FEDER PI16/00617 → *Anticuerpos HLA y no HLA en el rechazo del trasplante renal y mecanismos de lesión*. IP Dres. Julio Pascual y Marta Crespo
- Fundación La Marató de TV3 (137/C/2012) → *Adaptive NK cell-mediated response to cytomegalovirus in the context of immunosuppression: clinical implications in renal transplantation*. Coordinadora: Dra. Marta Crespo
- ISCIII INT14/00195 → *Intensificación de la actividad investigadora en el Sistema Nacional de Salud*. Dr. Julio Pascual en 2015
- ISCIII INT15/00088 → *Intensificación de la actividad investigadora en el Sistema Nacional de Salud*. Dr. Julio Pascual en 2016
- Intensificación de la actividad investigadora concedida por el Parc de Salut MAR-IMIM a la Dra. Marta Crespo en los años 2011, 2012 y 2013



## RESUMEN DE LA TESIS

El trasplante renal es el tratamiento de elección en los pacientes con enfermedad renal crónica avanzada porque mejora la supervivencia del paciente, su calidad de vida e implica menores costes si lo comparamos con el tratamiento sustitutivo mediante diálisis. En los últimos años, los avances en la inmunosupresión, la mejora en las técnicas quirúrgicas y el mejor conocimiento de la inmunología del trasplante ha permitido mejorar la supervivencia del paciente y del injerto a corto; sin embargo, las tasas de pérdida a medio y largo plazo permanecen estables. Se han producido dos importantes avances en la última década: nuevas técnicas de detección de anticuerpos HLA y mejor caracterización histológica del rechazo mediado por anticuerpos.

El objetivo de la presente tesis ha sido profundizar en el conocimiento del rechazo mediado por anticuerpos abordando nuevos aspectos desde dos puntos de vista: estudio serológico de los anticuerpos HLA y caracterización histológica del rechazo humoral.

Para ello, hemos analizado una amplia cohorte de pacientes trasplantados con estudio de anticuerpos antiHLA pre y postrasplante determinados mediante tecnología Luminex<sup>®</sup>. Los pacientes con anticuerpos dirigidos frente al donante detectados pretrasplante presentan una peor supervivencia del injerto y mayor riesgo de rechazo mediado por anticuerpos; y este riesgo sigue incrementado tanto si persiste como si no el anticuerpo después del trasplante o aparece *de novo*. Por otro lado, hemos realizado el estudio de otros anticuerpos considerados clásicamente menos inmunogénicos y con poca relevancia en el campo del trasplante hasta la fecha, pero que las nuevas técnicas en fase sólida son capaces de detectar, como son los anticuerpos anti- HLA DP. En nuestra experiencia, el 10% de los pacientes trasplantados presentan anticuerpos antiHLA-DP detectados por Luminex<sup>®</sup>, tanto pre como postrasplante. La presencia de estos anticuerpos no parece modificar el impacto en supervivencia del injerto.

Desde el punto de vista histológico, hemos demostrado que el rechazo mediado por anticuerpos es un diagnóstico frecuente en las biopsias de injerto renal realizadas por indicación según los criterios de la clasificación Banff 2013, y presenta un peor pronóstico que otras categorías histológicas. Finalmente, hemos profundizado en el análisis de la categoría histológica de rechazo mediado por anticuerpos comparando la clasificación de Banff 2009 con la nueva definición de cambios mediados por anticuerpos de la clasificación de Banff 2013. Según nuestros resultados, la clasificación de Banff 2013 proporciona un diagnóstico más preciso del rechazo mediado por anticuerpos.

## THESIS SUMMARY

Kidney transplantation is considered the treatment of choice for patients with end-stage renal disease. It is associated with improved survival, better quality of life and reduced costs when compared with dialysis.

In recent years, the progress on immunosuppression, the improvements in the surgical techniques and our better understanding of transplantation immunology have made it possible to improve both the patient and graft survival, notwithstanding this, loss rates in medium and long-term outcomes experienced stability.

Two major developments have taken place over the last decade: new techniques to detect HLA antibodies, and a better histological characterization of antibody-mediated rejection.

The aim of this thesis is to go further into depth on knowledge of antibody-mediated rejection by addressing the issue from the point in two respects: HLA antibody serological survey and histological characterization of humoral rejection.

To that end, we have analyzed a large cohort of transplant patients with pre and post-transplant anti-HLA antibodies determined by Luminex<sup>®</sup> technologies.

Patients with preformed donor specific antibodies show worse graft survival and greater risk of antibody-mediated rejection, regardless potential DSA clearing after transplantation

Furthermore, we carried out a survey of typically less immunogenic antibodies with low relevance in the transplant field thus far, such as HLA DP, albeit it is detectable by recent solid phase techniques.

In our experience, 10% of transplant patients show antiHLA-DP antibodies as detected by Luminex<sup>®</sup> assay both pre and post-transplant. The presence of these antibodies does not seem to change graft survival impact.

Histologically, we have shown that antibody-mediated rejection is a common diagnosis most often seen in kidney graft biopsies as carried out according to Banff 2013 classification criteria; antibody-mediated rejection also shows worse prognosis compared to other histological categories.

Eventually, we have delved into the analysis of antibody-mediated rejection category by comparing Banff 2009 classification to the new antibody-mediated changes from Banff 2013. According to our results, Banff 2013 classification provides a more accurate diagnosis of antibody-mediated rejection.

## LISTADO DE PUBLICACIONES

1. Redondo-Pachón D, Pérez-Sáez MJ, Mir M, Gimeno J, Llinás L, García C, Hernández JJ, Yélamos J, Pascual J, Crespo M.

**Impact of persistent and cleared preformed HLA DSA on kidney transplant outcome.**

*Human Immunology. 2018 Mar 7. pii: S0198-8859(18)30053-3.  
doi: 10.1016/j.humimm.2018.02.014*

2. Redondo-Pachón D, Pascual J, Pérez-Sáez MJ, García C, Hernández JJ, Gimeno J, Mir M, Crespo M.

**Impact of preformed and *de novo* anti-HLA DP antibodies in renal allograft survival.**

*Transplant Immunology. 2016 Feb;34:1-7.  
doi: 10.1016/j.trim.2015.11.002.*

3. Arias-Cabrales C, Redondo-Pachón D, Pérez-Sáez MJ, Gimeno J, Sánchez-Güerri I, Bermejo S, Sierra A, Burballa C, Mir M, Crespo M, Pascual J.

**Supervivencia del injerto renal según la categoría de Banff 2013 en biopsia por indicación.**

*Nefrología (Madr.) 2016;36:660-6.  
doi: 10.1016/j.nefro.2016.05.018.*

4. Gimeno J, Redondo D, Pérez-Sáez MJ, Naranjo-Hans D, Pascual J, Crespo M.

**Impact of the Banff 2013 classification on the diagnosis of suspicious versus conclusive late antibody-mediated rejection in allografts without acute dysfunction.**

*Nephrol Dial Transplant. 2016 Nov;31(11):1938-1946.*





## ABREVIATURAS

BR.....	<i>Biopsia renal</i>
CDC.....	<i>Citotoxicidad mediada por complemento</i>
CF.....	<i>Citometría de flujo</i>
CMH.....	<i>Complejo mayor de histocompatibilidad</i>
Cpt.....	<i>Capilar peritubular</i>
DSA.....	<i>Anticuerpos donante-específicos</i>
DTT.....	<i>Dithiothreitol</i>
ELISA.....	<i>Enzyme-Linked immunosorbent Assay</i>
ERC.....	<i>Enfermedad renal crónica</i>
FDA.....	<i>Food and Drug Administration</i>
FI/AT.....	<i>Fibrosis intersticial y atrofia tubular</i>
G.....	<i>Glomerulitis</i>
GCT.....	<i>Glomerulopatía crónica del trasplante</i>
HLA.....	<i>Antígeno leucocitario humano</i>
HR.....	<i>Hazard ratio</i>
Ig.....	<i>Inmunoglobulina</i>
IMV.....	<i>Inflamación microvascular</i>
IPD.....	<i>Immuno polymorphism database</i>
MAC.....	<i>Complejo ataque de la membrana</i>
ME.....	<i>Microscopía electrónica</i>
MFI.....	<i>Median fluorescence intensity</i>
MMF.....	<i>Micofenolato mofetilo</i>
NS.....	<i>No significativo</i>
OMS.....	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
ONT.....	<i>Organización nacional de trasplantes</i>
OR.....	<i>Odds ratio</i>
PRA.....	<i>Panel reactive antibodies</i>
RMA.....	<i>Rechazo mediado por anticuerpos</i>
SA.....	<i>Single antigen</i>
TCR.....	<i>Receptores de los linfocitos T</i>
TR.....	<i>Trasplante renal</i>
XMV.....	<i>Prueba cruzada virtual</i>



## TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

<b>Tabla 1</b>	<i>Ejemplo de nomenclatura actual HLA</i> .....	7
<b>Tabla 2</b>	<i>Comparación de las características de las diferentes técnicas de detección de anticuerpos anti-HLA</i> .....	13
<b>Tabla 3</b>	<i>Incidencia de DSA preformados detectados por Luminex® de acuerdo a prueba cruzada por citometría de flujo</i> .....	14
<b>Tabla 4</b>	<i>Riesgo de rechazo agudo en pacientes con DSA preformados</i> .....	15
<b>Tabla 5</b>	<i>Supervivencia del injerto (muerte censurada) de pacientes con DSA preformados comparada con pacientes sin DSA en el momento del trasplante</i> .....	17
<b>Tabla 6</b>	<i>Estudios de incidencia y prevalencia de DSA de novo</i> .....	19
<b>Tabla 7</b>	<i>Factores de riesgo asociados al desarrollo de DSA detectados postrasplante en estudios con modelos multivariantes ajustados a factores confusores</i> .....	20
<b>Tabla 8</b>	<i>Supervivencia del injerto en los pacientes que desarrollan DSA postrasplante comparada con los pacientes sin DSA</i> .....	21
<b>Tabla 9</b>	<i>Estudios que evalúan el impacto de la fijación de complemento de los DSA pretrasplante</i> .....	24
<b>Tabla 10</b>	<i>Estudios que evalúan el impacto de la fijación de complemento de los DSA postrasplante</i> .....	25
<b>Tabla 11</b>	<i>Comparación de las características histológicas del rechazo mediado por anticuerpos comparando la clasificación de Banff 2013 vs 2009</i> .....	31
<b>Tabla 12</b>	<i>Categoría 2 o rechazo mediado por anticuerpos según la clasificación de Banff 2017 (144)</i> .....	32

### FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Informe de la organización nacional de trasplante de 2017: evolución del número de trasplantes realizados y lista de espera</i> .....	1
<b>Figura 2</b>	<i>Causas de pérdidas en pacientes trasplantados del Hospital del Mar (2006-2016). [2A] Causas de muerte con injerto funcionando. [2B] Causas de pérdida de injerto</i> .....	2
<b>Figura 3</b>	<i>Localización y organización del sistema HLA en el cromosoma 6</i> .....	4
<b>Figura 4</b>	<i>Número de alelos HLA clase I y II registrados anualmente en IMGT/HLA Database [Modificado de (21)]</i> .....	4
<b>Figura 5</b>	<i>Expresión codominante de los genes HLA. [Modificado de (18)]</i> .....	5
<b>Figura 6</b>	<i>Estructura de las moléculas HLA de clase I y HLA de clase II. Modificado de (18)</i> .....	6
<b>Figura 7</b>	<i>Nomenclatura actual del sistema HLA</i> .....	7
<b>Figura 8</b>	<i>Técnicas de detección de anticuerpos anti-HLA</i> .....	8



## **INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Trasplante renal: importancia y causas de pérdida

El trasplante renal ha demostrado ser el mejor tratamiento en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) cuando se comparan con otras técnicas de terapia renal sustitutiva, tanto en términos de supervivencia (1, 2) como en calidad de vida(3).

El último informe de la organización nacional de trasplantes (ONT) muestra que más de la mitad de los pacientes con ERC en terapia renal sustitutiva en España tiene un injerto funcionando. España se mantiene a la cabeza mundial en tasas de trasplante renal, lo cual no evita que actualmente casi 4000 pacientes continúen esperando un riñón mientras permanecen en un programa de diálisis (188) (Figura 1).

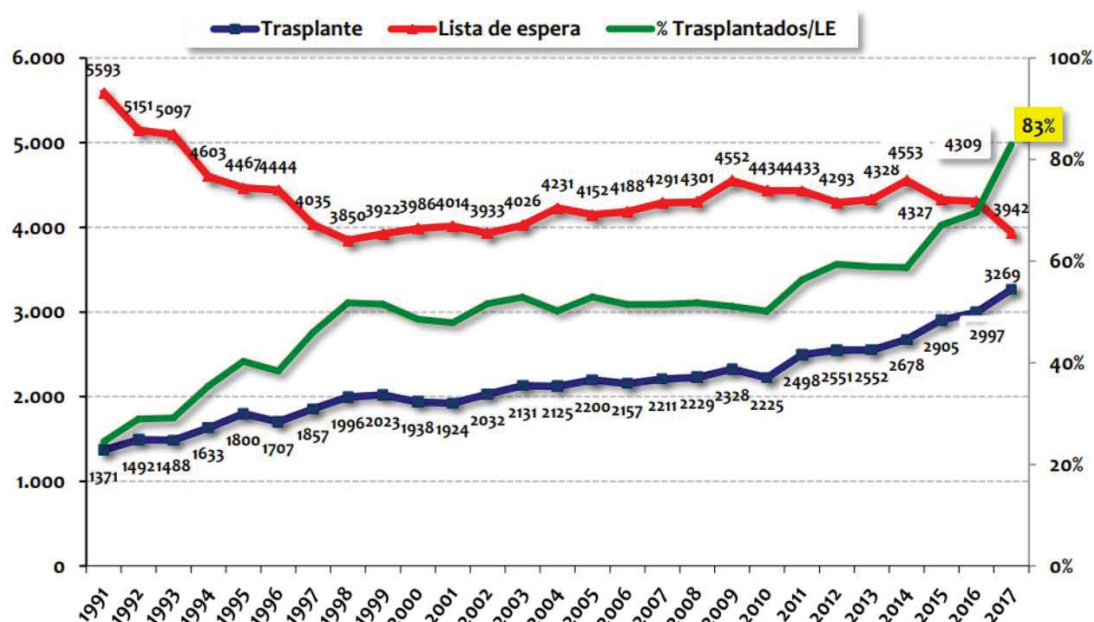


Figura 1 - Informe de la organización nacional de trasplante de 2017: evolución del número de trasplantes realizados y lista de espera.

Los avances en inmunosupresión, en técnicas quirúrgicas y en el conocimiento de la inmunología del trasplante han permitido mejorar las tasas de supervivencia del paciente y del injerto, fundamentalmente a corto plazo. La probabilidad de pérdida de injerto por todas las causas el primer año postrasplante ha pasado del 13.9% en 1997 al 7.7% en 2013 (4). Sin embargo, alrededor del 50% de los injertos renales se pierden a los 10 años y las tasas de pérdida de injerto más allá del primer año se han mantenido estables en los últimos 25 años. La tasa anual de pérdida es del 3-5% para trasplantes renales procedentes de donantes fallecidos en muerte encefálica óptimos y 2-3% para injertos procedentes de donante vivo (5). Las múltiples causas involucradas en estas pérdidas de injerto conducen a lo que se ha denominado de forma clásica la disfunción crónica del injerto o nefropatía crónica del injerto. Esta entidad es un cajón



Esta entidad es un cajón de sastre, que engloba pérdidas debidas a un conjunto de factores que incluyen causas inmunológicas y no inmunológicas que originan glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial, y finalmente llevan a la pérdida del injerto (6, 7). Un estudio de El-Zoghby et al (8) analizó en 1317 receptores de trasplante renal con biopsias de protocolo en diferentes momentos postrasplante, las causas más frecuentes de pérdida de injerto de pacientes que no fallecieron durante más de 5 años de seguimiento: la enfermedad glomerular (que incluye recidiva de la enfermedad glomerular de base y la glomerulopatía crónica del trasplante), seguida de la IFTA y del rechazo agudo.

Para la presente tesis, hemos analizado las pérdidas de injerto de los últimos 10 años de nuestra cohorte de pacientes trasplantados en el Hospital del Mar. De las 255 pérdidas entre 2006 hasta 2016, con una mediana de seguimiento de 66 meses [rango intercuartílico (RIQ) 6-158 meses], 88 (35%) pacientes mueren con injerto funcionando (Figura 2A) y 161 (63%) pierden el injerto con vuelta a diálisis o retrasplante. Cuando analizamos las causas de pérdida de injerto, observamos que el 45% son debidas a rechazo crónico (el 18% de ellas, demostrado por biopsia) (Figura 2B)

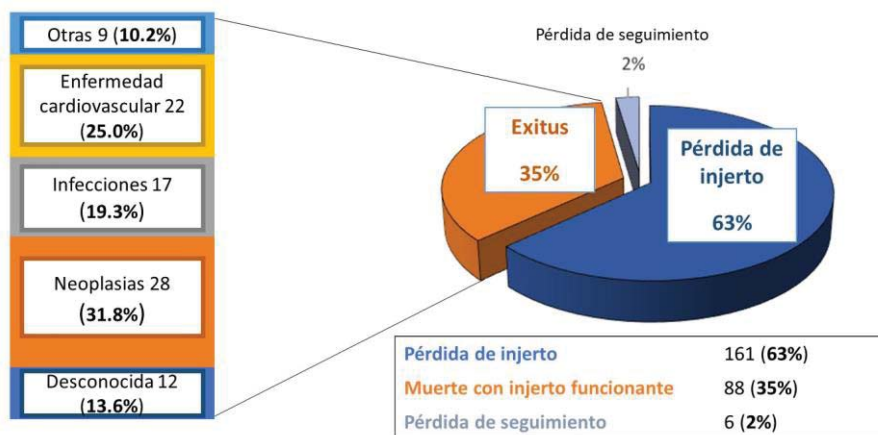


Figura 2A

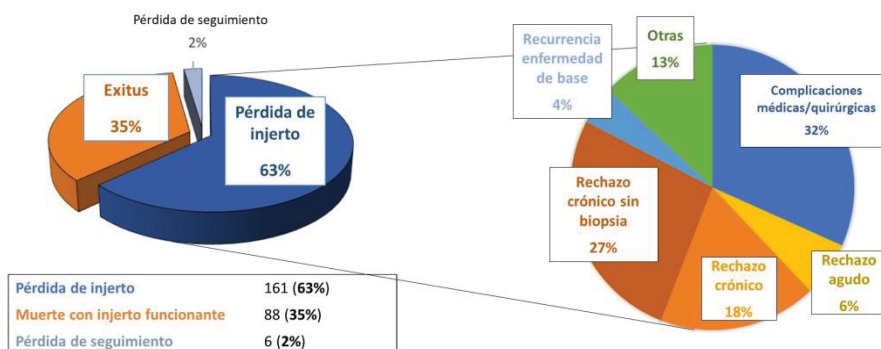


Figura 2B

Figura 2 - Causas de pérdidas en pacientes trasplantados del Hospital del Mar (2006-2016). [2A] Causas de muerte con injerto funcionando. [2B] Causas de pérdida de injerto

En los últimos años, se ha tratado de avanzar en el conocimiento de la patogénesis y los mecanismos que llevan a esta pérdida tardía o crónica del injerto. En este sentido, entre los más importantes avances en la última década se encuentran el desarrollo de nuevas técnicas de detección de anticuerpos (9-13) la mejor caracterización del rechazo mediado por anticuerpos (RMA) (14-17). En este sentido, la incorporación de la tecnología Luminex<sup>®</sup>, la detección de depósitos de complemento en forma de C4d y la incorporación de la inflamación microvascular (IMV) en las biopsias renales (BR) como criterio diagnóstico ha cambiado el paradigma en el campo del rechazo humoral.

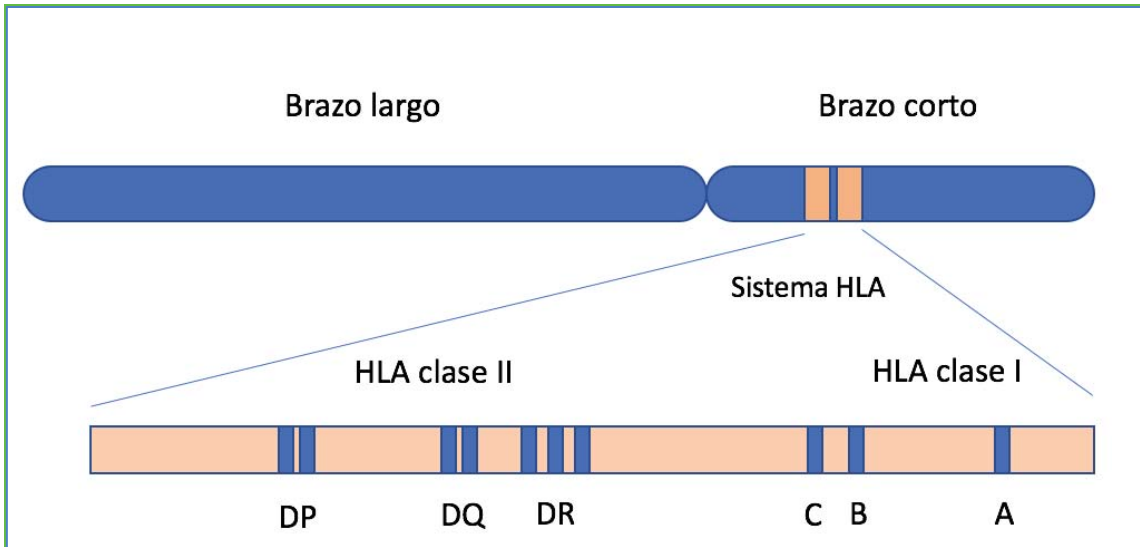
A pesar de estos avances en las herramientas diagnósticas del RMA, se desconoce su impacto real en la pérdida de injerto a medio y largo plazo dada la variedad de fenotipos que abarca. Además, excepto en el caso del RMA con disfunción renal precoz, no disponemos de tratamientos eficaces. Es importante contribuir a la mejor caracterización de los diferentes fenotipos del RMA, y sus características serológicas e histológicas con objeto de determinar sus implicaciones terapéuticas y pronósticas.

## **1.2. Anticuerpos anti-HLA y su impacto clínico**

### *1.2.1. Sistema HLA (antígeno leucocitario humano)*

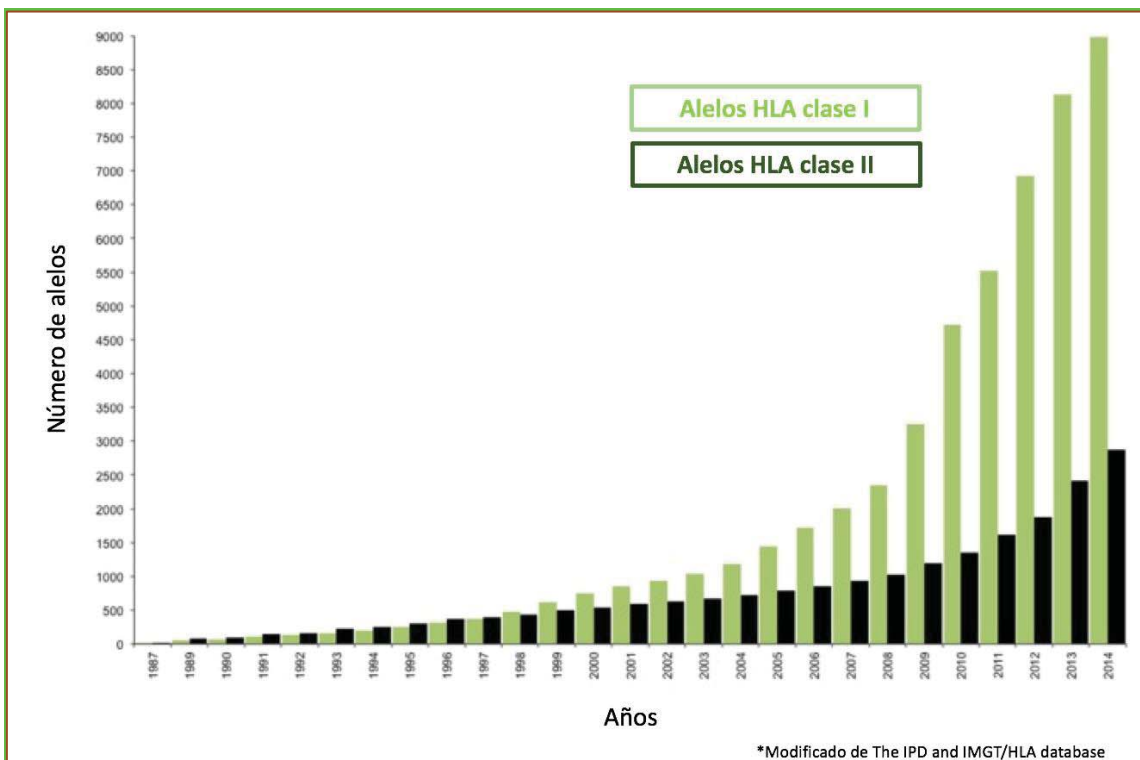
El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) es un conjunto de genes que codifican proteínas especializadas en la presentación antigénica, que permiten la activación de procesos críticos en la generación de la respuesta inmune. La función fisiológica de las moléculas del CMH es la presentación de péptidos a los linfocitos T. Las moléculas del CMH son parte integral de los ligandos que reconocen la mayoría de las células T, ya que los receptores de antígenos de las células T son específicos para los complejos de antígenos peptídicos extraños y moléculas del CMH propias (18). Por tanto, la función de las moléculas del CMH es unir fragmentos peptídicos derivados de agentes patógenos y presentarlos sobre la superficie celular para su reconocimiento por las células T apropiadas. En humanos, el CMH se denomina sistema Antígeno Leucocitario Humano (HLA). Se caracteriza por ser poligénico, polimórfico y expresarse en la membrana de las células, es decir, muy accesible a los anticuerpos y a los receptores de los linfocitos T (TCR). Su función fisiológica en células especializadas es la de presentar péptidos a los linfocitos. Su estructura está modulada para encajar perfectamente en los TCR, lo que permite que los linfocitos reconozcan con precisión pequeñas diferencias en las secuencias peptídicas de sus alelos. (18, 19).

El sistema HLA se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, y se han identificado más de 400 genes. (20)



**Figura 3 - Localización y organización del sistema HLA en el cromosoma 6**

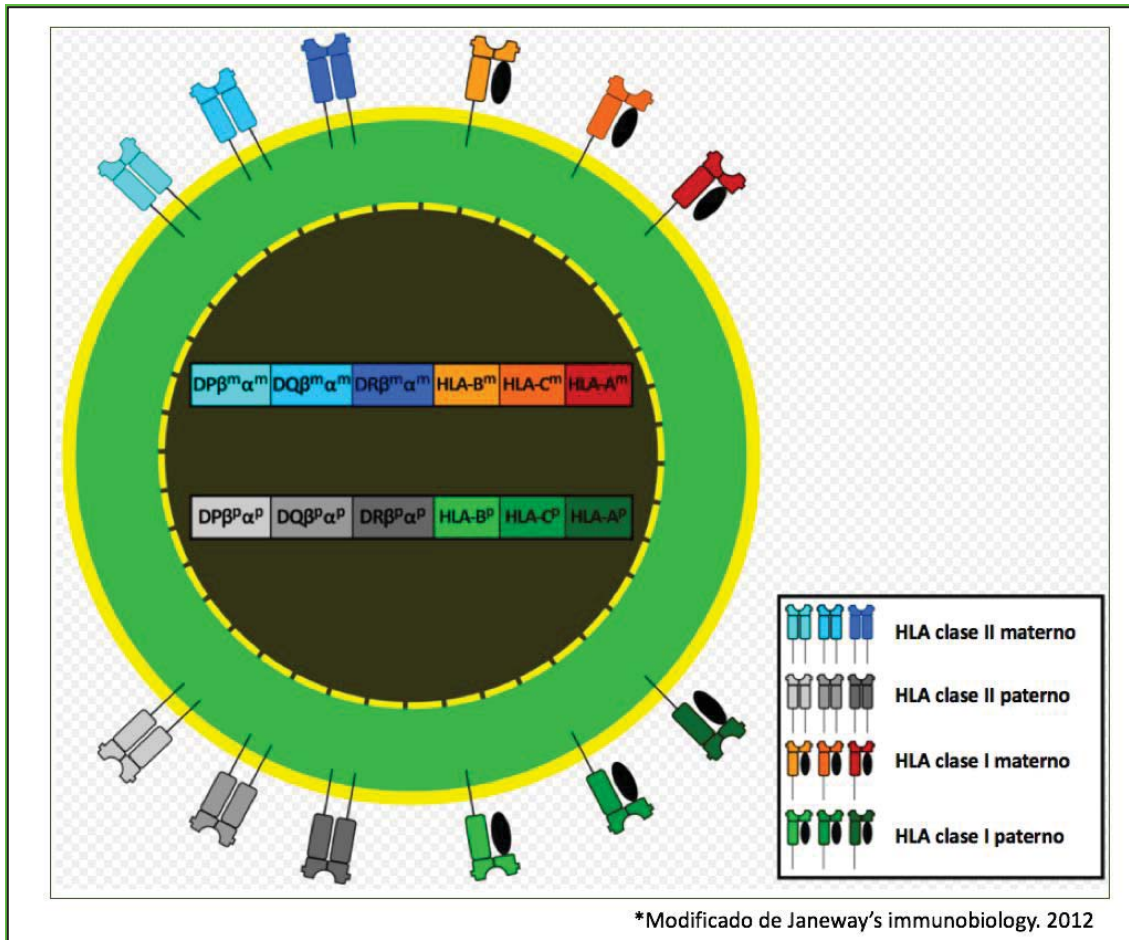
Las proteínas que codifica se expresan como heterodímeros en las superficies celulares y su elevado grado de polimorfismo ha permitido identificar en la actualidad más de 16.000 alelos(21). Este alto grado de polimorfismo es el responsable del reconocimiento como “agentes extraños” de trasplantes de órgano sólido y células hematopoyéticas cuando atravesamos las barreras naturales.



**Figura 4 - Número de alelos HLA clase I y II registrados anualmente en IMGT/HLA Database [Modificado de (21)]**

El sistema HLA se hereda en codominancia y habitualmente como una unidad que se denomina haplotipo. Los dos haplotipos, cada uno heredado de cada progenitor, conforman el genotipo del

individuo (20). Ciertas combinaciones de alelos se heredan juntos con más frecuencia, fenómeno conocido como desequilibrio de ligamiento.



**Figura 5 - Expresión codominante de los genes HLA. [Modificado de (18)]**

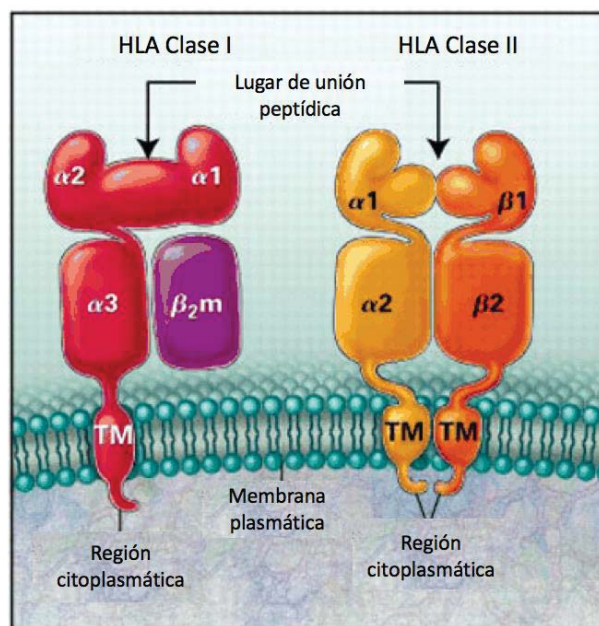
Se conocen tres clases de moléculas HLA, si bien sólo dos tienen un papel definido en el reconocimiento antigénico en trasplante (19):

a) HLA clase I

Las moléculas de clase I son heterotrímeros que se expresan en la superficie de casi todas las células nucleadas. Estas moléculas están constituidas por dos cadenas polipeptídicas unidas sin enlaces covalentes: una cadena pesada variable (denominada cadena  $\alpha$ ) y una subunidad constante no codificada en el cromosoma 6 sino en el cromosoma 15, denominada  $\beta$ -microglobulina. La asociación de ambas cadenas es imprescindible para que las moléculas de clase I se expresen en la superficie de la membrana celular. La molécula de clase I se ancla en la membrana plasmática mediante su segmento hidrofóbico transmembrana y el tallo hidrofílico citoplasmático. La principal función de las moléculas de clase I es presentar péptidos a las células T CD8<sup>+</sup>.

## b) HLA clase II

Las moléculas de clase II son glicoproteínas unidas a membranas celulares y solo se encuentran de forma constitutiva en la superficie de las células dendríticas, linfocitos B y macrófagos. Están compuestas por dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente: una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ , ambas codificadas por genes polimórficos del CMH (excepto los antígenos HLA DR, con polimorfismo sólo para la cadena  $\beta$ ). Cada una de ellas contiene dos dominios externos  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ . Los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  forman una hendidura que será la zona de unión al antígeno. A diferencia de las moléculas de clase I, la función de las moléculas de clase II es la presentación de péptidos a las células T CD4<sup>+</sup>.



\*Modificado de Janeway's immunobiology. 2012

**Figura 6 - Estructura de las moléculas HLA de clase I y HLA de clase II. Modificado de (18)**

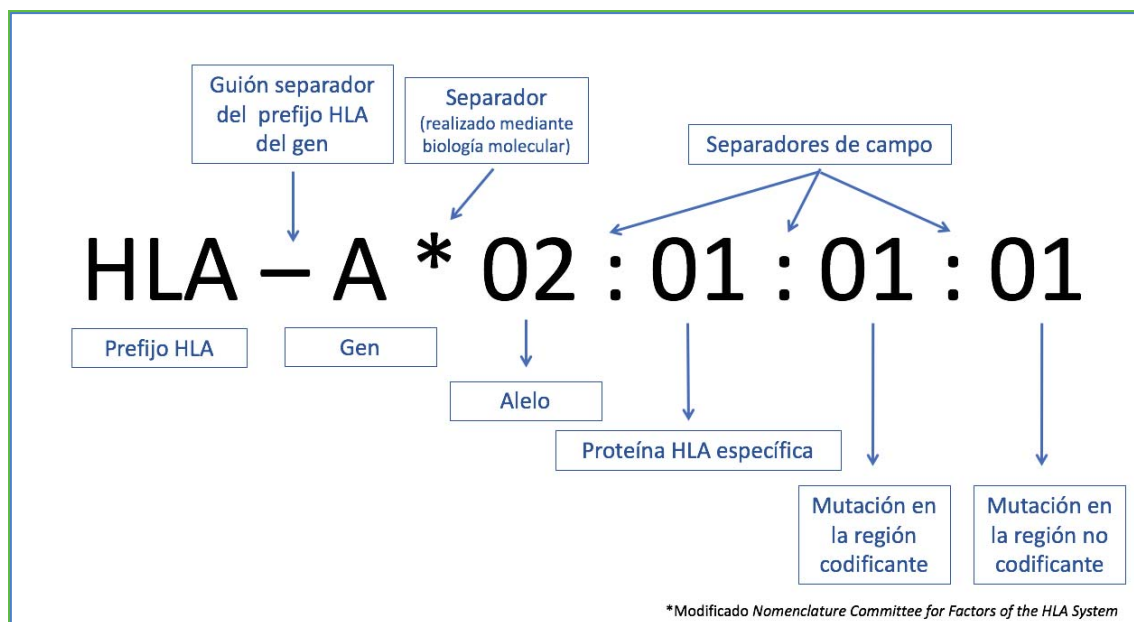
### *Nomenclatura del sistema HLA*

La nomenclatura estandarizada del sistema HLA, incorporación de nuevos genes, secuencias de alelos y control de calidad está establecida por el *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La estandarización de las especificidades antigénicas HLA se establecen en los *International Histocompatibility Workshops*.(22)

Desde que en el año 1958 se descubrió el primer antígeno HLA denominado inicialmente "Mac", los diferentes laboratorios fueron nombrando las especificidades a medida que se iban describiendo. La recomendación inicial del grupo de expertos de la OMS fue la de establecer una nomenclatura única que consistiera en el prefijo "HL-A" seguido por un número. Posteriormente, según se fueron descubriendo los genes HLA, se introdujeron las letras A, B, C,

DP, DQ y DR a continuación del prefijo “HLA” y como sufijo el código numérico. Desde entonces hasta el 2010, la nomenclatura HLA fue sufriendo cambios a medida que se iban describiendo más alelos y las técnicas de detección evolucionaban.

Actualmente la nomenclatura estandarizada propuesta por *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* se muestra en la figura 6 (23).



**Figura 7 - Nomenclatura actual del sistema HLA**

En la siguiente tabla se expone un ejemplo de la nomenclatura HLA y su significado:

**Tabla 1 Ejemplo de nomenclatura actual HLA**

HLA	Gen HLA
<i>HLA-DRB1</i>	Locus HLA, ejemplo DRB1
<i>HLA-DRB1*13</i>	Grupo de alelos que codifica el antígeno DR13
<i>HLA-DRB1*13:01</i>	Especificidad alélica
<i>HLA-DRB1*13:01:02</i>	Alelo que difiere en una mutación de DRB1*13:01:01

En trasplante renal actualmente se recomienda realizar el tipaje hasta la especificidad alélica (24).

### 1.2.2. Técnicas de detección de anticuerpos anti-HLA

En la actualidad disponemos diversas técnicas para la detección de anticuerpos anti-HLA que podemos diferenciar atendiendo a las dianas que utilizan en:

a) Técnicas celulares:

- Basadas en la utilización de células vivas
- Tipos de técnicas: Citotoxicidad mediada por complemento (CDC) y citometría de flujo (CF)

b) Técnicas en fase sólida:

- Basadas en el uso de moléculas HLA purificadas
- Tipos de técnicas: ELISA, FlowPRA® y Luminex®

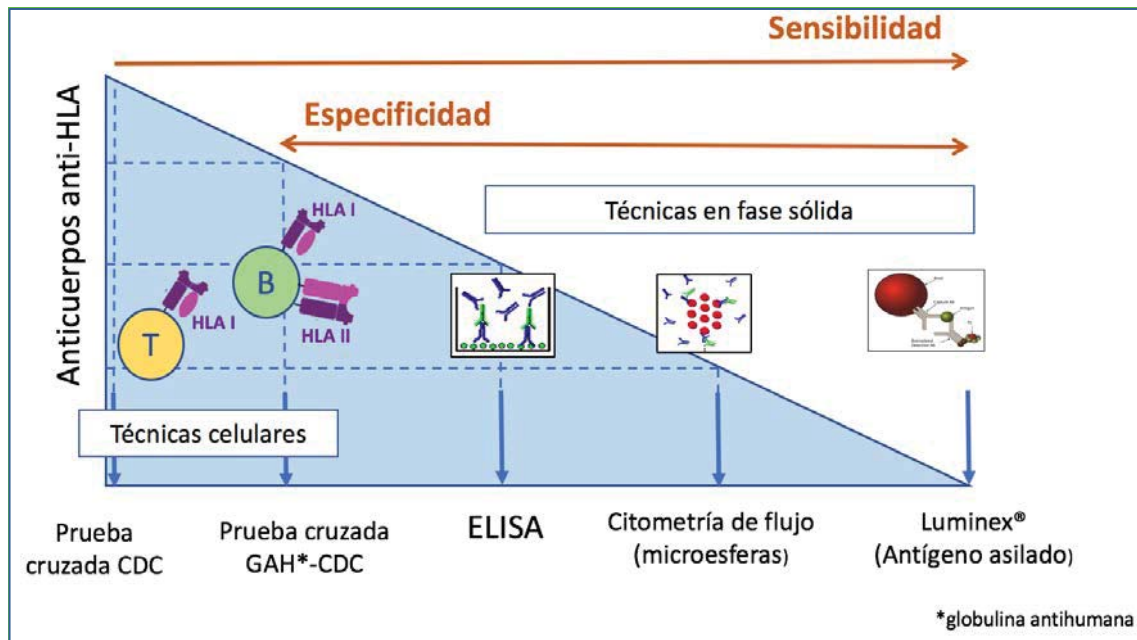


Figura 8 - Técnicas de detección de anticuerpos anti-HLA

a) Técnicas basadas en células

a.1) Citotoxicidad mediada por complemento (CDC)

La técnica de CDC es un ensayo biológico que requiere la unión de anticuerpos a las dianas antigénicas, la activación del sistema del complemento y la valoración por microscopía de la muerte celular revelada por medio de un colorante. Se basa en hacer reaccionar el suero del receptor con los linfocitos del potencial donante para establecer si existe una reacción antígeno-anticuerpo capaz de desencadenar una reacción de citotoxicidad dependiente de complemento. Si se trata el suero con DTT (dithiothreitol) es posible diferenciar los anticuerpos linfocitotóxicos de tipo IgM (generalmente autoanticuerpos) de los anticuerpos tipo IgG, debido a que el DTT rompe los puentes disulfuro de las inmunoglobulinas tipo IgM (25-27).

Esta técnica sigue vigente desde 1969, cuando Patel et al.(28) describieron su elevado poder predictivo de rechazo hiperagudo en trasplante renal. De hecho, en la actualidad forma parte de la rutina habitual antes de realizar un trasplante renal en muchos programas, contraindicando su realización si resulta positiva por el alto riesgo de rechazo hiperagudo.

La técnica CDC se utiliza para realizar la prueba cruzada pretrasplante renal, pero también para determinar si un potencial receptor tiene en el suero anticuerpos contra antígenos HLA. Para esto se utiliza un panel amplio de células que representan la distribución de posibles donantes renales. De ahí surge el concepto de *Panel Reactive Antibodies* (PRA): porcentaje de células frente a las que la prueba cruzada es positiva. Este valor numérico es una estimación de la probabilidad de acceso al trasplante de un receptor. Dentro del estudio inmunológico para la evaluación y seguimiento de los pacientes en lista de espera se recomienda el estudio periódico de los sueros y tras un evento sensibilizante.

#### a.2) Citometría de flujo (CF)

Para detectar anticuerpos anti-HLA donante-específicos mediante CF se emplean como fuente de antígenos los linfocitos procedentes del donante (29, 30). La CM revela anticuerpos presentes en el suero del receptor que se unen a los antígenos de membrana de los linfocitos del donante mediante una anti-IgG humana marcada con un fluorocromo. Permite distinguir los anticuerpos anti-HLA de clase II, que se unen únicamente con los linfocitos B, de los anti-HLA clase I que reaccionan con los linfocitos T y los B. La positividad de la prueba se basa en el incremento del canal medio de fluorescencia que emiten las células, y cada laboratorio determinará su umbral de positividad.

Aunque la CF también está sujeta a los inconvenientes de utilizar células, es más sensible que las técnicas de CDC y ha demostrado ser útil para identificar pacientes con DSA pero prueba cruzada por CDC negativa, y por tanto mayor riesgo de rechazo mediado por anticuerpos (31, 32).

Los ensayos de CF son difíciles de estandarizar debido a la variabilidad entre citómetros, fluorocromos, reactivos antiglobulina, y variaciones en la ratio célula/suero. Por estos motivos, el *Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation* (11) propone que cada laboratorio valide sus resultados con esta técnica y los correlacione con el riesgo clínico en su propio centro.

#### b) Técnicas en fase sólida

##### b.1) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

El método de ELISA está fundamentado en el uso de moléculas HLA adheridas a un soporte plástico. Estas moléculas HLA se obtienen por inmunoprecipitación de plaquetas o líneas celulares immortalizadas por virus de Epstein Barr o mediante



proteínas recombinantes. Mediante la lectura de la densidad óptica que genera el cambio de color de un sustrato, se pone de manifiesto la existencia de anticuerpos unidos a moléculas HLA por medio de una inmunoglobulina anti-IgG conjugada con una enzima (peroxidasas o fosfatasa alcalina)(33-35).

Actualmente esta técnica está en desuso en nuestro entorno y ha sido sustituida por otros métodos de detección de anticuerpos con mayor sensibilidad y menos laboriosos como son las técnicas de citometría de flujo y los ensayos en plataforma Luminex®.

#### b.2) FlowPRA®

FlowPRA® es una técnica de citometría de flujo que utiliza para la detección de anticuerpos anti-HLA dos grupos de 30 microesferas o beads revestidas con diferentes antígenos de HLA de clase I o de clase II purificados (36).

#### b.3) Ensayos en plataforma Luminex®

Las técnicas en fase sólida que utilizan un fluoroanalizador se conocen como ensayos en plataforma Luminex® y se basan en el mismo principio técnico que la CF. En este caso, se utilizan moléculas HLA solubilizadas unidas a microesferas de poliestireno. Cada una de estas microesferas está marcada con una combinación única de fluorocromos, que posteriormente será leída en el fluoroanalizador o Luminex®. Para ello, el Luminex® consta de dos tipos de láser, uno para identificar la molécula HLA adherida a la microesfera y otro, que de forma simultánea determina la presencia o ausencia de anticuerpos unidos. Es una técnica semicuantitativa que relaciona la cantidad de anticuerpo con la intensidad de fluorescencia emitida, así los resultados se informan con un valor numérico conocido como intensidad mediana de fluorescencia (MFI: *median fluorescence intensity*) (37-39).

Para la determinación de los anticuerpos anti-HLA por Luminex®, en nuestro entorno, se emplean dos tipos de ensayos:

- Estudios de cribaje: a cada microesfera se encuentran adheridas varias moléculas HLA. Dependiendo de la compañía comercializadora, se utilizan 4-5 microesferas con antígenos HLA clase I y 5-6 con antígenos HLA clase II.
- Estudios de antígeno aislado [single antigen (SA)]: cada microesfera lleva adherido un solo antígeno HLA obtenido por técnicas de ADN

recombinante. Actualmente, con técnicas de SAB es posible detectar más de 90 antígenos de clase I y más de 90 de clase II.

El análisis detallado, mediante técnica de SAB, de todos los anticuerpos presentes en el suero de un potencial permite:

- a) Obtener el PRA calculado (PRAc) con mayor precisión, que computa el porcentaje de donantes con los que potencialmente un receptor tendrá una prueba cruzada positiva y por tanto proporciona información sobre las posibilidades de acceso al trasplante de ese potencial receptor (40, 41).

Existen varias calculadoras online que permiten obtener el PRAc en relación con la población de donantes del área geográfica

- Calculadora *Eurotransplant*:

<https://www.etr1.org/Virtual%20PRA/Default.aspx>

- Calculadora *Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN)*:

<https://optn.transplant.hrsa.gov/resources/allocation-calculators/cpra-calculator/>

- Calculadora *Canadian Transplant Registry (CTR)*:

<http://www.pra-calculator.ca/>

- b) Realizar prueba cruzada virtual (XMV), que predice si el suero del receptor va a reaccionar contra las células de un determinado donante, una vez conocido el tipaje del donante. Se conoce como XMV positiva si alguno de los antígenos prohibidos del receptor está presente en el donante.(42)

En estos conceptos se basan muchos de los programas de intercambio de órganos nacionales o Internacionales para establecer criterios de inclusión de los pacientes en lista de espera en estos programas y seleccionar los posibles receptores que tendrán una prueba cruzada negativa ante un potencial donante, sin necesidad que en un primer momento viajen linfocitos del donante (42).

Más adelante se analizará el impacto de estas técnicas en el rechazo mediado por anticuerpos y en la supervivencia del injerto.

#### Comparación entre técnicas de detección de anticuerpos

La ventaja del ensayo de CDC es que se trata de una prueba funcional que identifica anticuerpos frente al donante, capaces de producir reconocimiento antigénico y muerte celular. Descartar el

trasplante ante una prueba cruzada positiva pretrasplante, ha demostrado ser a lo largo de los años el mejor método para evitar el rechazo hiperagudo debido a la presencia de anticuerpos anti-HLA donante-específicos (DSA) en el receptor (28, 43). Sin embargo, como técnica para la detección de anticuerpos anti-HLA tiene diversos inconvenientes: menos sensibilidad que otras técnicas de detección de anticuerpos, los resultados pueden verse afectados por la viabilidad de las células utilizadas, y por otro lado, detecta autoanticuerpos y otros anticuerpos no HLA contra antígenos de la superficie celular con escaso significado en trasplante renal.

Antes del desarrollo de los ensayos en fase sólida, la utilización de técnicas de citometría de flujo introdujo una mejora en la sensibilidad para la detección de anticuerpos anti-HLA dirigidos frente al donante. Sin embargo, su uso para realizar prueba cruzada es limitado debido a que es una técnica laboriosa que requiere necesidad de personal especializado si la comparamos con la técnica de CDC. Esto ha hecho que no la haya reemplazado en muchos laboratorios de histocompatibilidad para el estudio urgente en caso de receptor de donante fallecido, y se limite al estudio en receptores de donante vivo (44). La cuestión de si la citometría de flujo es tan sensible como los ensayos en fase sólida fue objeto de debate durante algún tiempo, pero el consenso general es que el ensayo basado en SAB es el más sensible para detectar anticuerpos HLA, a pesar de sus limitaciones (45).

En los últimos años, los ensayos en plataforma Luminex<sup>®</sup> se han convertido en el “*gold standard*” y se han incorporado a la rutina de los laboratorios de histocompatibilidad. La sensibilidad adicional que proporciona esta técnica ha permitido detectar anticuerpos anti-HLA que pasaban desapercibidos con otras técnicas. Proporciona información sobre antígenos “prohibidos” en pacientes muy sensibilizados o retransplantados, o especialmente anticuerpos para las especificidades frente a DP difíciles de detectar con otros métodos (46). La identificación de anticuerpos frente a DQA1\*, DQB1\*, DRB3\*, DRB4\*, DRB5\* y DPB1\* demuestra que los anticuerpos contra DQ y DP, además de frente a DR, coexisten en receptores de trasplante de órganos y están implicados en la supervivencia del injerto y en el rechazo mediado por anticuerpos(47).

**Tabla 2 Comparación de las características de las diferentes técnicas de detección de anticuerpos anti-HLA**

	<b>CDC</b>	<b>ELISA</b>	<b>Citometría de flujo</b>	<b>Luminex®</b>
Capacidad de diferenciar anticuerpos anti-HLA clase I y II	Laborioso	Sencillo	Sencillo	Sencillo
Utilización para prueba cruzada	Sí	No	Sí	Posible (requiere extracción de moléculas HLA del donante)
Determinación de anticuerpos fijadores de complemento	Sí	No	Posible	Posible
Falsos positivos por antígenos desnaturalizados	No	Sí	Sí (por utilizar moléculas HLA)	Sí
Falsos positivos por autoanticuerpos	Sí	No	Sí (por utilizar células)	No
Equipamiento	Barato	Medio	Caro	Caro
Sensibilidad	Baja	Media	Alta	Alta

### 1.2.3. Anticuerpos anti-HLA preformados

#### a) Definición y frecuencia

Históricamente, la presencia de una prueba cruzada positiva por CDC ha contraindicado la realización de un trasplante renal por el riesgo elevado de rechazo agudo precoz que pone de manifiesto la presencia de anticuerpos pretrasplante dirigidos frente al donante, responsables de esta respuesta inmunológica (28). Este impacto negativo se ha descrito también en pacientes con prueba cruzada positiva por CDC para células B, incluso cuando la prueba cruzada por CDC para células T es negativa. (48). El avance en las técnicas de detección de anticuerpos, especialmente la CF y los ensayos en fase sólida mediante tecnología Luminex®, ha permitido identificar y caracterizar mejor los anticuerpos detectados pretrasplante, y su potencial impacto clínico.

Se ha reportado una incidencia variable de DSA pretrasplante identificados por Luminex®, entre un 8% a un 20% en cohortes de pacientes de riesgo inmunológico bajo e intermedio que se trasplantan con prueba cruzada por CDC negativa (49-54).

En la tabla 3 se muestra la incidencia de los DSA preformados detectados mediante estudios de SAB. En todos los estudios recogidos, la prueba cruzada por CDC es negativa, y se dividen según la prueba cruzada por CF es positiva vs. negativa/no reportada.

**Tabla 3 Incidencia de DSA preformados detectados por Luminex® de acuerdo a prueba cruzada por citometría de flujo**

Autor / año	Pacientes estudiados	Pacientes con DSA	Incidencia
Prueba cruzada por citometría de flujo negativa			
Patel (55) / 2007	60	20	33.3%
Gupta (56) / 2008	121	16	13.2%
Vlad (57) / 2009	325	27	8.3%
Willicombe (58) / 2011	480	45	9.4%
Couzi (31) / 2011	57	18	31.5%
Kimbal (59) / 2011	308	48	15.6%
Marfo (60) / 2014	439	66	15.0%
<b>TOTAL</b>	<b>1.790</b>	<b>240</b>	<b>13.4%</b>
Prueba cruzada por CF no realizada/no reportada			
Gibney (61) / 2006	136	20	36.0%
Bielmann (62) / 2007	65	9	13.8%
Van den Berg-Loonen (63) / 2008	34	13	38.2%
Aubert (64) / 2009	113	11	9.7%
Mahmoud (65) / 2009	153	16	10.4%
Amico (52) / 2009	334	67	20.0%
Billen (53) / 2009	165	32	19.0%
Lefaucheur (54) / 2010	402	86	18.9%
Süsal (66) / 2011	236	53	22.4%
Caro-Oleas (51) / 2012	892	103	11.5%
Otten (67) / 2012	837	290	34.6%
Kanter (68) / 2012	222	46	20.7%
Kannabhiran (69) / 2015	543	154	28.0%
Malheiro (49) / 2015	462	40	8.6%
Salvadé (50) / 2016	280	24	8.6%
Caillard (70) / 2016	239	37	18.3%
Aubert (71) / 2017	771	103	13.3%
<b>TOTAL</b>	<b>5.884</b>	<b>1.112</b>	<b>18.9%</b>

b) Impacto en rechazo mediado por anticuerpos

Los estudios iniciales de Patel y Terasaki pusieron de manifiesto el efecto deletéreo de los DSA preformados detectados por CDC en la supervivencia del injerto por su implicación directa en el RMA agudo. Posteriormente, con la mejora en las técnicas de detección de anticuerpos hacia técnicas más sensibles, y especialmente con el desarrollo de la tecnología Luminex® se ha tratado de establecer el papel que juegan los DSA preformados en el desarrollo del RMA.

En 2012, Mohan et al. realizaron una revisión sistemática y meta-análisis de los estudios publicados hasta entonces para establecer el riesgo que los DSA preformados detectados con estudios de SAB confieren en RMA y supervivencia del injerto. Así, establecieron que el riesgo de RMA es doble en pacientes con DSA preformados comparados con los pacientes sin DSA y que tenían prueba cruzada por CF negativa. En el grupo con prueba cruzada por CF no realizada o no reportada este riesgo era prácticamente el cuádruple. Aunque su análisis tiene algunas limitaciones como la heterogeneidad en inmunosupresión y en la interpretación de los ensayos

de SAB utilizados (fundamentalmente diferencias en el umbral de MFI para considerar positivo un anticuerpo, o incluso falta de reporte de ese umbral) concluyen que la presencia de DSA preformados se asocia a un incremento en el riesgo de RMA agudo. (72).

Para la presente tesis, hemos revisado todos los trabajos publicados hasta la fecha que incluyen análisis de los DSA preformados y la incidencia de rechazo. Hemos calculado según los datos reportados en cada uno de los estudios la OR para el riesgo de rechazo en el grupo de pacientes con DSA preformados comparado con el grupo de pacientes que se trasplantan sin DSA. En la tabla 4 se recogen cada uno de los estudios con la OR correspondiente y su significación, además del tipo de rechazo utilizado como *outcome* en los citados estudios. En 18 de los 20 estudios analizados, el riesgo de rechazo está incrementado en los pacientes con DSA preformados. Y aunque no todos los estudios incluyen el mismo tipo de rechazo, parece existir una asociación entre el RMA y la existencia de DSA preformados. El impacto de las características específicas de los DSA: nivel de MFI, subclase HLA y fijación de complemento se abordará más adelante.

**Tabla 4 Riesgo de rechazo agudo en pacientes con DSA preformados**

Autor / año	OR	p	Tipo de rechazo
Gibney (61) / 2006	11.33	<0.05	Rechazo agudo demostrado por biopsia
Patel (55) / 2007	6.83	<0.05	RMA agudo
Bielmann (62) / 2007	15.1	<0.05	RMA subclínico (BR protocolo 6 meses)
Gupta (56) / 2008	0.90	NS	Rechazo agudo
Van den Berg-Loonen (63) / 2008	5.14	<0.05	Rechazo agudo
Vlad (57) / 2009	4.70	<0.05	RMA
Aubert (64) / 2009	23.7	<0.05	RMA agudo
Mahmoud (65) / 2009	6.6	<0.05	RMA
Amico (52) / 2009	5.94	<0.05	RMA clínico/subclínico
Billen (53) / 2009	1.62	<0.05	Rechazo agudo
Lefaucheur (54) / 2010	13.28	<0.05	RMA agudo
Willicombe (58) / 2011	2.62 3.77	<0.05 <0.05	Rechazo agudo RMA
Couzi (31) / 2011	6.5	<0.05	Rechazo agudo
Kimbal (59) / 2011	20.23	<0.05	RMA
Caro-Oleas (51) / 2012	1.59	<0.05	RMA
Marfo (60) / 2014	1.18 2.39	NS NS	Rechazo agudo a 1 año RMA crónico
Kannabhiran (69) / 2015	14.3	<0.05	RMA
Malheiro (49) / 2015	65.3	<0.05	RMA
Caillard (70) / 2016	3.31	0.07	RMA
Salvadé (50) / 2016	13.57	<0.05	RMA agudo

#### c) Impacto en supervivencia del injerto

Como hemos comentado en el apartado anterior, la presencia de DSA no solo se ha asociado al riesgo de rechazo, y más específicamente al riesgo de RMA, sino también a la supervivencia del injerto. Algunos grupos han tratado de evaluar el papel del RMA en la pérdida del injerto.

Como señalaba antes, El-Zoghby et al (8) en un análisis de 1317 pacientes trasplantados seguidos más de 50 meses, encontró que el 11.6% perdía el injerto (muerte censurada). La causa más frecuente en estos casos con biopsia renal (BR) por indicación fue la enfermedad glomerular (36.6%), seguida de la fibrosis intersticial/atrofia tubular (FI/AT) (30.7%), y sin embargo, solo el 11.8% de las pérdidas era secundaria a un rechazo agudo. Además, solo 4 pacientes perdieron el injerto por RMA en el primer año postrasplante, pero entre los pacientes que lo perdieron por “enfermedad glomerular” incluían la glomerulopatía crónica del trasplante, probablemente en el seno de RMA en muchas ocasiones. El grupo de Edmonton, en un análisis de biopsias por indicación establecieron que el RMA era la causa más frecuentemente encontrada (47%) en los pacientes que pierden el injerto (73). En este estudio no se reporta si los DSA determinados en el momento de la BR eran preformados o de aparición postrasplante.

Otros grupos han tratado de evaluar el impacto específico de los DSA preformados en la supervivencia del injerto. Así, en el meta-análisis anteriormente mencionado de Mohan et al (72) se establece que el riesgo relativo de pérdida de injerto es superior en el grupo de pacientes con DSA preformados que se trasplantan con prueba cruzada por CDC y CF negativas, comparado con los pacientes sin DSA en el momento del TR. De forma similar ocurre con el grupo de pacientes con prueba cruzada por CDC negativa y por CF no realizada.

Cuando analizamos detalladamente los trabajos que evalúan este impacto, incluyendo los del citado meta-análisis y otros publicados posteriormente, observamos que, salvo tres estudios iniciales (56, 64, 65) y un estudio con un corto periodo de seguimiento (1 año postrasplante) (60), los pacientes con DSA detectados antes del TR presentan una peor supervivencia del injerto comparada con aquellos que se trasplantan sin DSA, con un seguimiento medio de 5 años. En la tabla 5 se recoge la supervivencia (muerte censurada) reportada por los diferentes estudios que comparan pacientes con DSA pretrasplante y sin DSA. La supervivencia media global de los pacientes con DSA fue menor que la de los pacientes sin DSA (71.5% vs 79.2%,  $p=0.014$ ).

**Tabla 5 Supervivencia del injerto (muerte censurada) de pacientes con DSA preformados comparada con pacientes sin DSA en el momento del trasplante**

Autor / año	Supervivencia del injerto (muerte censurada)			Tiempo de seguimiento
	DSA preformado	No DSA	p	
Gibney (61) / 2006	75%	94%	0.04	6 meses
Gupta (56) / 2008	83%	94%	NS	5 años
Van den Berg-Loonen (63) / 2008	60%	78%	0.60	8 años
Aubert (64) / 2009	99%	100%	NS	1 año
Mahmoud (65) / 2009	85%	95%	0.24	5 años
Amico (52) / 2009	Sin RMA: 87% Con RMA: 68%	89%	0.95 0.002	5 años
Billen (53) / 2009	Clase I: 41% Clase II: 64%	70%	0.006 0.7	5 años
Lefaucheur (54) / 2010	71.2%	89.2%	<0.001	5 años
Higgins (74) / (2011)	43%	89%	0.03	5 años
Willicombe (58) / 2011	86.7%	94.3%	<0.001	3 años
Kimbal (59) / 2011	96%	67%	<0.001	3 años
Otten (67) / (2012)	46%	60%	0.02	10 años
Caro-Oleas (51) / 2012	72.2%	91.5%	<0,001	8 años
Marfo (60) / 2014	93%	96%	1	1 año
Kannabhiran(69)/ 2015	89%	94%	0.002	3 años
Malheiro (49) / 2015	84.8%	94.9%	0.005	5 años
Caillard (70) / 2016	70%	71%	0.13	5 años
Salvadé (50) / 2016	75.5%	95.5%	<0.013	5 años
<b>Global</b>	<b>71.5%</b>	<b>79.2%</b>	<b>0.014</b>	<b>5 años</b>

*1.2.4. Impacto de los anticuerpos anti-HLA detectados postrasplante*

a) Definición y frecuencia

Como se ha desarrollado en el apartado anterior, los avances de la tecnología Luminex® en los últimos años y su incorporación rutinaria en los Laboratorios de Histocompatibilidad facilita evaluar la presencia de DSA anti-HLA en el momento del trasplante o durante el seguimiento en lista de espera. Además permite la monitorización de anticuerpos anti-HLA durante el seguimiento postrasplante, la detección de DSA *de novo*, es decir que se desarrollan después del TR. En la fase previa a la introducción de las técnicas en fase sólida, ya se apuntaba la relevancia de los DSA postrasplante.

En los años 80, se sugería que la presencia de DSA postrasplante se relacionaba con la supervivencia de injerto. En 1987, Martin et al (75) reportaron que la presencia de DSA detectados con técnicas de CDC se asociaba con mayor pérdida de injerto. Posteriormente, Halloran et al.(76) observaron que la presencia de anticuerpos frente a antígenos HLA de clase I detectados por CDC utilizando linfocitos T en pacientes sin anticuerpos pretrasplante con esa técnica se asoció a más rechazo y peor supervivencia del injerto. Además, en la era pre-Luminex® también se observó la asociación de la presencia de DSA *de novo* detectados



con técnicas de CDC y CF con el rechazo agudo. En 2001, Crespo et al.(77), describieron que el 37% de los pacientes con un rechazo agudo resistente a tratamiento con corticoides tenían DSA postrasplante circulantes frente a antígenos HLA de clase I y/o II del donante.

El desarrollo posterior de las técnicas basadas en SAB ha permitido una mejor caracterización de los DSA detectados postrasplante. Para que los anticuerpos anti-HLA puedan considerarse *de novo* es importante un adecuado estudio pretrasplante que demuestre la ausencia de DSA. El uso de técnicas de SAB ha permitido poner de manifiesto anticuerpos que probablemente pasaban desapercibidos con otras técnicas de detección menos sensibles y con diferente especificidad.

Diferentes estudios han tratado de describir la historia natural de aparición de los DSA *de novo*, definiendo el momento más frecuente de detección con una monitorización sistemática, así como la prevalencia. Se ha descrito una amplia variabilidad en el momento de aparición de los DSA *de novo*, que va desde antes de los 6 primeros meses (78-81) hasta más allá de los 2 años postrasplante (82-84).En la Tabla 6 se resumen los diferentes trabajos que han evaluado el momento de aparición y la prevalencia de los DSA *de novo*.

**Tabla 6 Estudios de incidencia y prevalencia de DSA de novo**

Autor	Número pacientes	Método	Definición DSA	Aparición	Prevalencia
Lachmann (85) / 2009	1.014	SAB	MFI>500	NA	30% (estudio transversal)
Gill (78) / 2011	84	Flow PRA SAB	No especificada	4,7 m	10% a 44 meses
Fotheringham (82) / 2011	475	ELISA/ FlowPRA/ SAB	No especificada	68 meses	38% a 39 meses
Cooper (79) / 2011	244	SAB	MFI>500	90% los 6 meses	27% a 19 meses
Wiebe (83) / 2012	315	SAB	MFI>300	51 meses	2% a 1 año (ninguno antes de 6 meses) 4% a 2 años 13% a 5 años 28% a 10 años
Ginevri (84) / 2012	82	SAB	MFI>1000	24 m	23% a 4.3 años
Willicombe (86) / 2012	505	SAB	MFI>300	10 m	18% a 30 meses
DeVos (81) / 2012	347	SAB	MFI>2000	6,1 m	18% a 26 m
Everly (87) / 2013	189	SAB	MFI>1000	17 m	11.2% a 1 año 14% a 2 años 22% a 5 años 25% a 10 años
De Kort (80) / 2013	559	SAB	MFI>300- 500	3,8 m	12.4% a 34meses

Probablemente esta variabilidad en la incidencia se deba a diversos factores:

- Relacionados con el receptor: riesgo inmunológico, frecuencia de monitorización.
- Relacionados con la inmunosupresión: tipo de inmunosupresión utilizada (inducción y mantenimiento).
- Relacionados con la técnica: punto de corte de MFI, tipo de kit comercial utilizado, tipo de valor de MFI utilizado (valor crudo o normalizado), grado de resolución del tipaje del donante.

b) Factores de riesgo de desarrollo de DSA detectados postrasplante

Además de la incidencia y prevalencia de los DSA *de novo*, diversos grupos han intentado evaluar los factores de riesgos asociados a la aparición de los DSA postrasplante. Los tres estudios más importantes diseñados para determinar factores predictores de desarrollo de DSA *de novo* utilizando plataforma Luminex® que incluyen análisis multivariante se

realizaron en EEUU(87), Canadá (83) y Alemania (82). En dos de ellos se observa que un factor independiente predictor es la incompatibilidad HLA, fundamentalmente en clase II. La edad menor del receptor también apareció como factor de riesgo en el estudio americano de Everly et al (87) y alemán de Liefeldt et al (88). La falta de adherencia al tratamiento fue el factor de riesgo más potente identificado en la cohorte canadiense de Wiebe et al (83); aunque en la cohorte de Everly (87) no resultó significativo y en la de Liefeldt (88) no fue evaluado.

Los estudios que tratan de analizar la aparición de DSA *de novo* presentan amplia variabilidad en cuanto al régimen de tratamiento inmunosupresor utilizado, tanto en inducción como en terapia de mantenimiento. Por tanto, hasta la fecha, se desconoce que pauta de inmunosupresión se asocia con menor desarrollo de DSA *de novo*. Se han descrito otros factores de riesgo independientes asociados al desarrollo de DSA *de novo*. En nuestro grupo, hemos analizado la relación entre la presencia de DSA detectados postrasplante y subpoblaciones NK. En el análisis multivariante, los factores asociados de forma independiente con la presencia de DSA postrasplante fueron el retrasplante y el porcentaje de subpoblación de células NKG2A contemporáneos a la presencia de DSA (89). En la tabla 7 se resumen los factores de riesgo descritos en estudios que realizan análisis multivariante para factores de riesgo de desarrollo de DSA postrasplante.

**Tabla 7 Factores de riesgo asociados al desarrollo de DSA detectados postrasplante en estudios con modelos multivariantes ajustados a factores confusores**

<b>Factor de riesgo</b>	<b>Factores específicos</b>	<b>Análisis Multivariante</b>
Incompatibilidad HLA	Disidentidades > 0 Disidentidades en DQ Disidentidades en DR >0 Disidentidades 4-6 vs 0-3	OR 5.66 (83) HR 3.48 (87) HR 9.7 (90) HR 3.13 (88)
No adherencia		OR 8.7 (83)
Rechazo agudo demostrado por biopsia		OR 1.57 (83)
Edad	Edad joven (18-35 años)	HR 2.62 (87)
Donante fallecido		HR 2.02 (87)
Retrasplante		OR 5.37 (89)
Inmunosupresión	Azatioprina > MMF Everolimus > Ciclosporina Inducción con Timoglobulina	HR 2.997 (90) HR 3.13 (88) HR 2.1 (91)
Infección/otros eventos proinflamatorios		HR 2.54 (92)
% células CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NKG2A <sup>+</sup>		OR 1.036 (89)

c) Impacto en supervivencia del injerto

Aunque diversos estudios muestran asociación entre el desarrollo de DSA *de novo* y una peor supervivencia del injerto, el impacto de los DSA postrasplante en la supervivencia sigue siendo un tema controvertido.

El primer estudio que trató de evaluar el tiempo medio desde el desarrollo de DSA *de novo* hasta la pérdida de injerto utilizando técnicas de ELISA y citometría de flujo fue el de Worthington et al (93). Este grupo encontró que los pacientes que desarrollan DSA *de novo* pierden el injerto a los 32.8 meses, siendo la mediana de tiempo de pérdida de 21.1 meses para los pacientes con DSA clase I y 50.1 meses para los de clase II. Posteriormente, tres estudios que utilizaron ensayos en fase sólida establecieron la pérdida entre el 20-29% (82, 83, 87) a los 3 años de la detección de los DSA *de novo*. Cuando se compara la supervivencia del injerto (muerte censurada) de los pacientes que desarrollan DSA postrasplante, estos presentan una peor supervivencia que los pacientes sin DSA durante el seguimiento postrasplante. Como se recoge en la tabla 8, la supervivencia del injerto de los pacientes con DSA oscila entre el 70-90% con una mediana de seguimiento de 3 años, mientras que esta es del 95-97% en los pacientes sin DSA.

**Tabla 8 Supervivencia del injerto en los pacientes que desarrollan DSA postrasplante comparada con los pacientes sin DSA**

Autor	n	DSA definición	Mediana de tiempo Seguimiento	Supervivencia del injerto (muerte censurada)		p
				Grupo DSAdn	Grupo sin DSA	
Lachmann (85) / 2009	1014	MFI>500	5,5 años	63%	83%	<0,001
Fotheringham (82) / 2011	475		3 años	69,5%	91,9%	0,035
Cooper (79) / 2011	244	MFI>500	2 años	83,1%	97,8%	0,001
Wiebe (83) / 2012	315	MFI>300	10 años	59%	96%	0,0001
Willicombe (86) / 2012	505	MFI>300	3,3 años	76%	95,2%	0,012
DeVos(81) / 2012	347	MFI>2000	3 años	52%	92%	0,0004
De Kort (80) / 2013	559	MFI>300-500	2,6 años	89%	97%	<0,05
Everly (87) / 2013	189	MFI>1000	5 años	80%	97%	<0,01
Benasik (94) / 2013	78	MFI>1000	5 años	59%	93%	<0,05
DeVos (95) / 2014	608	MFI>2000	2,6 años	89%	97,5%	0,002
Heilman (96) / 2014	245	MFI>999	2,5 años	97,7%	96,8%	0,81

Un estudio publicado recientemente, que compara pacientes con DSA preformados y RMA con pacientes con DSA *de novo* y RMA, muestra que los pacientes con DSA *de novo* presentan una peor supervivencia del injerto comparada con aquellos que tenían DSA

preformados a los 4 años de seguimiento (53.4% vs 78.2%,  $p < 0.001$ ). En el análisis multivariante, los pacientes con DSA *de novo* tienen 1.8 veces más riesgo de pérdida de injerto que los pacientes con DSA detectados pretrasplante (71).

#### 1.2.5. Impacto clínico de otras características de los DSA detectados postrasplante

La detección de anticuerpos anti-HLA dirigidos frente al donante pre y postrasplante se utiliza en la práctica clínica para evaluar los riesgos de rechazo y pérdida de injerto. Sin embargo, no todos los DSA confieren el mismo riesgo (15). Por tanto, la presencia de DSA se asocia a un amplio espectro de efectos, que va desde la ausencia de lesiones (que algunos autores denominan “DSA indolentes”) hasta DSA productores de un RMA agudo severo que lleva a la pérdida precoz del injerto renal (97). La presencia o ausencia de DSA no es suficiente para una correcta estratificación del riesgo inmunológico. Es necesaria una mejor caracterización de los DSA con el fin de determinar su valor predictivo y estratificar adecuadamente el riesgo. De este modo, sería posible establecer estrategias de tratamiento individualizado que pudieran permitir mejorar los resultados.

- Importancia de la MFI

La potencia o intensidad de los DSA se evalúa por el valor de la MFI si utilizamos técnicas de SAB o por el cambio de canal si utilizamos técnicas de citometría de flujo. Aunque aún la *Food and Drug Administration* (FDA) no ha aceptado este biomarcador como medida cuantitativa (98), hay estudios que muestran correlación entre la intensidad de MFI y el RMA tanto de los DSA preformados (54) como de los detectados *de novo* después del trasplante (99). También se ha correlacionado la intensidad de los DSA con mayor inflamación microvascular y depósito de C4d en capilares peritubulares (CPT) de las biopsias del injerto renal (100-102). Por tanto, parece existir una relación biológica entre la intensidad o “fuerza” del anticuerpo y el grado de la lesión histológica. Aunque se ha establecido esta correlación entre el nivel de MFI y su impacto en RMA y/o pérdida de injerto, no hay consenso sobre el cut-off de MFI que debe considerarse patológico.

A pesar de los intentos por normalizar y estandarizar las técnicas de SAB, no hay un consenso sobre el cut-off de MFI, ni siquiera si el MFI puede ser un marcador subrogado del nivel de anticuerpos (11). Probablemente esto es debido a que existen múltiples factores que pueden afectar a los niveles de MFI en los ensayos de SAB (13):

- 1) La densidad de antígeno de cada microesfera
- 2) Unión inespecífica de otros anticuerpos no HLA a las microesferas
- 3) Interferencias que impiden la unión del anticuerpo de interés

- 4) Existencia de epítomos que pueden ser compartidos por varias beads
- 5) Lectura de diferente número de microesferas que comparten el mismo antígeno
- 6) Variabilidad entre lotes
- 7) cambios conformacionales de los antígenos en cada una de las beads
- 8) modificaciones específicas de cada laboratorio.

Recientemente Tambur et al. demostraron la importancia de la titulación de los anticuerpos, y probablemente esta titulación sea mejor medida de la cantidad de anticuerpos en comparación con los niveles de MFI o la capacidad de fijación de complemento (103). Pero aún no se ha demostrado su correlación y capacidad de predicción de eventos clínicos.

- Impacto según la diana antigénica: HLA de clase I y clase II

Los DSA frente a antígenos HLA de clase I postrasplante aparecen con frecuencia antes que los antígenos de clase II en el seguimiento., y parece que estos últimos se asocian a fracaso más tardío del injerto(93, 104). Así, los DSA de clase II después del trasplante se han descrito como predictores de riesgo de glomerulopatía crónica del trasplante (GCT) y pérdida de injerto (81, 86, 95). Este impacto ha sido especialmente descrito para los antígenos DQB1\*. Varios factores se han postulado para explicar este fenómeno, como el ligamiento por desequilibrio con DR (105), mayor potencial de variabilidad peptídica y la posibilidad del donante de incluir la propia cadena DQB del paciente emparejada con una cadena DQA no propia, formando así una diana DQ diferente (106).

Ozawa et al. encontraron en una serie de 266 pacientes trasplantados renales una alta prevalencia de desarrollo de anticuerpos frente a DQ *de novo*, 33% dirigidos frente a antígenos DQ del donante y 20% no donante específicos (107). Posteriormente, Willicombe et al. mostraron la asociación entre la presencia de DSA anti-DQ *de novo* y una peor supervivencia del injerto (76.0% vs 95.2%,  $p=0.012$ )(86). En nuestra experiencia con la monitorización de anticuerpos HLA postrasplante en plataforma Luminex<sup>®</sup> de 393 receptores de trasplante renal, 38 (9.6%) presentaban DSA y, de estos, el 89.5% eran solo de clase II. Cuando analizamos los factores de riesgo de DSA postrasplante en el análisis multivariante comparando pacientes con DSA (n=38) con pacientes con HLA no DSA (n=55), uno de los factores más potentes predictores de riesgo de desarrollo de DSA fue la incompatibilidad DR [OR 5.9 (Intervalo de Confianza (IC) 95% 2.14-16.60),  $p= 0.001$ ] (89). Sin embargo, nuestro estudio no incluyó la incompatibilidad DQ dado que carecíamos de esta información en muchos casos. Un importante estudio reciente del registro

australiano demuestra que las incompatibilidades DQ se asocian de forma independiente al riesgo de rechazo global [HR 1.54 (IC 95% 1.08-2.19)] y al riesgo de rechazo tardío [2.85 (IC 95% 1.05-7.75)], independiente del número de incompatibilidades DR (108).

- Impacto de la capacidad de fijación de complemento

Desde que se describiera la propiedad de linfocitotoxicidad de los anticuerpos anti-HLA, la activación de la cascada de complemento se ha considerado un componente clave en el RMA (28). Por tanto, parece relevante la caracterización e identificación selectiva de los anticuerpos que tiene capacidad de fijar complemento y establecer su implicación pronóstica en el RMA. Los estudios en fase sólida han incorporado ensayos capaces de detectar anticuerpos anti-HLA que fijan fracciones del complemento: C3d, C4d y C1q.

Los estudios más relevantes que analizan la capacidad de fijar complemento en plataforma Luminex® de los DSA preformados y su impacto en RMA y pérdida de injerto se resumen en la tabla 9. En nuestro grupo, evaluamos el impacto de los DSA pretrasplante fijadores de C1q (n=15) comparado con los DSA sin capacidad de fijar C1q (n=13). Los pacientes con DSA C1q + tenían la misma tasa de RMA y de pérdida de injerto que los pacientes con DSA C1q-. La supervivencia del injerto al final de seguimiento fue similar entre los pacientes con DSA C1q+ y C1q-(109). A la luz de nuestros resultados y el resto de los estudios, la capacidad de fijar complemento de los DSAs preformados no parece un buen predictor de RMA y pérdida de injerto.

**Tabla 9 Estudios que evalúan el impacto de la fijación de complemento de los DSA pretrasplante**

DSA pretrasplante fijadores de complemento						
Autor/referencia	Ensayo	N pacientes	IgG DSA	DSA fijadores de complemento	Impacto en RMA	Impacto en supervivencia del injerto
Wahrmann (110) / (2009)	C4d	338	12%	6%	No	No
Hönger (111) / (2010)	C4d	64	100%	17%	No	No
Otten (67) / (2012)	C1q	837	35%	4%	No	No
Crespo (109) / (2013)	C1q	355	8%	4%	No	No
Lawrence (112) / (2013)	C4d	53	100%	19%	Sí	No evaluada

La monitorización de los DSA desarrollados postrasplante y su capacidad de fijar complemento ha sido más estudiada (Tabla 10). Loupy et al en una amplia cohorte de pacientes trasplantados renales observaron que los pacientes con DSA fijadores de C1q (n=77) detectados el primer año postrasplante tenían una peor supervivencia

que los pacientes con DSA no fijadores de C1q (n=239) [54% vs 93%, p<0.001], con un seguimiento de más de 5 años. Además, los pacientes con DSA C1q+ tenían más inflamación microvascular, depósito de C4d y GCT en las biopsias realizadas dentro del primer año postrasplante, mayoritariamente de seguimiento. En el análisis multivariante, la presencia de DSA fijadores de C1q postrasplante aumenta hasta 5 veces el riesgo de pérdida de injerto (113).

Como se ha comentado anteriormente, el nivel de MFI puede ser predictor de la patogenicidad de los DSA, pero además, el nivel de MFI se ha relacionado con la capacidad de activar complemento (103). También se ha sugerido que la capacidad de fijación de complemento de los DSA detectados postrasplante se asocia al desarrollo de RMA y pérdida de injerto independientemente del nivel de MFI (113, 114). En un reciente estudio, la capacidad de fijar C1q reclasifica el riesgo individual de pérdida de injerto en más del 62% de los pacientes cuando se compara solo con el nivel de MFI del DSA (115).

**Tabla 10 Estudios que evalúan el impacto de la fijación de complemento de los DSA postrasplante**

DSA postrasplante fijadores de complemento						
Autor/referencia	Ensayo	N	IgG DSA	DSA fijadores de complemento	Impacto en RMA	Impacto en supervivencia
Bartel (116) / (2008)	C4d	105	40%	16%	Sí: - depósito de C4d	No evaluada
Yabu (117) / (2011)	C1q	31	55%	39%	Sí: - GCT	Sí
Sutherland (118) / (2012)	C1q	35	100%	43%	Sí	Sí
Freitas (119) / (2013)	C1q	203	25%	16%	Sí	Sí
Loupy (113) / (2013)	C1q	1016	31%	8%	Sí	Sí
Sicard (120) / (2014)	C3d/C1q	69	100%	58% (C3d) 46% (C1q)	Sí (C3d) No (C1q)	Sí (C3d) No (C1q) [tendencia]
Yell (121) / (2015)	C1q	34	100%	35,3%	Sí	No evaluado
Viglietti (115) / (2016)	C1q	186	46,2%	30,7%	Sí: - RMA clínico - RMA subclínico	Sí

#### 1.2.6. Anticuerpos HLA no clásicos: HLA-DP

En la actualidad, los estudios de antígeno aislado en plataforma Luminex<sup>®</sup> permiten evaluar la presencia de anticuerpos frente a antígenos HLA A, B, C, DR, DQ y DP. Clásicamente, HLA-DP, y el HLA-C, se han considerado menos inmunogénicos que las moléculas HLA A, B, DR y DQ (122).



Los antígenos HLA-DP fueron descritos por primera vez hace 30 años (123). Como el resto del sistema HLA, se codifican en el cromosoma 6. Dos pares de genes codifican las moléculas HLA-DP, dos para la región A y dos para la región B, aunque sólo uno de estos pares de genes (DPA1 y DPB1) codifica las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de dicha molécula, que se caracterizan por un elevado polimorfismo. El otro par de genes (DPA2 y DPB2) posee un limitado polimorfismo y los antígenos que codifican no se expresan en la superficie celular. Hasta el momento, se han identificado 132 alelos localizados en el exón 2 de DPB1; mientras que para DPA1, algo menos polimórfico, se conocen 27 alelos (DPA1\*01-04) (124, 125).

La baja expresión de HLA-DP en las células de endotelio renal (126) ha hecho que clásicamente a los antígenos frente a HLA-DP se haya atribuido menor importancia o menos impacto clínico en trasplante renal. Pfeiffer y cols. utilizando la técnica de inmovilización de anticuerpos monoclonales de antígenos leucocitarios (monoclonal antibody immobilization of leukocyte antigens), encontraron que los pacientes con anticuerpos frente a HLA-DP pretrasplante tenían la misma función renal que los pacientes sin HLA-DP con un seguimiento de casi 3 años postrasplante (125).

A pesar del desarrollo de los ensayos en fase sólida que permiten detectar con mayor precisión los anticuerpos anti-HLA, los estudios publicados que han evaluado la prevalencia y el impacto de los anticuerpos antiHLA-DP son escasos.

### **1.3. Caracterización histológica del rechazo mediado por anticuerpos**

A pesar de los avances en las técnicas quirúrgicas, la inmunosupresión y el conocimiento de la inmunobiología del trasplante, la pérdida de injerto a medio y largo plazo se ha mantenido estable a lo largo de los últimos 25 años (5). En la era más reciente, uno de los principales avances en el campo del trasplante ha sido un adecuado conocimiento del RMA, su incidencia, su fisiopatología, su caracterización histológica y diagnóstica y las posibles aproximaciones terapéuticas.

En 1991 tiene lugar en Banff (Canadá) la primera reunión de un grupo de patólogos renales y nefrólogos de trasplante con el objetivo de estandarizar el lenguaje histológico para la clasificación de las lesiones encontradas en las biopsias de los injertos renales(127). Desde entonces, con reuniones bianuales, este grupo trabaja en la clasificación histológica de las biopsias del injerto renal para unificar criterios diagnósticos y conseguir hablar un lenguaje internacional común en términos de histología renal en trasplante. Las primeras aportaciones del grupo de Banff se centraban fundamentalmente en caracterizar el rechazo mediado por células T (127);sin embargo, en la última década los principales cambios se han centrado en la definición del RMA(128).

### 1.3.1. Definición del rechazo mediado por anticuerpos en trasplante renal

Clásicamente, el rechazo hiperagudo descrito en los años 60 del siglo XX se ha considerado el “prototipo” de RMA. Este tipo de rechazo ocurre inmediatamente después del trasplante, y se produce por la presencia de anticuerpos dirigidos frente al donante (HLA o ABO). La unión de estos anticuerpos al antígeno expresado en el endotelio vascular produce la activación de la vía clásica del complemento, que llevará a la activación de una cascada inflamatoria y a la formación de complejo de ataque de membrana y la lisis celular. Desde la aplicación de la compatibilidad ABO y la realización del trasplante con prueba cruzada pretrasplante por CDC negativa, esta entidad prácticamente ha desaparecido.

Poco después, en 1970, se describió un tipo de rechazo agudo vascular severo precoz en una serie limitada de pacientes que se trasplantaban con prueba cruzada CDC negativa y sin embargo positiva en el periodo postrasplante inmediato. Por lo tanto, esta experiencia apuntaba que los DSA desarrollados *de novo* postrasplante también podían producir rechazo agudo severo (129).

En los siguientes años, y probablemente debido a la generalización de la prueba cruzada pretrasplante que evitaba episodios de rechazo hiperagudo, se centró la atención en el rechazo mediado por células.

En los años 90, Halloran et al retomaron el interés por el rechazo mediado por mecanismos humorales y su relación con el desarrollo de DSA *de novo* clase I. Este grupo describió una serie de 7 pacientes con DSA clase I (4 con DSA *de novo* postrasplante y 3 con DSA preexistentes detectables con citometría de flujo pero con prueba cruzada CDC negativa y sin rechazo hiperagudo) que desarrollaba un rechazo durante la primera semana postrasplante con lesiones histológicas diferentes a las características del rechazo mediado por células T (ausencia de infiltrado mononuclear) y que llevaba a la pérdida del injerto (76). En un segundo estudio de este mismo grupo, se compararon pacientes con DSA *de novo* postrasplante precoz de clase I (n=13) y pacientes sin DSA (n=51). Los pacientes con DSA presentaron mayor incidencia de rechazo (100% vs 41%, p<0.001), caracterizado por presencia de infiltrado inflamatorio en capilar peritubular (CPT), daño endotelial de la microvasculatura y depósitos de fibrina glomerulares y/o vasculares (76, 130).

Estos estudios muestran por tanto la primera descripción estructurada del RMA, identificando dos características: la presencia de neutrófilos en CPT y la detección de DSA clase I *de novo*.

Al final de la década el grupo del Massachusetts General Hospital en Boston identificó el depósito de C4d, producto de degradación de la vía del complemento que se une de forma covalente al endotelio, en CPT podía utilizarse como marcador de interacción del anticuerpo con el endotelio y, por tanto, marcador de activación humoral (131).

Posteriormente, este grupo de Boston profundizó en la caracterización del rechazo agudo humoral. Describió por primera vez la asociación entre la presencia de DSA detectados postrasplante y el depósito de C4d en CPT como hallazgos característicos del RMA agudo. Crespo et al reportaron que el 95% de los pacientes con rechazo agudo cortico-resistente y DSA tenían depósitos de C4d en CPT en las biopsias del injerto renal, mientras que esto solo ocurría en el 6% de los pacientes con rechazo agudo sin DSA (77). En un segundo estudio, el mismo grupo describió que el rechazo agudo C4d+ era histológicamente diferente del rechazo C4d-. Este tipo de rechazo agudo C4d+ se caracterizaba por presencia de neutrófilos en CPT, glomerulitis con infiltración de neutrófilos, daño agudo tubular severo y necrosis fibrinoide glomerular o arterial. Además, en el 90% de los pacientes con rechazo humoral agudo C4d+ se detectaban DSA, frente al 2% de los que presentaban rechazo C4d- (132). Estos resultados llevaron a este grupo a proponer una definición de rechazo humoral agudo con los siguientes criterios:

- 1) *Clínicos: Disfunción renal severa precoz, típicamente cortico-resistente y con frecuencia resistente al tratamiento anti-linfocitario convencional.*
- 2) *Serológicos: aparición de anticuerpos donante-específicos en sueros contemporáneos al momento del rechazo, no detectables pre-trasplante.*
- 3) *Histológicos: Presencia de depósitos difusos de C4d en capilares peritubulares.*

Como describiremos más adelante, en 2003 se incorpora a la clasificación de Banff la categoría diagnóstica de RMA con estos criterios, diferenciada del rechazo mediado por células T (128).

En la misma época, se describe un tipo de rechazo con mecanismos humorales implicados que produce un lento y progresivo deterioro de la función del injerto causando disfunción crónica del mismo. El grupo de Boston encontró que en un 60% de las biopsias tardías por indicación con glomerulopatía crónica o arteriopatía del trasplante existían depósitos de C4d en CPT. En la mayoría de estos casos, detectaron DSA circulantes (132). Terasaki et al., en un estudio prospectivo con 2278 pacientes TR, detectaron que los pacientes con DSA más allá del primer año postrasplante presentaban con más frecuencia pérdida de injerto que aquellos en los que no se detectaban anticuerpos anti-HLA con técnicas de linfocitotoxicidad (133).

Varios grupos han evaluado las biopsias de injertos con disfunción crónica en pacientes con DSA para intentar esclarecer los hallazgos característicos del rechazo mediado por anticuerpos crónico. La presencia de depósito de C4d en CPT (134), la GCT(135) y la multilaminación de la membrana basal del capilar peritubular (136) parecen caracterizar este tipo de rechazo humoral que se desarrolla de forma crónica. Sis et al describieron una tétrada característica del rechazo crónico mediado por anticuerpos: 1) presencia de DSA, 2) depósito de C4d en CPT, 3) multilaminación de membranas basales y 4) duplicación de la membrana basal glomerular.

Como consecuencia, la clasificación de Banff incluyó progresivamente criterios diagnósticos de ambos fenotipos de rechazo mediado por anticuerpos: RMA agudo y RMA crónico.

Y en los últimos años, las principales aportaciones a la definición del RMA han sido:

- 1) *Incorporación de la inflamación microvascular ( $g+ptc \geq 2$ ) como criterio de interacción del anticuerpo con el endotelio, con el mismo significado que la presencia de depósitos de C4d en CPT.*
- 2) *Identificación de aumento en la expresión de determinados transcritos relacionados con el daño endotelial en biopsias de injerto renal.*

Estos aspectos los desarrollaremos más adelante.

### 1.3.2. Clasificación de Banff de las biopsias de trasplante renal y su evolución

En la primera reunión del grupo de Banff se establece la necesidad de una clasificación histológica en trasplante renal de acuerdo a las observaciones realizadas por Solez et al en biopsias de protocolo (137, 138). Dos años más tarde, se publica la primera clasificación propuesta en la que se describen 6 categorías (127):

- 1) *Normal*
- 2) *Rechazo hiperagudo*
- 3) *Cambios borderline*
- 4) *Rechazo agudo (grados de I al III)*
- 5) *Nefropatía crónica del injerto ("rechazo crónico") (grados de I al III)*
- 6) *Otros.*

En 2003, el grupo de Banff publica la actualización de la clasificación de 1997 y diferencia por primera vez en categorías distintas el rechazo mediado por células T del RMA y se re-definen las 6 categorías en las siguientes (128):

*Categoría 1: normal*

*Categoría 2: rechazo mediado por anticuerpos.*

*En presencia de un DSA ("sospechoso de" si no se demuestra el anticuerpo).*

*Grado I: necrosis tubular aguda –like con C4d+ y mínima inflamación*

*Grado II: marginación capilar y/o trombosis con C4d+*

*Grado III: lesiones arteriales (v3) C4d+*

*Categoría 3: Cambios borderline*

*Categoría 4: Rechazo celular agudo/activo*

*Categoría 5: Nefropatía crónica del injerto*

*Categoría 6: Otros*

Es en esta actualización se incorpora la presencia de depósito de C4d en CPT como criterio histológico de RMA. Más adelante se detallarán la definición y características específicas de este marcador.

Posteriormente, en la reunión de 2005 se describen los criterios definitorios de RMA agudo y crónico. Así, el RMA agudo queda definido según los grados de la clasificación previa y se añade el concepto de RMA crónico con la presencia de dobles contornos glomerulares y/o multilaminación de la membrana basal de CPT y/o FI/AT y/o engrosamiento fibroso, todo ello en presencia de depósito de C4d (139).

En la reunión de 2007 (140), el cambio más relevante en lo que respecta al RMA es la incorporación de la sub-categoría de “C4d sin evidencia morfológica de rechazo activo” y se define como:

- *Tinción de C4d en CPT*
- *Ausencia de evidencia histológica de rechazo agudo o crónico (humoral o celular): ausencia de glomerulitis, GCT, capilaritis peritubular, multilaminación de la membrana basal (evaluada por microscopía electrónica) y necrosis tubular aguda.*
- *Presencia de DSA*

En la 10ª reunión del grupo de Banff en 2009 (141), se produjo una importante novedad desde el punto de vista organizativo y fue la creación de seis Grupos de trabajo de Banff. En esta reunión no hubo cambios en cuanto a la clasificación; sin embargo, se sentaron las bases para la redefinición de los criterios del RMA que se produciría en la siguiente reunión de 2013. Por tanto, hasta la fecha el RMA (Categoría 2) quedaba definido de la siguiente manera:

#### Categoría 2: RMA

##### → *RMA agudo*

Presencia de DSA, C4d+ y evidencia de daño agudo tisular:

Grado I: necrosis tubular aguda –like con mínima inflamación

Grado II: Inflamación capilar y glomerular (ptc/g>0) y/o trombosis

Grado III: lesiones arteriales (v3)

##### → *RMA crónico activo*

Presencia de DSA, C4d+ y evidencia morfológica de daño crónico, como:

- Presencia de dobles contornos glomerulares
- Multilaminación de la membrana basal de CPT
- FI/AT
- Engrosamiento intimal fibroso en arterias

##### → *Depósito de C4d sin evidencia morfológica de rechazo activo:*

- Tinción de C4d en capilares peritubulares
- Presencia de DSA
- Ausencia de evidencia histológica de rechazo agudo o crónico (humoral o celular): ausencia de glomerulitis, glomerulopatía del trasplante, capilaritis peritubular, multilaminación de la membrana basal (evaluada por microscopía electrónica) y necrosis tubular aguda con mínima inflamación.

La reunión de 2013 del grupo de Banff motivó importantes cambios respecto a la clasificación del RMA del 2009; el rechazo humoral fue redefinido de la siguiente manera (142):

→ RMA agudo/activo [se requiere 3/3] \*

- (a) Evidencia histológica [al menos 1]
  - Inflamación micro-vascular (g>0 y/o ptc>0)
  - Lesiones vasculares (v>0)
  - Microangiopatía trombótica aguda
  - Daño agudo tubular
- (b) Afectación endotelio vascular [al menos 1]
  - Depósito de C4d en CPT moderado (C4d2) o severo (c4d3)
  - Inflamación micro-vascular (g>0 y/o ptc>0)
- (c) Presencia de DSA

\* Se considera sospechoso de RMA si se cumplen 2 de los 3 criterios

→ RMA crónico/activo [se requiere 3/3] \*\*

- (a) Evidencia histológica [al menos 1]
  - Glomerulopatía crónica del trasplante (cgt>0)
  - Multilaminación de CPT ultraestructural (microscopía electrónica)
  - Fibrosis arterial intimal de novo
  - Daño agudo tubular
- (b) Afectación endotelio vascular [al menos 1]
  - Depósito de C4d en CPT → C4d2 o C4d3 (en inmunofluorescencia evaluada en congelación) o C4d>0 (evaluada en inmunohistoquímica)
  - Inflamación microvascular (g + ptc ≥ 2)
- (c) Presencia de DSA

\*\* Se considera RMA crónico (sin actividad) si no hay datos de afectación del endotelio (ausencia de inflamación microvascular y C4d negativo). En este caso, los DSA se considerarán si están presentes en el momento de la BR o en algún momento postrasplante.

En la siguiente tabla se resumen las novedades introducidas en la categoría 2 de la clasificación de Banff 2013 con respecto a la previa de 2009

**Tabla 11 Comparación de las características histológicas del rechazo mediado por anticuerpos comparando la clasificación de Banff 2013 vs 2009**

Criterio histológico	Banff 2009	Banff 2013
Glomerulitis (g)	Infiltrado de células mononucleares en el glomérulo con expansión endotelial	Presencia de oclusión parcial o total de una o más luces de los capilares glomerulares secundario a la hipertrofia endotelial e infiltración por leucocitos
Definición de inflamación microvascular (IMV)	No se considerada	g + ptc ≥ 2
Depósito de C4d en capilar peritubular	C4d difuso (C4d3)	C4d focal (C4d2) o difuso (C4d3)
Glomerulopatía crónica del trasplante (GCT)	Dobles contornos en la membrana basal glomerular en uno o más paredes de los capilares peritubulares detectado con tinción de PAS o meteramina plata en ausencia de depósitos inmunes	Se consideran dos subcategorías de gct1: a) cgt1a: dobles contornos detectados mediante microscopía electrónica b) cgt1b: misma definición que cgt1 de Banff'09
DSA	En el momento de la BR	Si RMA crónico, también en cualquier momento postrasplante
FI/AT	Criterio de RMA en presencia de DSA y C4d3	No se considera como hallazgo histológico de RMA
Endarteritis	Considerado como criterio de rechazo mediado por células T	Si DSA y afectación del endotelio, se considera RMA vascular

En 2015 se añaden dos consideraciones en la categoría 2 con respecto a la clasificación de 2013 (143):

- 1) *Inclusión como criterio de evidencia de la interacción del anticuerpo con el endotelio el aumento de la expresión de transcritos genéticos en el tejido de la biopsia indicativo de lesión endotelial.*
- 2) *En la evidencia serológica de DSA: considerar si hay lesiones altamente sospechosas de RMA que cumplan los criterios 1 y 2.*

Muy recientemente se ha publicado la última revisión de esta clasificación según lo acordado en la reunión de Banff celebrada en Barcelona en 2017 (Tabla 12).

**Tabla 12 Categoría 2 o rechazo mediado por anticuerpos según la clasificación de Banff 2017 (144)**

<p><b>→ RMA activo [se requiere 3/3]</b></p> <p>(a) Evidencia histológica [al menos 1]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Inflamación micro-vascular (<math>g &gt; 0</math> y/o <math>ptc &gt; 0</math>)</i></li> <li>- <i>Lesiones vasculares (<math>v &gt; 0</math>)</i></li> <li>- <i>Microangiopatía trombótica aguda</i></li> <li>- <i>Daño agudo tubular</i></li> </ul> <p>(b) Afectación endotelio vascular [al menos 1]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Depósito de C4d en capilar peritubular moderado (C4d2) o severo (c4d3)</i></li> <li>- <i>Inflamación micro-vascular (<math>g &gt; 0</math> y/o <math>ptc &gt; 0</math>)</i></li> <li>- <u><i>Aumento de la expresión de genes o transcritos en el tejido de la biopsia asociados a RMA</i></u></li> </ul> <p>(c) Evidencia serológica de anticuerpos donante específicos (DSA HLA u otros antígenos). <u>La tinción de C4d o la expresión de transcritos genéticos asociados a RMA puede sustituir la presencia de DSA; sin embargo, se recomienda realizar la determinación de DSA, incluyendo determinación de anticuerpos no HLA si no se detectan Anticuerpos HLA, especialmente si se cumplen los criterios 1 y 2.</u></p>
<p><b>→ RMA crónico activo [se requiere 3/3]</b></p> <p>(a) Evidencia histológica [al menos 1]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Glomerulopatía del trasplante (<math>ct &gt; 0</math>; incluidos cambios detectados únicamente por microscopía electrónica (cg1a)</i></li> <li>- <i>Multilaminación de capilar peritubular ultraestructural (microscopía electrónica)</i></li> <li>- <i>Fibrosis arterial intimal de novo</i></li> </ul> <p>(b) Idéntico a criterio 2 para RMA activo</p> <p>(c) Idéntico a criterio 3 para RMA activo, incluyendo la recomendación de realizar la determinación de DSA si se cumplen los criterios 1 y 2</p>
<p><b>→ C4d sin evidencia de rechazo [se requiere 4/4]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Depósito de C4d en capilar peritubular moderado (C4d2) o severo (c4d3)</i></li> <li>- <u><i>Ausencia de criterio (a) para RMA activo o crónico/activo</i></u></li> <li>- <u><i>No evidencia molecular de RMA activo o crónico/activo</i></u></li> <li>- <i>Sin cambios mediados por células T agudos o crónicos o cambios borderline</i></li> </ul>

Las novedades de esta clasificación con respecto a la previa (subrayadas en la tabla) se han centrado en la aceptación de los transcritos genéticos asociados al RMA como criterio de interacción del anticuerpo con el endotelio pero también como criterio de evidencia serológica

de anticuerpo dirigido frente al donante; aunque se sigue recomendando que se realice la determinación de DSA anti-HLA o de anticuerpos no HLA en ausencia de estos.

### *1.3.3. Criterios diagnósticos del RMA según Banff*

Dentro del RMA se incluyen diferentes hallazgos histológicos que definen este tipo de rechazo de acuerdo a los criterios de Banff. A continuación, se detallan las características específicas de cada una de estas lesiones anatomo-patológicas que se integran dentro del rechazo humoral.

#### C4d

C4d es un subproducto inactivo derivado de la activación de la cascada del complemento, a partir de C4b, y tiene la capacidad de formar un enlace covalente con la célula diana sobre la que se sitúan los complejos antígeno-anticuerpo. Debido a que esta unión permanece estable en el sitio de activación durante más tiempo que los anticuerpos, se considera como huella tisular de lesión humoral. La inmunotinción de C4d fue desarrollada por primera vez por Feucht et al en 1991 (144) y posteriormente se estableció la asociación entre el depósito de C4d en CPT y el rechazo humoral agudo como criterio diferenciador del rechazo celular agudo, identificando un mayor riesgo de pérdida de injerto (145).

En 2003, el depósito de C4d se incorpora como criterio histológico de RMA en la clasificación de Banff (146), y es en la actualización de 2007 cuando se establece la triada clásica del rechazo humoral: presencia de DSA, tinción de C4d positiva y hallazgos histológicos de daño mediado por anticuerpos (140)

El depósito de C4d y el daño endotelial se ha asociado a RMA crónico, establecido como una causa frecuente de pérdida de injerto (8, 73, 147-151).

Un nuevo fenotipo de rechazo humoral ha emergido con la aparición de los estudios moleculares, el **RMA C4d negativo**. En la biopsia del trasplante, los niveles de RNAm de genes implicados en la activación y daño del endotelio se conocen como “transcritos asociados al endotelio” (ENDATS: ENDothelial cell Associated Transcript). Los primeros estudios realizados en este sentido corresponden al grupo de Halloran (152, 153), que observó una sobreexpresión de genes implicados en RMA en biopsias de pacientes con DSA con lesiones características de rechazo humoral con tinción de C4d negativa. En 2013, el mismo grupo publica dos importantes estudios en este sentido. En el primero de ellos, incluyen 403 biopsias realizadas por indicación de cuatro centros de trasplante renal e identifican 20 genes que se asocian más frecuentemente al RMA y construyen así el “score RMA”(154). En su experiencia, un “score RMA” mayor de 0.2 tenía una precisión diagnóstica del 85% (sensibilidad 67% y especificidad del 90%) para el diagnóstico histológico de RMA. Estaba fuertemente asociado a lesiones de



microinflamación vascular y GCT y a la detección de DSA, sin asociación con lesiones típicas de rechazo celular. En el análisis multivariante, el score RMA resultó un factor de riesgo independiente para la pérdida de injerto. El segundo, el estudio INTERCOM, con el análisis de microarrays de 300 biopsias de injertos renales demostró que el “score RMA” era mejor predictor independiente de riesgo de pérdida de injerto comparado con el diagnóstico histológico estándar del rechazo mediado por anticuerpos (155).

Por otro lado, se ha descrito el impacto del RMA C4d negativo en las biopsias de protocolo. Loupy et al. observaron que la presencia de capilaritis peritubular en ausencia de C4d en biopsias de protocolo a los 3 meses era predictor de riesgo para el posterior desarrollo de GCT (156). Debido a estos hallazgos, la clasificación de Banff en 2013 incluyó dentro de la categoría 2 el RMA C4d negativo (142).

#### Inflamación microvascular

La lesión en la microcirculación definida como inflamación microvascular con la presencia de glomerulitis (g) +/- capilaritis peritubular (ptc) como hallazgos histológicos de RMA también se ha asociado a la pérdida de injerto, incluso en biopsias C4d negativas (149).

Se ha descrito esta microinflamación como agregados de leucocitos (monocitos/macrófagos, células NK, neutrófilos, menos frecuentemente linfocitos T) en las luces capilares.

La definición por el score ptc+g fue establecida por Sis et al. (157), al encontrar una peor supervivencia del injerto en pacientes con scores más elevados. En el análisis multivariante, el único factor predictor independiente de pérdida de injerto, además del tiempo postrasplante, fue el score g+ptc; ni el C4d ni la CGT resultaron factores predictores.

#### Glomerulopatía crónica del trasplante (GCT)

La lesión histológica que caracteriza la GCT es la duplicación de la membrana basal glomerular. La prevalencia de GCT secundaria a RMA crónico oscila entre el 5.6% (158) y el 20% (159). Esta incidencia es más elevada (55%), según la experiencia de la Clínica Mayo, en pacientes de alto riesgo inmunológico que reciben tratamiento desensibilizador (160).

El mecanismo patogénico implicado en el desarrollo de esta entidad se debe probablemente a que la interacción de los anticuerpos anti-HLA con el endotelio desencadena un proceso de activación que causa un daño lítico en las células endoteliales del capilar glomerular; esto hace que se pongan en marcha los mecanismos

de reparación que van a producir una nueva capa en la membrana basal. Episodios repetidos de esta activación endotelial, con daño y reparación, darán como resultado el depósito de múltiples capas en la membrana basal. Estas nuevas capas se reconocen como un doble contorno o multilaminación de las membranas basales glomerulares que se observan con la tinción de plata metenamina en los cortes histológicos. Este mismo fenómeno ocurre en las membranas de los capilares peritubulares, pero como son muy delgadas solo se harán perceptibles con el estudio ultraestructural mediante microscopía electrónica. De hecho, la multilaminación de la membrana basal en CPT forma también parte de los criterios histológicos del RMA aceptados por Banff en 2013.

Aunque la lesión de GCT se ha descrito en diferentes patologías (microangiopatía trombótica, infección por VHC y enfermedades autoinmunes), fundamentalmente se ha asociado al daño mediado por anticuerpos en trasplante renal. Así, los DSA se han postulado como el factor más importante para el desarrollo de GCT, que producirá una disfunción tardía del injerto.

Desde el punto de vista histológico, la clasificación de Banff adjudica grados progresivos de CGT: cgt0: cuando la afectación es <10% de la luz del capilar; cgt1: entre el 10%-25%; cgt2: 25-50% y cgt3: si la afectación es >50%. Una de las aportaciones de Banff 2013 que se desarrollará más adelante fue la subclasificación de la categoría cgt1 en cgt1a (CGT detectada solo por microscopía electrónica) y cgt1b (GCT en microscopía óptica). Esto fundamentalmente se debe a los recientes avances en la descripción de la GCT en fase incipiente. Wavamunno et al. (161) reportaron las características anatomopatológicas de la CGT precoz o temprana: expansión del espacio subendotelial, vacuolización de las células endoteliales y pérdida de la fenestración de la membrana basal. Posteriormente, Haas et al (162) mostraron similares cambios ultraestructurales en biopsias precoces (< 3 meses postrasplante).

Algunos factores se han asociado con el desarrollo de GCT:

- Anticuerpos anti-HLA donante específicos, especialmente de clase II.(163)
- Pacientes sensibilizados HLA pretrasplante sometidos a protocolos de desensibilización (159)
- Presencia de un RMA.

#### Lesiones vasculares: RMA vascular

Las lesiones vasculares (v) o endarteritis, caracterizadas por la infiltración de células inmunes en el endotelio vascular clásicamente se han asociado a procesos de rechazo mediados por células T. En los años 90 se describió la presencia de endarteritis en las biopsias de trasplante como una lesión de rechazo agudo grave con mal pronóstico y

peor respuesta al tratamiento (164). Recientemente se ha descrito que las lesiones vasculares no sólo se asocian a procesos celulares, sino que también pueden estar implicados procesos humorales en su desarrollo.

Desde el punto de vista clínico, el estudio más relevante es el publicado por Lefaucheur et al (165), en el que se define por primera vez el RMA vascular. En este trabajo, los autores demuestran que los pacientes con RMA con lesiones vasculares tienen peor supervivencia del injerto comparada con los pacientes con RMA sin endarteritis y que pacientes con rechazo celular, independientemente de la presencia de lesiones vasculares. En el análisis multivariante, la endarteritis severa ( $v=3$ ) confiere 5 veces más riesgo de pérdida de injerto. Por tanto, se identifica un nuevo subtipo de rechazo agudo del injerto renal con características histológicas, clínicas y pronósticas propias. Este tipo de rechazo se caracteriza por la presencia de endarteritis sin infiltrado inflamatorio crónico y en presencia de DSA.

A la luz de esta evidencia, las lesiones vasculares se incluyen en la clasificación de Banff 2013 como criterio histológico de RMA (142).

#### 1.3.4. Incidencia e impacto clínico del RMA en trasplante renal

El RMA agudo y crónico se asocia con un peor pronóstico en trasplante renal. Así los pacientes con RMA agudo, que no produce la pérdida inmediata del injerto, tienen mayor riesgo de sufrir RMA crónico y pérdida de injerto.

En cuanto al tiempo de presentación, se han descrito dos fenotipos de RMA: i) RMA precoz, probablemente en relación con el aumento en el título de DSA pre-existentes antes del trasplante y ii) RMA tardío, relacionado con el desarrollo de DSA *de novo* postrasplante (17).

Los pacientes con RMA agudo (RMAa) presentan un peor pronóstico comparados con los pacientes sin rechazo o con rechazo mediado por células T. En un importante estudio publicado por Lefaucheur et al. que incluye 2079 pacientes trasplantados renales, el 15% había sufrido rechazo agudo demostrado por biopsia y tenía más de 10 años de seguimiento. En este estudio, los pacientes con RMA agudo con y sin lesiones vasculares tenían 9 y 3 veces, respectivamente, más riesgo de pérdida de injerto que los pacientes con rechazo mediado por células T (165). De forma similar, en la serie de Orandi et al. (166) con 219 pacientes que desarrollaron RMAa clínico o subclínico, este hecho aumentaba 4 veces el riesgo de pérdida de injerto con un seguimiento de 5 años postrasplante. De hecho, el riesgo de pérdida de injerto en pacientes con RMAa subclínico fue doble que en controles pareados sin RMA; mientras que el riesgo de pérdida para los pacientes que tenía RMAa clínico fue de casi 6 veces más que sus controles pareados. Este impacto ha sido descrito tanto en pacientes que desarrollan RMAa precoz como en aquellos que lo hacen de forma tardía, más allá del tercer mes postrasplante (167).

Dos estudios recientes comparan los dos fenotipos de RMA: precoz y tardío. En el primero, Haas et al describen una serie de RMA precoz con una mediana de tiempo postrasplante de 3 meses y una serie de RMA tardío, con mediana de tiempo postrasplante de 73 meses. En el precoz la biopsia fue indicada fundamentalmente por disfunción aguda (65%) y en el tardío por disfunción crónica (53%). El 70% de las biopsias con RMA precoz presentaban un RMA agudo/activo; mientras que en las tardías, el diagnóstico más frecuente fue el RMA crónico/activo (60%), seguido de RMA agudo/activo (37%) y crónico (2%). En las biopsias con RMA tardío, era más frecuente la GCT, la multilaminación en CPT y la FI/AT. No había diferencias en ambos fenotipos en el depósito de C4d, glomerulitis o capilaritis peritubular. Los pacientes con RMA tardío presentaban una peor supervivencia del injerto comparada con los que tenían un RMA precoz a los 21 meses de seguimiento (168).

De forma simultánea, Aubert et al publican un estudio similar, pero abordado desde el punto de vista de los DSA: preformados vs *de novo* (71). Para ello, seleccionan pacientes con RMA, de ellos 103 con DSA preformados y 102 con DSA *de novo*. Los pacientes con DSA preformados desarrollan el RMA de forma más precoz (2.8 meses postrasplante) que los pacientes con DSA *de novo* (23.9 meses). Los hallazgos histológicos en los pacientes con RMA y DSA *de novo* fueron más GCT, inflamación intersticial, tubulitis, inflamación intersticial, y FI/AT comparado con los pacientes con RMA y DSA preformados. Al igual que en el estudio de Haas et al, no encontraron diferencias en el depósito de C4d ni en la capilaritis peritubular. La supervivencia del injerto fue peor en los pacientes con DSA *de novo* comparada con los pacientes con DSA preformados. En el análisis multivariante los pacientes con DSA *de novo* tenían 1.82 más riesgo de pérdida de injerto que los pacientes con DSA pretrasplante y la GCT también fue un factor predictor independiente de pérdida.



## **OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

Nuevos aspectos en la caracterización serológica e histológica del rechazo mediado por anticuerpos y su impacto clínico

### **Objetivos secundarios**

1. Analizar el impacto de DSA preformados según su comportamiento postrasplante en el desarrollo de rechazo humoral y en la supervivencia del injerto en receptores de trasplante renal.
2. Estudiar el papel de anticuerpos anti-HLA poco estudiados en trasplante renal: evaluar la prevalencia de anticuerpos anti-HLA DP detectados pre y postrasplante. Y su influencia en la supervivencia del injerto renal.
3. Establecer la incidencia, pronóstico y supervivencia del injerto renal según la categoría diagnóstica histológica de acuerdo a la clasificación de Banff 2013 en biopsias por indicación en nuestro ámbito geográfico.
4. Analizar la influencia de los cambios en las categorías diagnósticas que supone la evolución de la clasificación de Banff'13 comparada con la clasificación de Banff'09, específicamente en la categoría de rechazo mediado por anticuerpos y su impacto clínico.





## **RESULTADOS**



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Impact of persistent and cleared HLA DSA on kidney transplant outcome

*Hum. Immunol.* 2018 Mar 7. pii: S0198-8859(18)30053-3.  
doi: 10.1016/j.humimm.2018.02.014. [Epub ahead of print]

##### Hipótesis de trabajo

Los DSA preformados o *de novo* aumentan el riesgo de RMA y disminuyen la supervivencia del injerto. Sin embargo, la presencia de estos anticuerpos no parece tener la misma relevancia clínica y pronóstica en todos los pacientes.

La hipótesis de nuestro trabajo es que el comportamiento de los DSA preformados tras el trasplante puede influir de forma diferente en el desarrollo de RMA y en la supervivencia del injerto. Por tanto, es importante evaluar la dinámica postrasplante de los DSA preformados y establecer los factores relevantes que pueden influir en su comportamiento postrasplante.

##### Objetivos

- 1.- Evaluar y confirmar el impacto de los DSA preformados pretrasplante en el RMA y supervivencia del injerto.
- 2.- Analizar la evolución postrasplante de los DSA preformados y su asociación con el RMA y la supervivencia del injerto.

##### Material y métodos

Realizamos un estudio retrospectivo de 370 pacientes trasplantados renales desde Agosto/2006 hasta Marzo/2014 con seguimiento hasta la pérdida del injerto (vuelta a diálisis o retrasplante, o muerte del paciente) o Septiembre de 2016.

La detección de anticuerpos anti-HLA se realizó empleando kits de LifecodesLifeScreenDeluxe (*Gen-Probe, Stanford, CT*) en plataforma Luminex<sup>®</sup>, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El kit se componía de siete bolas recubiertas con moléculas de HLA de Clase I y cinco con moléculas de HLA de Clase II. Se incubaron 3 µl de bolas con 12,5 µl de suero durante 30 minutos y se realizaron 3 lavados. Se añadieron 3 µl de conjugado (anti-Fc<sub>γ</sub> humana) y 22 µl de solución de lavado en cada pocillo, se incubaron durante 30 minutos. Las muestras fueron analizadas en plataforma Luminex<sup>®</sup> 100 (Luminex<sup>®</sup>, Austin, Tx) usando Bio-Plex Manager 6.0 como software para adquisición de datos, y el programa MATCHIT! Antibody v1.1.0.2 (GEN-PROBE) como software de análisis. Consideramos positivo cuando al menos dos de los siguientes resultados estuvieron por encima de los valores especificados: el fondo de MFI corregida calculada para cada microesfera

(BCM)>1000, la ratio de fondo corregida (BCR)>5 o AD-BCR>5. Para el análisis se consideró que la MFI bruta (raw MFI).

La identificación de aloanticuerpos de tipo IgG específicos frente a antígenos HLA se realizó con kits de Lifecodes LSA de clase I y/o Clase II (*Gen-Probe*), según las instrucciones del fabricante. El kit de LSA Clase I se componía de 93 bolas recubiertas con moléculas HLA de clase I (HLA-A, B, C), y el kit de Clase II LSA se componía de 69 bolas recubiertas con moléculas HLA de clase II (HLA-DR, DQ, DP). Los datos fueron analizados utilizando el software MatchIt! (*Gen-Probe*). Se estableció el punto de corte de valor bruto de intensidad media de fluorescencia (MFI)>1000 para considerar positividad.

La especificidad de anticuerpos HLA frente al donante se atribuyó considerando el tipaje del donante para HLA A, B, DRB y en algunos casos para C y DQB. Para aquellos donantes de los que no disponíamos de tipaje DQB y C, se asignó la especificidad mediante desequilibrio de ligamiento.

## Resultados

### 1.- Incidencia de DSA preformados

De los 370 pacientes incluidos en el estudio, el 10.5% tenían DSA en el momento del trasplante no conocidos en aquel momento. La presencia de DSA se asoció a sexo femenino, mayor número de retrasplantes, mayor pico PRA por CDC y uso de timoglobulina como inducción.

Los pacientes con DSA preformados sufrieron más RMA [HR 10.6, p=0.001] y pérdida de injerto [HR 2.5, p=0.003].

### 2.- Evolución de los DSA preformados según clase HLA

De los 39 pacientes con DSA preformados el 23.1% tenía DSA clase I, el 20.5% clase II y el 56.4% clase I y II. Los pacientes con DSA de clase I y/o clase I-II presentaron más RMA precoz que los pacientes con DSA de clase II. De hecho, todos los pacientes con clase I y/o II que sufrieron un RMA precoz perdieron el injerto por esta causa, mientras que solo un paciente con DSA clase II desarrolló un RMA precoz sin que supusiera la pérdida de injerto. Los pacientes con DSA clase II mostraron mayor MFI del anticuerpo inmunodominante así como de la suma de la MFI de todos los DSAs. No encontramos diferencias en otras características relacionadas con los anticuerpos como el número de especificidades donante específicas o la capacidad de fijación de complemento.

### 3.- Evolución postrasplante

Al año postrasplante, entre los pacientes con DSA clase I o I-II: 29.4% habían perdido el injerto por RMA, en 47.1% no se detectaban DSA y el 23% mantenía DSA clase II (sólo en un caso persistía el DSA clase I). Por otro lado, entre los pacientes con DSA clase II, los DSA persistían en el 72.7%.

En el análisis multivariante para determinar factores de riesgo de persistencia de DSA preformados al año del trasplante, solo la MFI fue un factor independiente de persistencia (OR 1.01,  $p=0.023$ ). La curva ROC determinó una MFI de 5100 como umbral de persistencia de DSA preformados postrasplante (AUC=0.803,  $p=0.002$ ). Los DSA pretrasplante con MFI>5100 tenían 5 veces más riesgo de persistir al año de trasplante comparado con los anticuerpos con MFI más bajas.

Seis (1.9%) pacientes desarrollaron DSA *de novo* al año del trasplante, el 4.3% a los 3 y el 8.8% a los 5 años postrasplante.

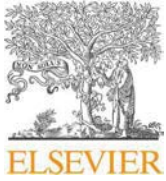
### 4.- Rechazo mediado por anticuerpos

Durante el periodo de estudio, se realizó una biopsia del injerto renal a 165 pacientes. Los pacientes con DSA preformados, tanto si persistía el anticuerpo como si no se en el seguimiento postrasplante presentaron una tasa similar de RMA. El análisis multivariante mostró que los pacientes con DSA *de novo* presentaba un mayor riesgo de rechazo, seguido de los pacientes con DSA preformados tanto si persistían como si desaparecían postrasplante comparado con los pacientes que nunca desarrollaron anticuerpos en el seguimiento pre y postrasplante.

### 5.- Pérdida de injerto

El 11.6% de los pacientes incluidos en el estudio perdieron el injerto renal durante el seguimiento. Un análisis de Cox no ajustado mostró que los pacientes con DSA *de novo* tenían más riesgo de pérdida de injerto (muerte censurada), seguidos de los pacientes con DSA pre y postrasplante y de los pacientes con DSA pretrasplante y sin DSA postrasplante. En el análisis multivariante ajustado, la presencia de DSA *de novo*, DSA preformado persistente o no detectado, no se asoció con pérdida de injerto.





Contents lists available at ScienceDirect

Human Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/humimm](http://www.elsevier.com/locate/humimm)

## Impact of persistent and cleared preformed HLA DSA on kidney transplant outcomes

Redondo-Pachón Dolores<sup>a,b</sup>, María José Pérez-Sáez<sup>a,b</sup>, Mir Marisa<sup>a,b</sup>, Gimeno Javier<sup>b,c</sup>, Llinás Laura<sup>a,b</sup>, García Carmen<sup>d</sup>, Hernández Juan José<sup>d</sup>, Yélamos Jose<sup>b,e</sup>, Pascual Julio<sup>a,b,\*</sup>, Crespo Marta<sup>a,b,\*</sup><sup>1</sup>

<sup>a</sup> Department of Nephrology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Institute Mar for Medical Research, Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Laboratori de Referència de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Department of Immunology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Donor-specific antibodies

Preformed

Kidney transplantation

Antibody-mediated rejection

### ABSTRACT

Preformed HLA donor-specific antibodies (DSA) only detected with Lumindex have been associated with increased risk of antibody-mediated rejection (ABMR) and graft failure after kidney transplantation (KT). Their evolution after KT may modify this risk. We analyzed posttransplant evolution of preformed DSA identified retrospectively and their impact on outcomes of 370 KT performed 2006–2014. Antibodies were monitored prospectively at 1–3–5 years after KT and if any dysfunction. Early acute ABMR was more frequent among patients with preformed DSA class-I or I + II than isolated class-II (29.4% vs 4.5%,  $p = 0.02$ ). One year post-KT, 20 of 34 patients with functioning KT had persistent DSA. Preformed DSA class-II persisted more frequently than class-I/I + II (66.7% vs 33.3%;  $p = 0.031$ ). The only risk factor independently associated with persistence was pretransplant MFI. Patients with de novo DSA had the highest risk of ABMR (HR 22.2 [CI 6.1–81.2]). Although recipients with persisting preformed DSA had significantly increased ABMR risk (HR 14.7 [CI 6.5–33.0]), those with cleared preformed DSA also had a higher risk than those without DSA (HR 7.01 [CI 2.2–21.8]).

Preformed DSA are a very important risk factor for ABMR and graft loss. Patients who clear preformed DSA still show an increased risk of ABMR and graft loss after KT.

### 1. Introduction

The presence of HLA donor-specific antibodies (DSA) increases the risk of antibody-mediated rejection (ABMR) and graft failure in kidney transplant (KT) recipients [1,2]. This negative impact on graft-survival has been described associated with preformed pretransplant DSA [3,4] and de novo posttransplant DSA [5–7]. However, the true clinical relevance of DSA remains elusive as not all patients with antibodies show the same prognosis [3–7]. The newer monitoring techniques based on single antigen beads (SAB) are revealing HLA antibodies previously undetected in KT recipients, and there is a need to identify if there are safer pretransplant DSA to open up opportunities for transplantation [8–12]. It has been suggested that some characteristics of these antibodies may differentiate those DSA which portend worse prognosis,

such as the HLA class I vs. II specificity [8,12], the strength or mean fluorescence intensity (MFI) [9], the IgG subclass [10] or the complement binding ability of the antibodies [11,12].

There is no consensus on the best way to monitor HLA antibodies after kidney transplantation in patients with or without preformed DSA [2,13]. Furthermore, little is known on the capability of these antibodies to predict ABMR in the absence of clinical and analytical dysfunction. In particular, the evolution of preformed DSA after KT has been scarcely studied, and their relevance as promoters of late ABMR and graft loss is poorly defined.

Current clinical guidelines recommend avoiding transplantation across DSA unless desensitization is implemented, although often this approach only tempers the intensity of antibodies. In order to dissect the true impact of pretransplant DSA, we selected an era in which some

**Abbreviations:** ABMR, antibody-mediated rejection; DSA, donor-specific antibodies; dnDSA, de novo donor-specific antibodies; iDSA, immunodominant DSA; KT, kidney transplant; MFI, Mean Fluorescence Intensity; SAB, Single Antigen Beads

\* Corresponding authors at: Department of Nephrology, Hospital del Mar, Paseo Marítimo 27-29, 08003 Barcelona, Spain.

E-mail addresses: [julpascual@gmail.com](mailto:julpascual@gmail.com) (P. Julio), [m Crespo@parcdesalutmar.cat](mailto:m Crespo@parcdesalutmar.cat) (C. Marta).

<sup>1</sup> Contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.02.014>

Received 29 September 2017; Received in revised form 6 February 2018; Accepted 28 February 2018

0198-8859/© 2018 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.



KT across DSA happened with unknown preformed DSA. We analyzed the evolution of these retrospectively known preformed DSA after KT and their impact on graft outcomes in this cohort of patients monitored periodically after KT. We confirmed that preformed DSA predicted worse graft-survival, those that persisted and those that cleared after KT associated significantly with ABMR diagnosis at follow-up.

## 2. Material and methods

### 2.1. Population and design

A prospective post-transplant HLA antibody monitoring study was conducted in 370 consecutive KT recipients at our institution between August 2006 and March 2014. All were transplanted across a negative donor-specific CDC crossmatch with mixed lymphocytes (1:1 and diluted 1:4 at 4° and 22°, and DTT treated) and followed until graft loss (dialysis or death) or September 2016. A database included demographics, donor type, previous transplantations, immunosuppression, delayed or immediate graft function and acute rejection episodes.

The Hospital Research Ethical Committee approved the study and patients signed informed consents.

### 2.2. Immunosuppressive regimen

All patients received immunosuppression with basiliximab, tacrolimus, mycophenolate acid derivatives and prednisone (250 mg/day 0, 125 mg/day 1, 20 mg/day 2–13, 15 mg/day 14–27, 10 mg/day 28–41 and 5 mg thereafter). Thymoglobulin was used instead of basiliximab in patients with PRA-CDC over 50% or previous renal allograft loss due to acute rejection. Acute rejection episodes were initially treated with steroids, but in case of resistance, thymoglobulin was added. In case of early acute ABMR with clinical dysfunction, plasma-exchange and low-dose polyclonal immunoglobulin or high polyclonal immunoglobulin were employed, if no improvement in renal function (decrease > 25% of creatinine) or histology (decrease of microinflammation and/or C4d deposition) was obtained after 10 days, Rituximab® was administered and plasma-exchange further extended. Late ABMR (> 1 year after transplantation) was not specifically treated.

### 2.3. HLA antibody detection

Luminex antibody testing was performed retrospectively on pre-transplant serum pretreated with EDTA obtained immediately before KT for crossmatch and prospectively on posttransplant samples obtained at dysfunction or biopsy, 1, 3 and 5 years after transplantation as previously described [12,14]. Screening for anti-HLA antibodies was performed using the Luminex Lifecodes LifeScreen Deluxe assay (Immucor Lifecodes Transplant Diagnostics, Nijlen, Belgium). Anti-HLA alloantibody IgG identification was performed using the Lifecodes LSA Class I and/or Class II assays, according to the manufacturer instructions [6]. With MatchIT software, the bead was considered positive when at least two of the results were above the specified values: Background Corrected MFI calculated for each bead or BCM > 1000, Background Corrected Ratio or BCR > 5 and Antigen Density Background Corrected Ratio or AD-BCR > 5 for pre and posttransplant samples. For analysis purposes raw MFI were considered. Donor HLA antibody specificity was ascribed considering donor HLA A, B, DRB1 and some C and DQB typing. When typing was unknown, antibodies against C or most DQ antigens were assigned considering linkage disequilibrium for Caucasian donors.

For posttransplant assessment in patients with preformed DSA, we carefully reviewed that epitope reactivity. Positivity for persistence or clearing of DSA was based on the same criteria.

Serum samples with preformed DSA were analyzed for the presence of C3d-binding anti-HLA antibodies according to the manufacturer's protocol (Immucor Lifecodes Transplant Diagnostics, Nijlen, Belgium)

[6].

### 2.4. Renal pathology

One-hundred and sixty-five patients underwent biopsies during the study for clinical dysfunction or DSA detection. They were evaluated as previously described [15]. Conventional hematoxylin-eosin staining, PAS, silver-methenamine, and Masson's trichrome staining were done, as well as fluorescence microscopy examination and C4d immunohistochemical staining. From each biopsy, two 1 × 1 mm fragments were analyzed using a transmission electron microscope. All biopsies were evaluated according to Banff 2015 classification [13]. We labeled as ABMR all cases which met criteria for any type of category 2 diagnosis of antibody-mediated changes, either suspicious for ABMR or full ABMR. Patients with cleared preformed HLA DSA at the time of biopsy could only be diagnosed as suspicious for ABMR.

### 2.5. Statistical analysis

We used Chi<sup>2</sup> or Fisher's exact tests to analyze categorical data and Student's *t*-test or non-parametrical Mann-Whitney *U* test for continuous variables. Survival was assessed using the Kaplan-Meier method and log-rank tests. Data are expressed as means ± standard deviation or medians with interquartile range (IQR) as appropriate. Logistic regression was performed to evaluate risk of factors of persistence of preformed DSA. Receiver operating characteristic (ROC) curve and area under the curve (AUC) were calculated for DSA MFI values. The Cox proportional hazards model was used to evaluate the effect of preformed DSA (cleared and persistent) and dnDSA on graft survival and ABMR, adjusted for confounders.

Statistical analyses were performed using SPSS v.20.

## 3. Results

### 3.1. Preformed DSA: characteristics and outcomes

Among 370 patients included, 39 (10.5%) had preformed DSA at transplantation. They were more frequently female, retransplants, had higher peak and pretransplant CDC-PRA and received Thymoglobulin® induction (35.9% vs 10.6%, *p* = 0.001) than those without preformed antibodies (Table 1).

Patients with preformed DSA showed a significantly higher risk of ABMR (HR 10.6 [95% CI 5.5–20.4]; *p* < 0.001) and lower ABMR-free graft-survival (41% vs 92%, *p* < 0.001) than patients without DSA at a median follow-up of 4.6 years (IQR 3.1–6.5). In addition, they had a significantly lower death-censored graft survival (64% vs 81%, *p* = 0.002) and higher graft loss risk (HR 2.5 [1.3–4.7]; *p* = 0.003) than patients without antibodies.

### 3.2. Preformed DSA according to class

Among the 39 patients with preformed DSA, nine (23.1%) had only HLA class I antibodies, eight (20.5%) had class I and II and twenty-two (56.4%) only class II antibodies. There were no differences in baseline characteristics between patients with DSA I or mixed I-II and those with only DSA II. The strength of DSA was higher in patients with only class II DSA, considering the DSA with the highest MFI, immunodominant DSA (iDSA), or the sum of MFI of all DSA per patient. No differences were found in the number of DSA specificities or in the capacity for C3d-binding (Table 2). All C3d binding DSA were HLA class II but one.

The group of patients with isolated class I or mixed class I-II antibodies showed more frequently early (within three months of transplantation) acute ABMR than those with preformed class II alone (29.4% vs 4.5%, *p* = 0.02). Four patients with DSA class I and one patient with mixed class I and II-undetected by the prospective CDC XM- and acute ABMR lost their grafts, while none with DSA class II

**Table 1**  
Characteristics of patients with and without preformed HLA DSA.

	All (N = 370)	No DSA (N = 331)	Preformed DSA (N = 39)	p
Recipient age (years) [mean (SD)]	53.7 (13.5)	53.8 (13.6)	53.3 (11.9)	0.71
Female sex (n, %)	146 (39.4)	116 (35.1)	30 (76.6)	<b>0.001</b>
Retransplantation (n, %)	55 (14.8)	29 (8.8)	26 (66.6)	<b>0.001</b>
Deceased donor (n, %)	325 (87.3)	289 (87.3)	36 (92.3)	0.36
Donor age (years) [mean (SD)]	52.6 (14.2)	52.6 (14.4)	52.7 (12.5)	0.97
Previous pregnancies (n, %)	112 (76.7)	88 (75.9)	24 (80)	0.99
HLA mismatch [mean (SD)]				
Class I (A/B)	2.9 (0.9)	2.8 (0.9)	2.9 (0.9)	0.69
Class II (DR)	1.2 (0.6)	1.2 (0.6)	1.4 (0.5)	0.13
preKT PRA CDC > 5% (n, %)	24 (6.5)	11 (3.3)	13 (33.3)	<b>0.001</b>
Peak PRA CDC > 5% (n, %)	71 (19.2)	50 (15.1)	21 (53.8)	<b>0.001</b>
Antilymphocyte induction (n, %)	49 (13.2)	35 (10.6)	14 (35.9)	<b>0.001</b>
Initial immunosuppression: Tacrolimus + Mycophenolate (n, %)	370 (100)	331 (100)	39 (100)	1
Delayed graft function (n, %)	120 (32.4)	104 (31.4)	16 (41.0)	0.27
Cold ischemia time (h) [mean (SD)]	13.9 (6.1)	14.1 (6.2)	12.8 (5.0)	0.13

DSA: donor-specific antibodies. SD: standard deviation. KT: Kidney transplantation. PRA: panel reactive antibodies.  
Bold values indicate the significant value ( $p < 0.005$ ).

**Table 2**  
Characteristics of patients with preformed DSA according to HLA class.

	Preformed DSA class I and class I&II (N = 17)	Preformed DSA class II (N = 22)	p
Recipient age (years) [mean (SD)]	50.24 (12.7)	55.64 (11.04)	0.35
Female sex (n, %)	13 (76.5)	17 (77.2)	0.62
Retransplantation (n, %)	9 (53)	17 (77.2)	0.11
Deceased donor (n, %)	16 (94.1)	20 (90.1)	0.59
Donor age (years) [mean (SD)]	50.53 (10.1)	54.3 (14.1)	0.16
Cold ischemia time (h) [mean (SD)]	12 (3.8)	13 (5.8)	0.63
Previous pregnancies (n, %)	10 (76.9)	14 (82.3)	0.50
HLA mismatch [mean (SD)]			
Class I (A/B)	3 (0.7)	3 (1.1)	0.89
Class II (DR)	1.38 (1.1)	1.44 (0.5)	0.75
Antilymphocyte induction (n, %)	8 (47)	6 (27.3)	0.33
Pretransplant PRA CDC > 5% (n, %)	6 (35.3)	11 (50)	0.54
Peak PRA CDC > 5% (n, %)	12 (70.6)	9 (40.1)	0.06
Initial immunosuppression: Tacrolimus + Mycophenolate (n, %)	17 (100)	22 (100)	1
Delayed graft function (n, %)	7 (41.2)	9 (40.1)	0.70
<i>Pretransplant DSA characteristics</i>			
MFI iDSA [mean (SD)]	7125 (6669)	11,909 (13,782)	<b>0.02</b>
Sum MFI all DSA specificities [mean (SD)]	9525 (8191)	15,232 (11,460)	<b>0.04</b>
Number of DSA specificities [mean (SD)]	1.6 (0.8)	1.5 (0.6)	0.84
DSA specificities > 1 (n, %)	7 (41.2)	10 (45.4)	0.78
C3d positive DSA (n, %)	7 of 14 (50)	14 of 20 (70)	0.23
<i>Follow up</i>			
Early <sup>a</sup> acute ABMR (n, %)	5 (29.4)	1 (4.5)	<b>0.02</b>
Early <sup>a</sup> graft loss (n, %)	5 (29.4)	0	< <b>0.001</b>
Graft loss due acute ABMR (n, %)	5 (29.4)	0	< <b>0.001</b>

DSA: donor-specific antibodies. SD: standard deviation. KT: Kidney transplantation. PRA: panel reactive antibodies. MFI: Mean fluorescence intensity. ABMR: Antibody-mediated rejection. iDSA: immunodominant DSA.

Bold values indicate the significant value ( $p < 0.005$ ).

<sup>a</sup> Early was considered during the first 3 months after transplantation.

alone did (Table 2). ABMR-free survival was lower in patients with class I or mixed than in those with class II alone (65 vs 91%,  $p = 0.043$ ), with median follow-up of 4.6 years (IQR 3.1–6.5) (Fig. 1).

### 3.3. Posttransplant evolution of preformed DSA

Within one year after transplantation, 29.4% patients with preformed DSA class I or I-II had lost their grafts, 47.1% had cleared DSA and 23.1% maintained DSA (mean MFI = 8581 (SD 6822)). Of them, persistency affected almost exclusively DSA II; only one patient in this group had persistent DSA class I (without ABMR in the biopsy). In the group with isolated preformed DSA II, persistence happened in 72.7% compared with 23% in the group with preformed DSA class I or I-II ( $p = 0.026$ ) (Fig. 2).

When we evaluated only the 34 patients with a functioning graft at one year, preformed DSA were still detected in 20 of them. Patients with persistent DSA were younger and more frequently retransplants than those who cleared. We found no differences in persistent vs cleared preformed DSA regarding donor characteristics, HLA mismatches, PRA-CDC, immunosuppression, cold ischemia time or delayed graft function. Persistent preformed DSA displayed a higher MFI of the iDSA, a higher MFI sum of DSA and more frequent C3d-binding capability than cleared preformed DSA at the time of transplant (Table 3). ROC curve analysis showed an MFI cut-off point of 5100 as predictive of DSA persistence (AUC = 0.803,  $p = 0.002$ ) (Fig. 3).

A multivariate analysis evaluated factors associated with persistence of preformed DSA one year posttransplantation and identified only DSA MFI as predictor, either as a continuous variable (OR 1.01 [CI 1.001–1.010],  $p = 0.023$ ) or as a categorical variable setting the threshold in 5100 (OR 6.2 [CI 1.05–36.2],  $p = 0.004$ ).

### 3.4. De novo DSA

All patients were monitored for DSA after transplantation regularly and at dysfunction or biopsy. Among 331 patients without DSA at the time of transplantation, 6 (1.9%) had developed de novo DSA (dnDSA) one year, 13 (4.5%) 3 years and 8 (8.8%) at 5 years after transplantation. No patient with preformed DSA developed de novo DSA.

### 3.5. Antibody-mediated rejection

One-hundred and sixty-five patients (44.6%) underwent kidney graft biopsies. Antibody-mediated changes (Category-2 Banff2015) were diagnosed in 15 patients without DSA (11.2%). Patients with persistent preformed DSA, cleared preformed DSA and dnDSA showed similar ABMR rates in the biopsy (Table 4).

Multivariate analysis in search of risk factors for ABMR adjusted for recipient gender, retransplantation, HLA mismatch class II and pre-transplant PRA CDC showed that dnDSA was the most significant risk

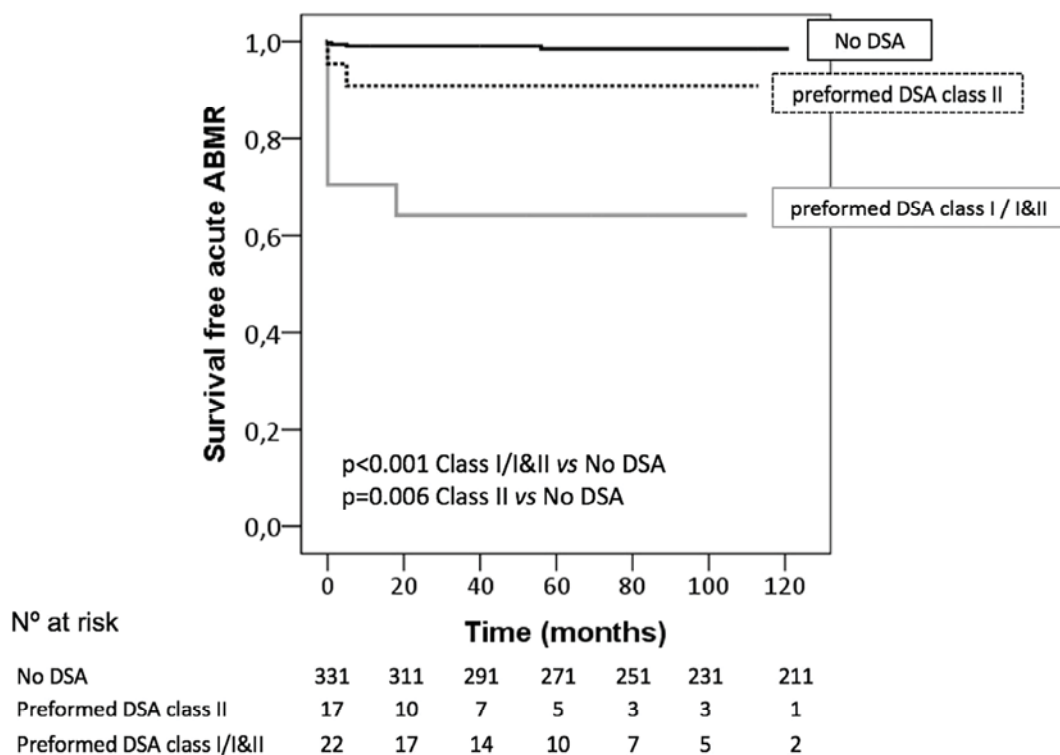


Fig. 1. Kaplan Meier curves for acute antibody rejection-free survival in patients with preformed DSA in comparison with patients without preformed DSA.

factor (HR 7.7 [IC 2.2–27.3,  $p = 0.008$ ]), followed by preformed DSA, either persistent (HR 5.3 [IC 2.5–11.0],  $p = 0.001$ ) or cleared (HR 2.8 [IC 1.6–13.0],  $p = 0.004$ ) (Fig. 4).

### 3.6. Graft loss

During follow-up, 41 patients (11.6%) lost their grafts. Graft-loss and death-censored graft-loss were higher in patients with preformed

DSA and those with dnDSA than in patients with no DSA (Table 4). Cox regression analysis showed higher risk of graft loss in patients with dnDSA (HR 5.9 [3.9–25.0];  $p = 0.016$ ), persistent preformed (HR 4.8 [2.3–10.4];  $p = 0.016$ ) or cleared preformed DSA during follow-up (HR 3.7 (1.3–10.6);  $p = 0.015$ ). But when the analyses was adjusted for donor and recipient age, recipient gender and induction treatment, dnDSA [HR 4.3 (IC 0.95–17.9);  $p = 0.05$ ], preformed persistent [HR 2.9 (IC 0.99–8.6);  $p = 0.058$ ] and preformed cleared DSA [HR 2.5 (IC

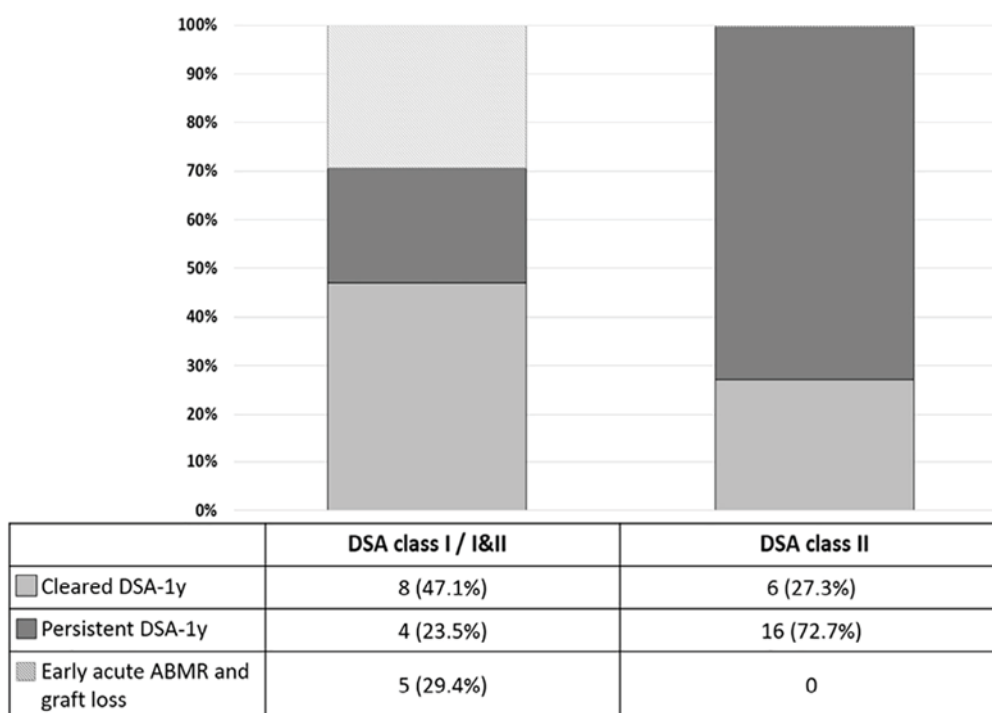
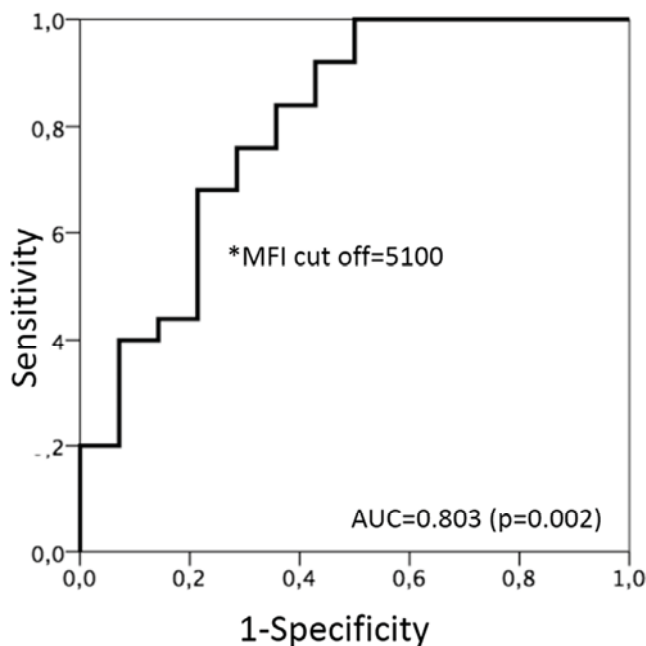


Fig. 2. Outcome at one year after transplantation: graft-loss and persistence of preformed DSA according to HLA class.

**Table 3**  
Characteristics of patients with functioning grafts at one year after KT according to the evolution of preformed DSA (Univariate analysis).

	OR	95%IC	p
Recipient age (years) (mean, SD)	1.068	1.000–1.140	0.050
Female sex (n, %)	1.200	0.257–5.593	0.816
Retransplantation (n, %)	7.556	1.494–38.208	<b>0.014</b>
Deceased donor (n, %)	0.692	0.057–8.470	0.773
Donor age (years) (mean, SD)	1.043	0.985–1.104	0.148
Cold ischemia time (h) (mean, SD)	1.106	0.947–1.293	0.204
HLA mismatch (mean, SD)			
Class I (A/B)	1.273	0.552–2.932	0.571
Class II (DR)	0.857	0.172–4.267	0.851
Pretransplant PRA CDC > 5% (n, %)	1.429	0.013–1.474	0.102
Peak PRA CDC > 5% (n, %)	1.875	0.150–23.396	0.625
Antilymphocyte induction (n, %)	2.444	0.514–11.619	0.261
Delayed graft function (n, %)	1.469	0.350–6.168	0.599
<i>Pretransplant DSA characteristics</i>			
Class I or I&II	1		
Class II	5.333	1.162–24.469	<b>0.031</b>
MFI iDSA (mean, SD)	1.000	1.010–1.100	<b>0.007</b>
Sum MFI all specificities (mean, SD)	1.001	1.000–1.010	<b>0.016</b>
C3d+ (n, %)	10.010	1.781–56.150	<b>0.009</b>

Bold values indicate the significant value ( $p < 0.005$ ).



**Fig. 3.** ROC curve: MFI cutoff for persistence of preformed immunodominant donor-specific antibodies.

0.8–7.4);  $p = 0.105$ ] did not associate with graft-loss.

#### 4. Discussion

Corresponding to an era in which SAB monitoring for HLA antibodies was not systematically performed in the waiting list, we retrospectively identified that 10.5% of our patients underwent KT with unknown preformed DSA without desensitization. This prevalence is similar to 8.5–11.5% described in other series [16–18]. These patients with preformed DSA showed 10-fold risk of ABMR than those without DSA, not different to previously described [1,19,20]. In addition, they showed worse death-censored graft survival than those without DSA at transplantation [3,4,21,22]. Interestingly and opposite to other studies [23–25], we found that preformed DSA correlated with posttransplant ABMR even if cleared after transplantation, although this latter group

**Table 4**  
Biopsy data according to the presence of DSA.

	No DSA (n = 306)	Persistent Preformed DSA (n = 25)	Cleared Preformed DSA (n = 14)	De novo DSA within 1 year (n = 6)
Early acute ABMR $g + ptc \geq 2$ $C4d = 3$ $IF/TA = 1$ $v > 1$ $cg > 0$	0	6 (24%) 5 (83.3%) 6 (100%) 1 (16.6%) 1 (16.6%) 0%	0	0
<i>Histological findings</i>				
Late biopsy (n, %)	133 (36.9%)	19 (76%)	7 (50%)	6 (100%)
<i>Banff15 category</i>				
Category 1	17 (12.8%)	1 (5.2%)	0	0
Category 2	15 (11.2%)	10 (52.6%)	4 (57.1%)	3 (50%)
$g + ptc \geq 2$	12 (80%)	8 (80%)	3 (75%)	3 (100%)
$C4d > 0$	6 (40%)*	8 (80%)	3 (75%)	3 (100%)
$IF/TA^{**}$	5 (33.3%)	4 (40%)	1 (25%)	2 (33.3%)
$cg > 0$	3 (20%)	5 (50%)	2 (50%)	1 (33.3%)
$PTCBM$	2 (13.3%)	4 (40%)	1 (25%)	0%
Category 3	9 (6.8%)	0	0	0
Category 4	16 (12%)	0	0	0
Category 5	34 (25.6%)	6 (31.7%)	1 (14.3%)	1 (16.6%)
Category 6	42 (31.6%)	2 (10.5%)	2 (28.5%)	2 (33.4%)
Time to biopsy (months) [median (IQR)]	12 (2–20)	16 (11–32.5)	13 (8.5–33.5)	10.5 (3–14)
<i>Follow up</i>				
Graft loss (n, %)	50 (16.3%)*	10 (40%)	8 (57.4%)	4 (66.6%)
Graft loss (death-censored) (n, %)	26 (8.5%)*	9 (36%)	4 (28.6%)	2 (33.3%)
Death with functioning graft (n, %)	24 (7.8%)*	1 (4%)*	4 (28.6%)	2 (33.3%)
Time of follow up (median, IQR)	58 (40–82)	59.5 (41.5–82.5)	55.5 (30–72)	24.5 (15–43)

DSA: Donor-specific antibodies. ABMR: Antibody-mediated rejection. g: glomerulitis. ptc: peritubular capillaritis. cg: transplant glomerulopathy. PTCBM: peritubular capillary basement membrane multilayering. IF/TA: interstitial fibrosis/tubular atrophy

\*\* Moderate and severe IF/TA.

\*  $p < 0.05$  No antibodies vs persistent, cleared and dnDSA.

&  $p < 0.05$  persistent DSA vs cleared and dnDSA.

exhibited and intermediate risk.

In our cohort, antibodies involved in early graft loss were HLA class-I DSA either isolated or combined with class-II. These antibodies were detected in 43.6% of our patients with preformed DSA. Almost one third developed early acute ABMR with 100% graft loss, as no desensitization protocol was implemented because they were retrospectively identified. Contrarily, only one patient with isolated HLA class-II preformed DSA developed early ABMR without graft loss.

Some groups have published their experience in assessing differences in graft survival according to the preformed DSA HLA class. In a previous study, we noticed that preformed DSA class-I was associated with 40% early graft-loss compared with 0% in cases with DSA class-II [12]. Willicombe et al. described worse rejection-free survival in patients with preformed DSA class-I or mixed class I-II than those with class-II alone or those without DSA [16]. Otten et al. described worse graft survival only in patients with mixed class I-II DSA [8]. Similar to our experience, Caro-Oleas et al. reported that patients with either class-I or mixed classes I-II had worse graft survival when compared to those with preformed class-II alone or no DSA [17]. Contrarily, Lefaucheur et al. showed similar graft survival with preformed class I-II [3]. In a different setting, Dar et al. found that among six patients who received a combined liver-kidney transplant with DSA, three with DSA I-II and one with only DSA-II suffered acute ABMR. After ABMR of the kidney, DSA-I were cleared but DSA-II were not [28]. In sensitized

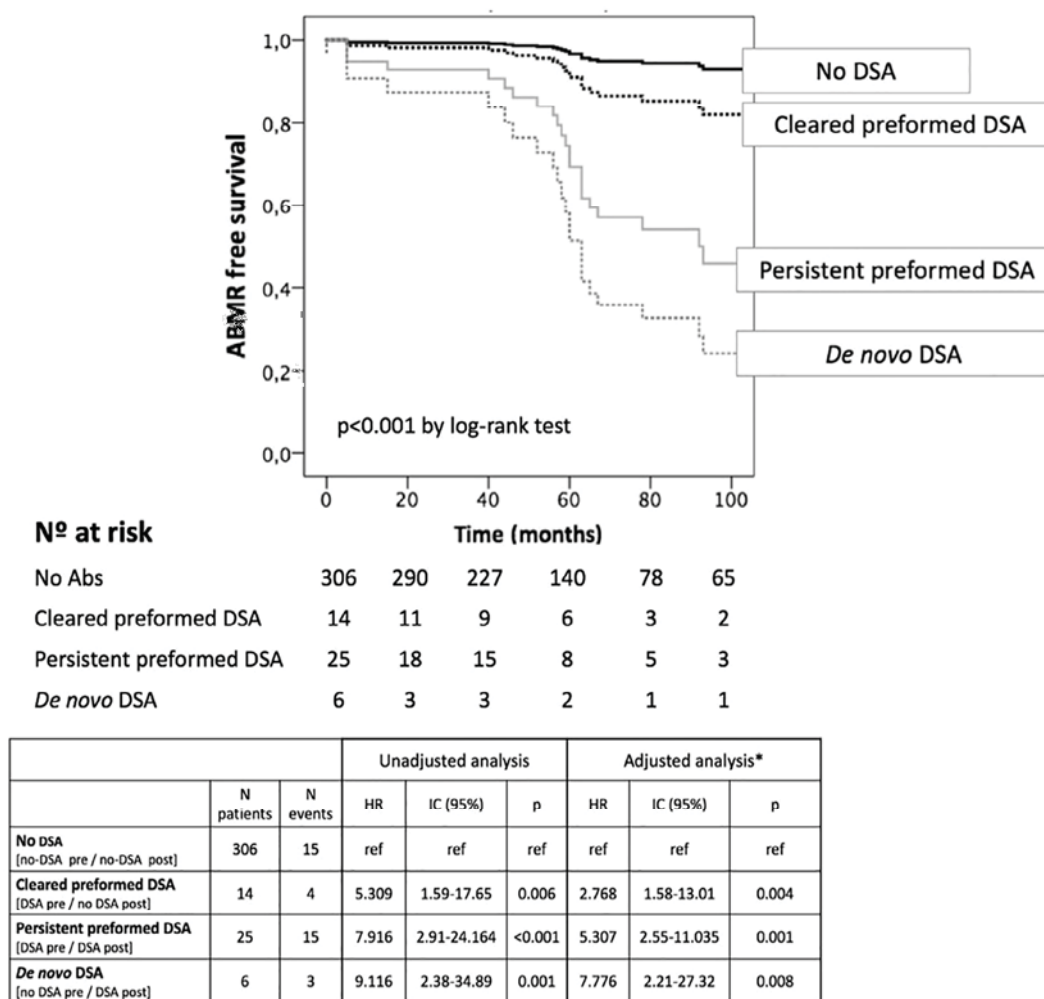


Fig. 4. Antibody mediated rejection-free survival according to the evolution of preformed DSA after transplant or the appearance of *de novo* DSA. Cox regression analysis unadjusted and adjusted for gender, retransplantation, HLA mismatch class II and pretransplant PRA CDC.

patients with preformed DSA treated with intravenous immunoglobulin or plasma exchange with rituximab peritransplantation, subclinical ABMR at one year was more frequent with DSA-II than with I [27]. Consequently, our experience and that of others suggest that preformed class-I DSA should discourage KT unless desensitization or combined transplantation is planned before KT. On the other hand, preformed class-II DSA confers risk for the development of late ABMR with or without peritransplant treatment.

Through monitoring with SAB one year after KT, we detected that 41.2% of patients with preformed DSA and functioning grafts cleared their antibodies without any specific treatment. Two previous very small studies described posttransplant persistence of preformed DSA in some patients, but lacked systematic surveillance of all patients with preformed DSA [29,30]. No correlation with ABMR or graft survival was attempted in these studies. To our knowledge, only four recent studies have systematically assessed persistence of preformed HLA DSA employing SAB after transplantation [23–26]. They showed 62–65% clearance at follow-up. Marfo et al. and Adebiyi et al. did not find any influence of preformed DSA on graft survival [24,26]. The other two studies reported an increase rate of graft loss at follow-up in patients transplanted with DSA only when they persisted after KT [23,25]. We did not detect impact on graft-survival in an adjusted analysis of persistent preformed or persistent cleared, but we observed a higher risk of ABMR both in patients with persistent and cleared preformed DSA. When adjusted their analysis, Caillard et al. found no differences in graft function and survival among patients with cleared preformed

DSA, with persistent preformed DSA, with dnDSA and those without DSA [25].

In our cohort, patients with preformed cleared DSA showed intermediate ABMR rates between persistent DSA and no DSA. A likely explanation may be that persistent DSA are produced in higher amounts and yield graft damage, while cleared DSA might be partially controlled by immunosuppression so injury evolves slowly. Marfo et al. found that patients with preformed DSA had more acute and chronic rejection with persistent vs cleared DSA (30 vs 7%,  $p = 0.006$ ) without details about the type of rejection [24]. Kimball et al. found 43% ABMR in patients with persistent DSA, 3% in those who cleared DSA and 1% in those without DSA [23]. Interestingly, in patients transplanted with a negative flow crossmatch, Adebiyi and col. found that only DSA with MFI over 3000 associated with an increased risk of biopsy-proven acute rejection with indication biopsies. They saw that patients with persistent or recurrent DSA had a non-significant decrease in 5-year death-censored graft survival but provided no information on the incidence of ABMR [26]. The difference of the impact of preformed DSA on ABMR diagnosis in our study compared with those may be due to different definition of DSA and the fact that biopsies were not classified following Banff 2015 criteria. Evolving Banff classification allows a more precise diagnosis of ABMR [15].

As persistence or clearance of DSA impacts ABMR free graft-survival, attempts to distinguish how preformed antibodies will behave after transplantation is clinically relevant. In our cohort, preformed DSA class II, with high MFI and complement binding capacity persisted

more frequently, but the only factor independently associated with persistence was the strength of DSA pretransplantation with a cutoff MFI of 5000. Among the three studies mentioned before, only Caillard et al. reported similar results. They found that the iDSA MFI was the most significant factor related to persistence after KT [25]. The other studies did not find any characteristic of DSA associated with clearance or persistence of DSA after KT [23,24].

Through posttransplant monitoring one year after kidney transplantation, we also detected dnDSA at a low incidence of 1.9% in a low-risk population under conventional immunosuppression. It is well-known that dnDSA are associated with an increased incidence of ABMR [5–7]. Our experience confirms that in a multivariate adjusted analysis. Furthermore, this risk is also largely increased in patients with preformed DSA, either detected posttransplant or not. The incidence of ABMR in the three main types of patients (preformed DSA, de novo DSA and no DSA) is similar in our experience to that described by Caro-Oleas et al. [4], with cleared preformed DSA retaining their impact.

The main limitation of our study is that our patient cohort is immunologically low-risk, as illustrated by the low incidence of de novo DSA, and full high resolution HLA typing was not available for all donors, so donor-specificity had to rely on linkage disequilibrium and interpretation consensus for some Caucasian donors. In addition, surveillance biopsies were not available, so subclinical ABMR infra-estimation is likely [31]. However, ours is a large well characterized cohort, with tight DSA monitoring during a long period after KT and evidences that not all preformed DSA that disappear after KT are innocuous. One may argue that some of these DSA may not have been completely cleared but persist very weakly with MFIs below 500, so it may be a matter of definition.

In summary, patients with preformed DSA carry a higher risk of graft loss, being early graft loss high if DSA class I alone or with class II are present and no pretransplant treatment is implemented. Preformed DSA class II are frequently associated with detection of late ABMR in the graft biopsy, regardless potential DSA clearing or minimization to very low MFI after transplantation. These findings are clinically relevant for desensitization programs. Larger studies with systematic posttransplant follow-up biopsies in patients with preformed DSA are needed to characterize better patient phenotypes and design personalized management of this greater immunological risk to increase transplant opportunities.

## Acknowledgements

We are indebted to Sara Alvarez, Rosa Causadias, Aurora Sanchez, Montserrat Folgueiras and Anna Faura for their technical support and Xavier Duran for his statistical assistance. DRP did this study as part of her doctoral thesis program at Universitat Autònoma de Barcelona. This study was presented as an oral communication at ERA-EDTA Meeting 2017.

## Conflict of interests

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by Human Immunology Journal. The results presented in this paper have not been published previously in whole or part, except in abstract format.

## Funding sources

This study was performed with funding from projects PI13/00598 and PI16/00619 (Spanish Ministry of Health ISCIII FIS-FEDER), 137/C/2012 (Marató TV3), and RD12/0021/0024 and RD16/0009/0013 (ISCIII FEDER RedinRen). MJPS is supported by a Rio Hortega contract (ISCIII).

## References

- [1] S. Mohan, A. Palanisamy, D. Tsapepas, et al., Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes, *J. Am. Soc. Nephrol.* 23 (12) (2012) 2061–2071.
- [2] B.D. Tait, C. Süsal, H.M. Gebel, et al., Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation, *Transplantation* 95 (1) (2013) 19–47.
- [3] C. Lefaucheur, A. Loupy, G.S. Hill, et al., Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation, *J. Am. Soc. Nephrol.* 21 (8) (2010) 1398–1406.
- [4] J.L. Caro-Oleas, M.F. González-Escribano, M.A. Gentil-Govantes, et al., Clinical relevance of anti-HLA donor-specific antibodies detected by Luminex assay in the development of rejection after renal transplantation, *Transplantation* 94 (4) (2012) 338–344.
- [5] C. Wiebe, I.W. Gibson, T.D. Blydt-Hansen, et al., Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant, *Am. J. Transplant.* 12 (5) (2012) 1157–1167.
- [6] A. Sicard, S. Ducreux, M. Rabeyrin, et al., Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss, *J. Am. Soc. Nephrol.* 26 (2) (2015) 457–467.
- [7] J.M. Devos, A.O. Gaber, L.D. Teeter, et al., Intermediate-term graft loss after renal transplantation is associated with both donor-specific antibody and acute rejection, *Transplantation* 97 (5) (2014) 534–540.
- [8] H.G. Otten, M.C. Verhaar, H.P. Borst, R.J. Hené, A.D. van Zuilen, Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure, *Am. J. Transplant.* 12 (6) (2012) 1618–1623.
- [9] V. Aubert, J.P. Venetz, G. Pantaleo, M. Pascual, Low levels of human leukocyte antigen donor-specific antibodies detected by solid phase assay before transplantation are frequently clinically irrelevant, *Hum. Immunol.* 70 (8) (2009) 580–583.
- [10] G. Hönger, H. Hopfer, M.L. Arnold, B.M. Spriewald, S. Schaub, P. Amico, Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection, *Transplantation* 92 (1) (2011) 41–47.
- [11] A. Loupy, C. Lefaucheur, D. Vernerey, et al., Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival, *N. Engl. J. Med.* 369 (13) (2013) 1215–1226.
- [12] M. Crespo, A. Torio, V. Mas, et al., Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: does C1q-fixation matter? *Transpl. Immunol.* 29 (1–4) (2013) 28–33.
- [13] A. Loupy, M. Haas, K. Solez, et al., The Banff 2015 kidney meeting report: current challenges in rejection classification and prospects for adopting molecular pathology, *Am. J. Transplant.* 17 (2017) 28–41.
- [14] M. Crespo, J. Yelamos, D. Redondo, et al., Circulating NK-cell subsets in renal allograft recipients with anti-HLA donor-specific antibodies, *Am. J. Transplant.* 15 (3) (2015) 806–814.
- [15] J. Gimeno, D. Redondo, M.J. Pérez-Sáez, D. Naranjo-Hans, J. Pascual, M. Crespo, Impact of the Banff 2013 classification on the diagnosis of suspicious versus conclusive late antibody-mediated rejection in allografts without acute dysfunction, *Nephrol. Dial. Transplant.* 31 (11) (2016) 1938–1946.
- [16] M. Willicombe, P. Brookes, E. Santos-Nunez, et al., Outcome of patients with preformed donor-specific antibodies following alemtuzumab induction and tacrolimus monotherapy, *Am. J. Transplant.* 11 (3) (2011) 470–477.
- [17] J.L. Caro-Oleas, M.F. González-Escribano, F.M. González-Roncero, et al., Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation, *Nephrol. Dial. Transplant.* 27 (3) (2012) 1231–1238.
- [18] J. Malheiro, S. Tafulo, L. Dias, L.S. Martins, et al., Analysis of preformed donor-specific anti-HLA antibodies characteristics for prediction of antibody-mediated rejection in kidney transplantation, *Transpl. Immunol.* 32 (2) (2015) 66–71.
- [19] I. Salvadé, V. Aubert, J.P. Venetz, et al., Clinically relevant threshold of preformed donor-specific anti-HLA antibodies in kidney transplantation, *Hum. Immunol.* 77 (6) (2016) 483–489.
- [20] G. Vlad, E.K. Ho, E.R. Vasilescu, et al., Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival, *Hum. Immunol.* 70 (8) (2009) 589–594.
- [21] E.V. Billen, M.H. Christiaans, E.M. van den Berg-Loonen, Clinical relevance of Luminex donor-specific crossmatches: data from 165 renal transplants, *Tissue Antigens* 74 (3) (2009) 205–212.
- [22] P. Amico, G. Hönger, M. Mayr, J. Steiger, H. Hopfer, S. Schaub, Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads, *Transplantation* 87 (11) (2009) 1681–1688.
- [23] P.M. Kimball, M.A. Baker, M.B. Wagner, A. King, Surveillance of alloantibodies after transplantation identifies the risk of chronic rejection, *Kidney Int.* 79 (10) (2011) 1131–1137.
- [24] K. Marfo, M. Ajaimy, A. Colovai, et al., Pretransplant immunologic risk assessment of kidney transplant recipients with donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies, *Transplantation* 98 (10) (2014) 1082–1088.
- [25] S. Caillard, C. Becmeur, G. Gautier-Vargas, et al., Pre-existing donor-specific antibodies are detrimental to kidney allograft only when persistent after transplantation, *Transpl. Int.* 30 (1) (2017) 29–40.
- [26] O.O. Adebiyi, J. Gralla, P. Klem, et al., Clinical significance of pre-transplant donor specific antibodies in the setting of negative cell-based flow cytometry cross-matching in kidney transplant recipients, *Am. J. Transplant.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1111/ajt.13848> [Epub ahead of print].
- [27] A. Loupy, C. Suberbielle-Boissel, J. Zuber, et al., Combined posttransplant prophylactic IVIg/Anti-CD 20/plasmapheresis in kidney recipients with preformed donor-specific antibodies: a pilot study, *Transplantation* 89 (2010) 1403–1410.

- [28] W. Dar, A. Agarwal, C. Watkins, et al., Donor-directed MHC class I antibody is preferentially cleared from sensitized recipients of combined liver/kidney transplants, *Am. J. Transplant.* 11 (2011) 841–847.
- [29] A.M. Patel, C. Pancoska, S. Mulgaonkar, F.L. Weng, Renal transplantation in patients with pre-transplant donor-specific antibodies and negative flow cytometry crossmatches, *Am. J. Transplant.* 7 (10) (2007) 2371–2377.
- [30] A. Gupta, V. Iveson, M. Varagunam, S. Bodger, P. Sinnott, R.C. Thuraiingham, Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: are they relevant? *Transplantation* 85 (8) (2008) 1200–1204.
- [31] A. Loupy, D. Vernerey, C. Tinel, et al., Subclinical rejection phenotypes at 1 year post-transplant and outcome of kidney allografts, *J. Am. Soc. Nephrol.* 26 (7) (2015) 1721–1731.

### 3.2. Impact of preformed and de novo anti-HLA DP antibodies in renal allograft survival

*Transpl Immunol. 2016 Feb;34:1-7.*

*doi: 10.1016/j.trim.2015.11.002.*

#### Hipótesis de trabajo

Los ensayos en fase sólida proporcionan información sobre antígenos HLA clásicamente considerados menos inmunogénicos y poco relevantes en el campo del trasplante de órgano sólido, como son los anticuerpos frente a los antígenos HLA-DP. Desconocemos si la presencia pre y postrasplante de estos anticuerpos anti-DP detectados en plataforma Luminex<sup>®</sup> influye en la supervivencia del injerto renal.

#### Objetivos

- 1.- Evaluar la prevalencia y características de los anticuerpos anti-HLA DP en receptores de trasplante renal.
- 2.- Analizar el impacto en la supervivencia del injerto de los anticuerpos anti HLA-DP detectados pre y postrasplante renal.

#### Material y métodos

Realizamos un estudio retrospectivo de 440 receptores de trasplante renal reclutados entre Enero de 2008 y Marzo de 2013 con injerto funcional más de 3 meses, realizados entre 1979-2012 en el Hospital del Mar, Barcelona. Todos los pacientes se trasplantaron con prueba cruzada CDC pretrasplante negativa.

De los 440 pacientes incluidos en el estudio, se realizó estudio de anticuerpos anti-HLA pretrasplante de 291 receptores con muestra de suero disponible y de 346 postrasplante. Todos los pacientes fueron seguidos hasta Marzo de 2013 o hasta la pérdida de injerto por vuelta a diálisis, retrasplante o muerte con injerto funcional.

Ver métodos de detección de anticuerpos anti-HLA en apartado de Material y Métodos 3.1

#### Resultados

##### *1.- Anticuerpos antiHLA-DP pretrasplante*

Se detectaron anticuerpos anti-HLA pretrasplante en el 23.3% de los pacientes. De estos, 27 (39.7%) presentaban anticuerpos frente a moléculas DP en el estudio de SA. Los pacientes con anticuerpos frente a HLA DP presentaron mayor función retrasada del injerto (60% vs 20%,  $p=0.002$ ) y más tendencia a tener DSA frente a antígenos HLA A, B, C, DR o DQ (62.9% vs 46.9%,  $p=0.09$ ) que los pacientes sin anticuerpos HLA-DP.



De los 68 pacientes con anticuerpos anti-HLA clase II, 36 (52.9%) tenían DSA. En el 47.7% de los pacientes con DSA se detectaron anticuerpos frente HLA-DP y en el grupo de pacientes con anticuerpos anti-HLA no ADS, la presencia de anti-HLA DP fue del 31.2%.

En relación con las características de los anticuerpos anti-HLA DPB1\*, en el grupo de pacientes con DSA, la mediana de MFI fue de 3623 (RIQ: 2067-15736) sin diferencias estadísticamente significativas con la mediana de MFI 3672 (RIQ: 1683-7279) del grupo de pacientes sin DSA. La especificidad DPB1\* más frecuentemente detectada fue DPB1\*05:01 en el 18.5% de los pacientes estudiados. En el grupo con DSA, la más frecuente DPB1\*04:02 y en el grupo con anticuerpos no DSA, DPB1\*02:01.

En el 90% de los pacientes, además de anticuerpos anti HLA-DP detectamos otras especificidades en el estudio de SA. Sólo 3 pacientes presentaban únicamente anticuerpos frente a DP con una mediana de MFI de 3059 (1937-3590). En ninguno de los tres pacientes se detectaron estos anticuerpos postrasplante, y mantenían su injerto funcionando al final del seguimiento.

Los pacientes con DSA pretrasplante presentaron peor supervivencia del injerto ( $p=0.01$ ) que aquellos con anticuerpos no-DSA, con una mediana (RIQ) de seguimiento de 76.5 (35-149) meses. La presencia o ausencia de anticuerpos anti-HLA DP no afectó la supervivencia del injerto en los pacientes con DSA (DSA con anti-HLA DP vs DSA sin anti- HLA DP,  $p=0.78$ ); ni en aquellos sin DSA ( $p=0.09$ ).

## 2.- *Anticuerpos antiHLA-DP postrasplante*

De los 346 pacientes, 59 (17.1%) tenían anticuerpos anti-HLA clase II positivo. De ellos, 33 (56%) presentaban anticuerpos antiHLA-DP cuando se estudiaron mediante técnica de SA.

Al comparar las características basales de los pacientes con y sin anticuerpos frente a HLA-DP, encontramos que la función retrasada del injerto fue más frecuente en pacientes con anticuerpos anti HLA-DP (60 vs 39.2%,  $p=0.058$ ). La tasa de rechazo agudo demostrado por biopsia fue similar en ambos grupos. No hubo diferencias significativas en la presencia de DSA entre ambos grupos; se detectaron DSA en 14 pacientes (42.4%) con antiHLA-DP y en 9 (35.6%) del grupo sin antiHLA-DP.

La mediana (RIQ) de MFI de los anticuerpos anti-HLA DP detectados postrasplante fue de 3116 (1814-4322). Las especificidades DPB\* más frecuentes fueron DPB1\*17:01 (21.2%), seguida de DPB1\*13:01 y DPB1\*18:01 presentes en el 18.2% de los pacientes. Similar a lo que ocurre pretrasplante, en el 91% de los pacientes la presencia de anticuerpos anti-HLA DP se asoció con la presencia de otras especificidades DR y DQ. De nuevo, sólo detectamos 3 pacientes con anti-HLA DP de forma aislada; de éstos, en dos pacientes habían aparecido

*de novo* y los tres mantenían su injerto funcionante sin episodios de rechazo al final del seguimiento.

La mediana (RIQ) de MFI de los anticuerpos anti-HLA DP fue similar en el grupo de pacientes con DSA y el grupo HLA no-DSA [2435 (1718-3869) y 2650 (1655-4290), respectivamente]. En 5 y 8 pacientes se detectaron anticuerpos anti-HLA DP de nueva aparición en el grupo DSA y en el grupo sin DSA, respectivamente. En 6 pacientes desconocemos si estos anticuerpos son *de novo*, ya que no tenían suero disponible pretrasplante.

Con una mediana (RIQ) de 48 (35-50.7) meses de seguimiento tras la determinación de anticuerpos postrasplante, la supervivencia del injerto (muerte censurada) fue superior en los pacientes sin DSA ( $p=0.02$ ). Al analizar la supervivencia según la presencia de anticuerpos anti HLA-DP, observamos como la presencia de estos anticuerpos no modificaba el impacto en la supervivencia. Así, los pacientes con DSA con y sin anticuerpos anti HLA-DP presentaron una supervivencia del injerto similar ( $p=0.089$ ). De igual manera ocurre en el grupo no-DSA, los pacientes con y sin anticuerpos anti HLA-DP tampoco presentaron diferencias en la supervivencia del injerto al final del seguimiento. ( $p=0.18$ ).

