

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL REGIONAL UNIVERSITARIO DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**TESIS DOCTORAL**

# IMPACTO DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN LA DISFUNCIÓN DEL INJERTO EN EL TRASPLANTE RENAL

---

Pedro Ruiz Esteban

Málaga, 2016.

UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Pedro Ruiz Esteban

 <http://orcid.org/0000-0001-7308-8697>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**D. Miguel González-Molina Alcaide**, Doctor en Medicina, Emérito de la Unidad de Gestión Clínica de Nefrología del Hospital Regional Universitario de Málaga.

**D. Domingo Hernández Marrero**, Profesor Titular del Departamento de Medicina Interna y Dermatología de la Universidad de Málaga y Director de la Unidad de Gestión Clínica Intercentro de Nefrología de los Hospitales Universitarios Regional de Málaga y Virgen de la Victoria.

**INFORMAN:** Que D. Pedro Ruiz Esteban, ha obtenido y estudiado, bajo nuestra dirección, el material necesario para la realización de su **Tesis Doctoral** titulada: **"IMPACTO DE LA INMUNIDAD HUMORAL EN LA DISFUNCIÓN DEL INJERTO EN EL TRASPLANTE RENAL"**, la cual ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo los que suscriben revisado la presente Tesis y estando conformes para ser juzgada a fin de que opte al grado de **DOCTOR por la Universidad de Málaga**.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expiden el presente en Málaga, a 9 de Noviembre 2015.

Fdo.: D. Miguel González-Molina Alcaide.

Fdo.: D. Domingo Hernández Marrero.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

*“Si supiese qué es lo que estoy haciendo, no le llamaría investigación”*

*Albert Einstein*

A Eulalia, Alejandra, Darwin y familia.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# AGRADECIMIENTOS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Me gustaría dedicar un espacio a todas aquellas personas que han hecho posible que se hiciera realidad esta tesis doctoral. En primer lugar hacer una mención especial al **Dr. Miguel González-Molina**, por su ayuda, dedicación y trabajo para conseguir que esta tesis se hiciera realidad, estaré siempre agradecido. Al **Dr. Domingo Hernández**, por haberme ayudado con el análisis estadístico y por dedicarme un tiempo que sé que no tiene.

A todo el **Servicio de Inmunología**, al **Dr. Abelardo Caballero**; por explicarme todas aquellas cosas que no comprendía de la inmunología y por su disponibilidad total. Gracias a **Luis** por su ayuda desinteresada a que esta tesis fuera más completa con la determinación de la fijación C1q en los pacientes con DSA.

Al **Servicio de Anatomía Patológica**, a las **Dras. Miriam León e Isabel García**, por ayudarme en el análisis detallado de las lesiones provocadas por los DSA en el rechazo humoral.

Al **Servicio de Nefrología** y en especial al equipo de **Trasplante Renal**. A la **Dra. Lola Burgos** por todos los consejos dados y su amistad. A la **Dra. Mercedes Cabello**, por ser tan accesible y ayudarme cuando lo necesitaba. A **Ian**, por su ayuda en la traducción y envío de los artículos de esta tesis.

A todos mis amig@s que durante todo este tiempo me han apoyado. Quiero hacer mención a **Paloma** y a **Almudena**, a las que quiero, adoro y admiro.

A mi familia **Ruiz-Esteban**; mis **padres, hermanos, cuñada, sobrinos y demás miembros**, por ser mi mayor apoyo y por transmitirme toda la energía necesaria para llevar esto a cabo. Gracias porque siempre estáis y estaréis. Por ser una familia tan unida, siempre es un placer reunirme con vosotr@s.

A mi otra familia **Palma-Mérida**; por acogerme y tratarme como parte de la familia “aunque no tenga papeles”.

Y por último, agradecer a los motores de mi vida, a **Eulalia** y **Alejandra**. No me imagino la vida sin ellas, gracias por todo el apoyo, sin ellas esto no hubiera sido posible.

Gracias a todos!.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# ABREVIATURAS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

ACV: Accidente cerebrovascular.

CKD-EPI: Chronic kidney disease epidemiology collaboration.

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

CMV: Citomegalovirus.

CPA: Célula presentadora de antígeno.

CsA: Ciclosporina.

CV: Coeficiente de variabilidad.

DAF: Decay accelerating factor.

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño celular.

CDRs: Regiones determinantes de complementariedad.

DNA: Ácido desoxiribonucleico.

DP: Diálisis peritoneal.

DSA: Donor specific antibody (Anticuerpos donante específico).

ENDAT: Expresión de genes de activación de células endoteliales.

ESRD: Insuficiencia renal crónica en estadio terminal.

EVE: Everolimus.

FIAT: Fibrosis intersticial y atrofia tubular.

FRI: Función retrasada del injerto.

GFR: Tasa de filtración glomerular.

Gr: Gránulo.

GT: Glomerulopatía del trasplante.

Gz: Granzyma B.

HD: Hemodiálisis.

ICN: Inhibidor de la calcineurina.

IMC: Índice de masa corporal.

HE: Hematoxilina-eosina.

HLA: Human leucocyte antigen (Antígenos leucocitarios humanos).

HTA: Hipertensión arterial.

MMF: Micofenolato mofetilo.

TaC: Tacrolimus.

TR: Trasplante renal.

NK: Natural killer (Células asesinas naturales).

NTA: Necrosis tubular aguda.

MCP: Proteína del cofactor de membrana.

MFI: Intensidad de fluorescencia media.

MMF: Micofenolato mofetilo.

mTOR: Fármacos inhibidores de mTOR.

NLR: Receptores de proteínas dominio-oligomerización de unión a nucleótidos.

P: Prednisona.

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PAS: Ácido peryódico shiff.

PF: Perforina.

PQR: Poliquistosis renal del adulto.

PRA: Panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos.

PRR: Receptores de reconocimiento de patógenos.

RA: Rechazo agudo.

RNA: Ácido ribonucleico.

ROC: Característica operativa del receptor.

R-P: Riñón-páncreas.

SI: Sistema inmune.

SRL: Sirolimus.

TaC: Tacrolimus.

TCE: Traumatismo craneoencefálico.

TCR: Receptor de linfocitos T.

TIF: Tiempo de isquemia fría.

TLE: Tiempo en lista de espera.

TLR: Receptores tipo Toll.

Tregs: Linfocitos T reguladores.

TR: Trasplante renal.

TSV: Tiempo de sutura vascular.

VHB: Virus de la hepatitis B.

VHC: Virus de la hepatitis C.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# ÍNDICE





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

	<b>Pág.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
Sistema inmune	2
Respuesta celular	7
Respuesta humoral	13
Infraestructura de la respuesta humoral	15
1. Linfocito B	15
2. Anticuerpos	16
3. Células inflamatorias.	18
4. Sistema del complemento	19
Células diana de los anticuerpos	21
¿Por qué hubo y aún persisten dificultades para diagnosticar el rechazo agudo humoral?	22
Impacto clínico del rechazo humoral y desarrollo de DSA	26
Anticuerpos y lesiones histológicas en el trasplante alogénico	27
1. Activación del sistema del complemento	28
a. Rechazo hiperagudo	28
b. Rechazo agudo humoral	30
2. Acción directa, independiente del complemento	32
3. Reclutamiento de células inflamatorias, vía receptores Fc (inmunidad celular mediada por anticuerpos)	35
Glomerulopatía del trasplante	35
Papel del C4d en el diagnóstico de la glomerulopatía del trasplante	37
Anticuerpos no HLA en el rechazo humoral	37
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	
1. Hipótesis	39
2. Objetivos	41
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. Diseño del estudio y población de pacientes	42
2. Variables clínicas	42
3. Definición de variables	44
4. Detección y caracterización de anticuerpos anti-HLA	45
5. Activación de C1q	46
6. Cálculo del PRA virtual	47

7. Coeficiente de variabilidad de niveles en sangre de tacrolimus	47
8. Inmunosupresión	49
9. Análisis estadístico	49
10. Protección de pacientes	50

#### **IV. RESULTADOS**

---

<b>Análisis Global en la población estudiada</b>	<b>51</b>
1. Datos demográficos	51
a. Donantes	51
b. Receptores	52
2. Tratamiento inmunosupresor	54
3. Datos inmunológicos	57
4. Supervivencia del injerto renal	59
a. Causas de pérdida del injerto	59
b. Supervivencia global del injerto no censurada	59
c. Supervivencia global del injerto censurada	60
d. Supervivencia del injerto no censurada en función del tipo de trasplante	61
e. Supervivencia del injerto censurada en función del tipo de trasplante	62
f. Factores de riesgo asociados a la supervivencia del injerto	63
5. Supervivencia del Paciente	66
a. Causa de muerte del paciente	66
b. Supervivencia global del paciente	67
c. Supervivencia del paciente en función del tipo de trasplante	68
d. Factores de riesgo asociados a la supervivencia del paciente	69
<b>Estudio de los Anticuerpos Anti-HLA</b>	<b>71</b>
1. Anticuerpos anti-HLA preformados no DSA	71
2. Datos demográficos y clínicos de donantes y receptores que desarrollan DSA	74
3. Inmunosupresión	76
4. Incidencia de rechazo celular según la ausencia o formación de anticuerpos anti-HLA DSA o no DSA postrasplante	77
5. Incidencia de DSA anti-HLA	77
6. Clase de DSA anti-HLA	78
7. Relación DSA y rechazo humoral	79

8. Expansión de anticuerpos anti-HLA	81
9. Supervivencia del injerto no censurada	83
10. Supervivencia del injerto censurada	85
11. Características de los pacientes que desarrollaron DSA durante el seguimiento en función del rechazo humoral	89
12. Supervivencia del paciente	92
13. Fijación de C1q	93
14. Factores de riesgo asociados a la aparición de DSA	95
15. Supervivencia de injertos y pacientes en enfermos con y sin rechazo (celular o humoral)	97
a. Supervivencia del injerto no censurada	97
b. Supervivencia del injerto censurada	98
c. Supervivencia del paciente	99
d. Factores de riesgo asociados al rechazo humoral	100
e. Factores de riesgo asociados al rechazo humoral en pacientes con DSA	102
f. Factores de riesgo asociados a la pérdida de injerto en pacientes con DSA	103
<b>Coefficiente de variabilidad de los inmunosupresores</b>	104
1. Coeficiente de variabilidad de niveles en sangre de tacrolimus en los pacientes que presentaron DSA	104
a. Análisis univariante	105
b. Análisis multivariante	106
c. Supervivencia del injerto no censurada en función del coeficiente de variabilidad	107
d. Supervivencia del injerto censurada en función del coeficiente de variabilidad	108
e. Supervivencia del paciente en función del coeficiente de variabilidad	109
2. Coeficiente de variabilidad de los niveles en sangre de tacrolimus en los pacientes que presentaron rechazo humoral	110
a. Análisis univariante	111
b. Análisis multivariante	112
c. Supervivencia del injerto no censurada en función del coeficiente de variabilidad	113



d. Supervivencia del injerto censurada en función del coeficiente de variabilidad	114
e. Supervivencia del paciente en función del coeficiente de variabilidad	115
<b>Función Renal</b>	116
a. Función renal en pacientes sin rechazo del injerto o que presentaron rechazo humoral o celular	116
b. Función renal en pacientes que presentaron DSA	118
c. Función renal en el grupo de pacientes que presentó DSA y rechazo humoral	119
<b>V. DISCUSIÓN</b>	120
<hr/>	
1. Formación de anticuerpos anti-HLA de novo en el postrasplante	121
2. Naturaleza de los DSA	122
a. Evolución de los anticuerpos anti-HLA	123
b. Anticuerpos anti-HLA preformados no DSA	123
c. Supervivencia del injerto en pacientes con anticuerpos anti-HLA no DSA y DSA	124
3. Factores de riesgo de aparición de DSA de novo	126
4. Incidencia del rechazo humoral	127
5. Factores de riesgo de rechazo humoral	130
6. DSA que fijan C1q	131
7. Coeficiente de variabilidad de niveles en sangre de tacrolimus como factores de riesgo de formación de DSA y rechazo humoral	133
8. Función Renal	134
9. Supervivencia del injerto y del paciente con rechazo humoral	135
10. Limitaciones del estudio	135
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	137
<hr/>	
<b>VII. ANEXOS</b>	
<hr/>	
A. Protocolo de Inmunosupresión en trasplante renal en el Hospital Regional Universitario de Málaga	139
B. Clasificación de Banff 2013	184
C. Luminex	186
D. Técnica del C1q	190
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.</b>	192
<hr/>	

# I. INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

El trasplante de órganos se plantea, inicialmente, como un problema de técnica quirúrgica y el objetivo que se propone es recuperar la salud del enfermo sustituyendo un órgano severamente lesionado por otro sano. Pero Peter Medawar, en 1.944, alertaba de que el problema era más complejo, porque injertos experimentales de piel eran rechazados y la realización de un segundo injerto procedente del mismo donante, provocaba un rechazo precoz y severo<sup>1</sup>. Por tanto, no solo se trataba de un problema de técnica quirúrgica, sino que se añadía otro, aún mayor, al observar que el receptor armaba una respuesta contra el injerto.

Estos datos experimentales de Medawar, se confirmaron en humanos cuando se inicia la era del trasplante de órganos sólidos. El primer trasplante renal (TR) que se puede considerar como verdadero inicio de la era del trasplante, se realiza en 1952 de madre a hijo. El injerto funciona correctamente durante 20 días, pero a partir de esta fecha deja bruscamente de hacerlo y el paciente fallece. Pasados dos años, se realiza otro TR entre gemelos univitelinos y el injerto funciona durante muchos años sin inmunosupresión. La conclusión fue simple, entre personas de la misma especie y raza genéticamente no idénticas se rechaza el órgano trasplantado (aloinjerto), pero no entre los genéticamente idénticos (isoinjerto). Los vertebrados poseen un sistema capaz de reconocer diferencias entre individuos de la misma especie pero genéticamente no idénticos y actuar contra el órgano trasplantado.

El problema era conocer el sistema de reconocimiento y el proceso que sigue para actuar contra el injerto. La técnica que da la primera información es la biopsia renal que muestra como dato distintivo en el órgano rechazado, un infiltrado de células mononucleares (reconocidas posteriormente como linfocitos T), y que pasados muchos años la clasificación de Banff considera específico de rechazo agudo (RA) si afecta a los túbulos (tubulitis) y/o al endotelio (endotelitis)<sup>2,3</sup> (Fig. 1).

Basándose en este dato, durante las cuatro primeras décadas desde el inicio del TR, se mantiene como única la teoría celular del RA del aloinjerto y la respuesta humoral queda limitada al rechazo hiperagudo, provocado por anticuerpos preformados contra antígenos HLA

de clase I y no secundarios a la respuesta del receptor al aloinjerto<sup>4,5</sup>.

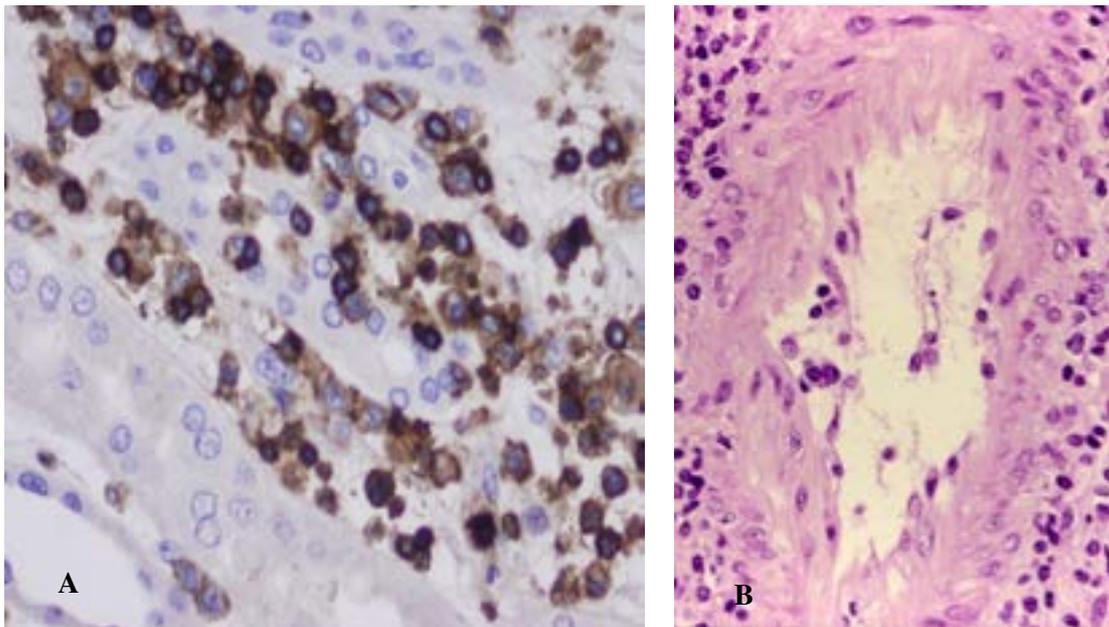


Figura 1. Rechazo agudo celular. A) Infiltrado de células mononucleares en el túbulo renal (tubulitis). Técnica inmunohistoquímica para CD45 (Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa). Gentileza de los profesores R. García del Moral y F. O'Valle. B) Infiltrado de células mononucleadas bajo el endotelio vascular (endotelitis) (HE).

## SISTEMA INMUNE

Las bases de lo que hoy conocemos como respuesta inmune se establecieron hace miles de años, cuando los primeros seres vivos compartieron hábitat con patógenos que constituían una amenaza para su supervivencia. Este reto evolutivo permitió la creación de una infraestructura de defensa que conocemos como sistema inmune (SI)<sup>6</sup>.

Los invertebrados más elementales desarrollaron un SI parecido a lo que se conoce como fagocitosis y los más complejos, un SI formado por moléculas (citocinas, sistema del complemento y proteínas de la fase aguda) y células (Fig. 2) eminentemente fagocíticas (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, asesinas naturales[NK] y dendríticas), carentes de memoria inmunológica, de progenie limitada, vida relativamente larga y con receptores de alta eficacia codificados en la línea germinal, que sólo reconocen a estructuras de los microorganismos llamadas “**patrones moleculares asociados a patógenos**”;

y por lo tanto, incapaces de reconocer otras diferencias moleculares. A esta respuesta se la conoce como **inmunidad innata**<sup>7</sup>.

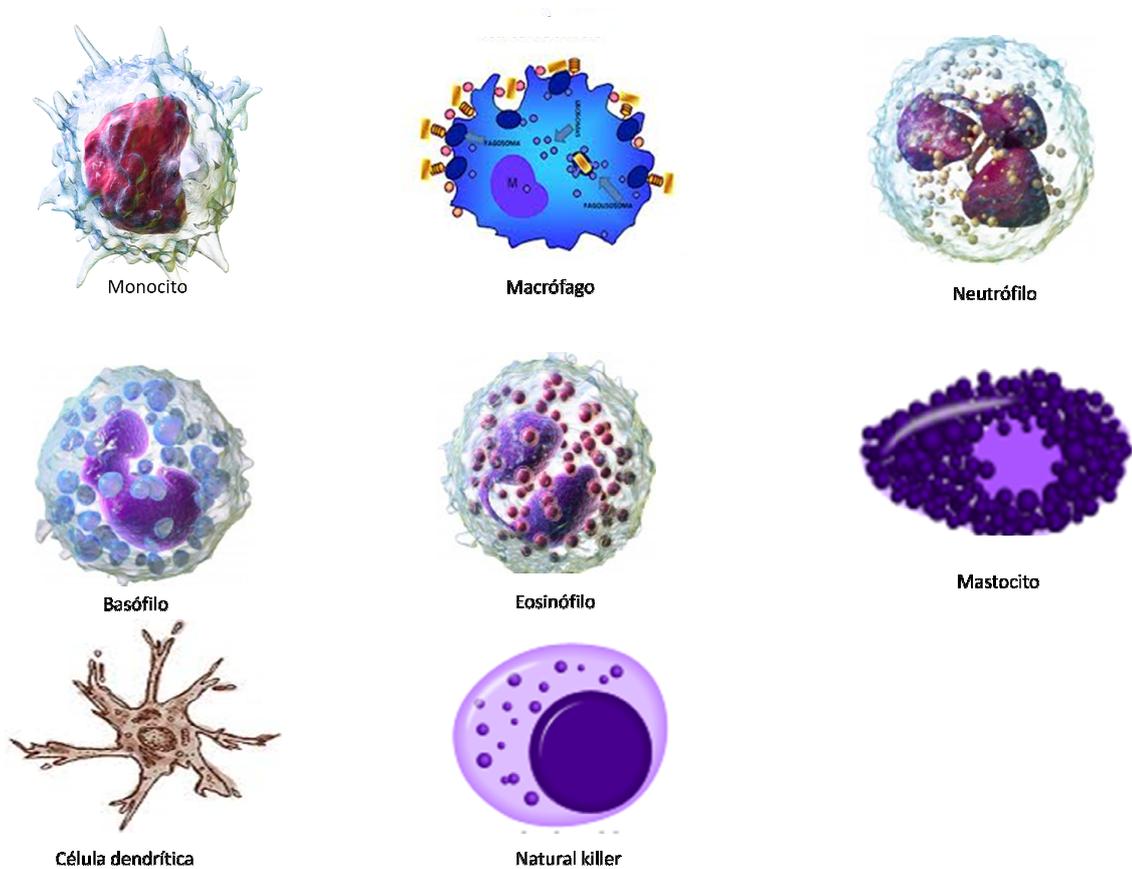


Figura 2. Células de la respuesta inmune innata.

La presión evolutiva en un proceso continuo de “**adaptarse o morir**”, permitió que los vertebrados completaran su SI, añadiendo una nueva infraestructura de identificación y defensa conocida como respuesta inmune **adaptativa o adquirida**<sup>8</sup>, formada por linfocitos T y B (Fig. 3). Este sistema, tiene como elemento distintivo su capacidad para generar receptores de membrana por reordenamiento de genes al azar; lo que supone, una alta capacidad para formar una cifra muy elevada de receptores diferentes con los que se puede reconocer a una amplísima variedad de antígenos. Además, son células dotadas de memoria inmunológica y con capacidad para proliferar ante el reconocimiento de un antígeno y formar un clon con un receptor específico.

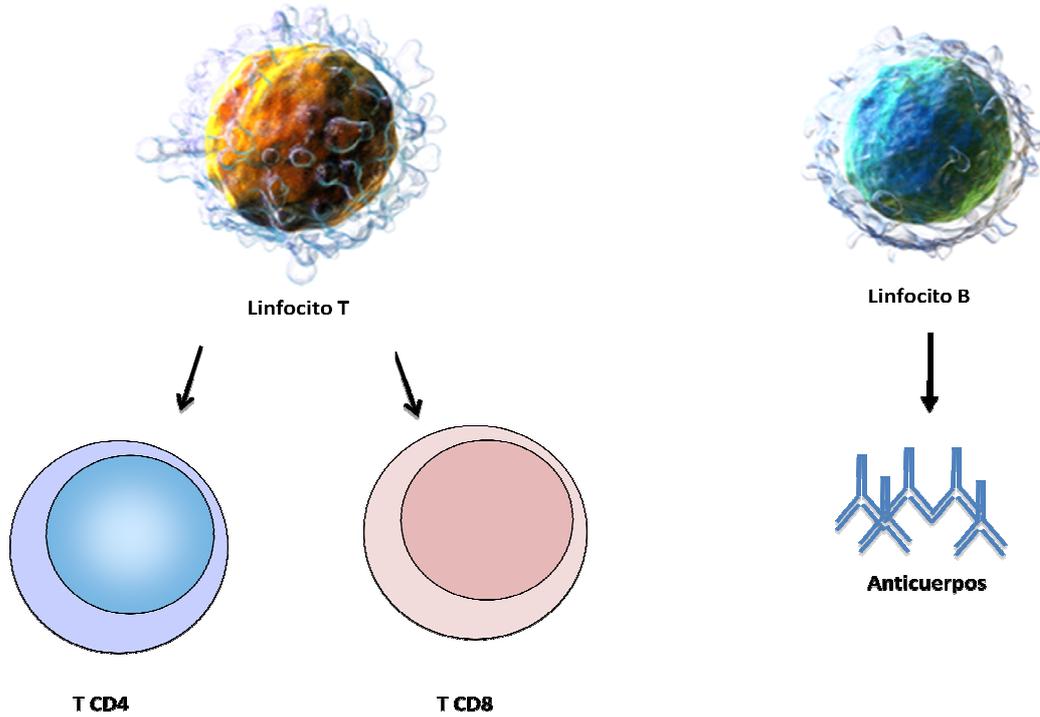


Figura 3. Componentes celulares de la respuesta inmune adquirida. Linfocito T productores de citotoxicidad celular y linfocitos B secretores de anticuerpos.

De este modo, su repertorio en la población total es tan amplio, que se incrementa la probabilidad de que a un determinado linfocito se le presente un antígeno que se una a su receptor e induzca su activación y proliferación. A este proceso se le conoce como selección clonal (Fig. 4) y constituye una propiedad básica de la respuesta inmune adaptativa para reconocer diferencias moleculares; y en nuestro caso, aportadas por el aloinjerto.

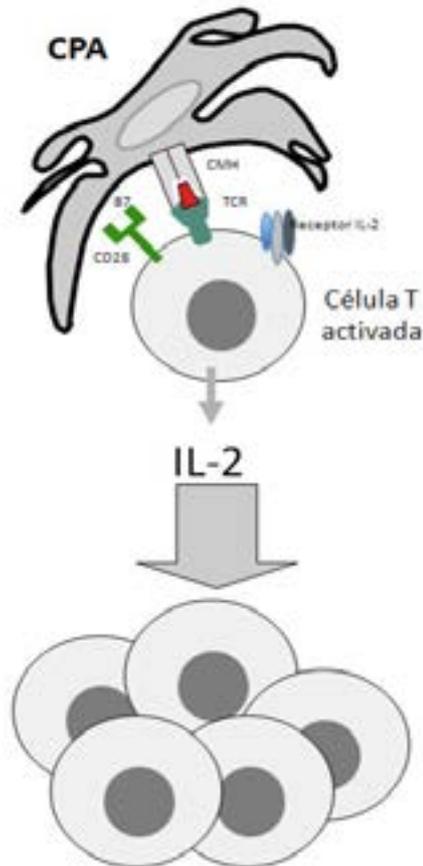


Figura 4. Proliferación clonal.

Dado el amplio número de células y moléculas que forman el SI, su capacidad de reconocimiento y de respuesta es muy variada y se lleva a cabo por: neutralización, opsonización, fagocitosis y lisis humoral y celular. El SI inmune utiliza la más eficaz para cada amenaza. Así, para patógenos intracelulares emplea la neutralización y la lisis celular; y para los extracelulares la opsonización, la lisis humoral y la fagocitosis.

¿Cuál o cuáles de estos mecanismos son los más eficaces para responder frente a un aloinjerto? La neutralización y la lisis celular y humoral; precisamente, aquellos que el SI ponen en marcha frente a virus.

Antes del implante del órgano, la muerte cerebral <sup>9</sup> y la isquemia <sup>10</sup>, provocan alteraciones, que inducen la activación de la respuesta inmune innata en el injerto (respuesta antígeno-no específica).

La muerte cerebral incrementa el riesgo de inflamación en el órgano trasplantado. En modelos animales isogénicos, el órgano procedente de donantes con muerte cerebral, muestra una respuesta inflamatoria que se caracteriza por un infiltrado de polimorfonucleares y de macrófagos; y un aumento de la expresión de selectinas y de los factores C3a y C5a del complemento, que activan a los linfocitos T y a las células dendríticas del órgano. También, en el intersticio y en los túbulos renales, aumenta la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ; y en las células

dendríticas y endoteliales de moléculas del CMH, MCP-1 y RANTES. Datos observados, en una proporción significativamente menor, en el injerto de donante vivo.

Además, la muerte cerebral se acompaña de alteraciones hemodinámicas con una fase inicial de hipertensión arterial, seguida de hipotensión. La disminución de la presión de perfusión, provoca lo que se ha llamado “tormenta” de secreción de catecolaminas con liberación masiva de citocinas pro-inflamatorias, que activan células del SI, endoteliales y del epitelio tubular del injerto<sup>11</sup>.

La isquemia incrementa el riesgo de inflamación, de función retrasada del injerto y de rechazo<sup>12,13</sup>. Las células lesionadas y muertas por isquemia, liberan material intracelular que estimula la respuesta inmune innata (Fig. 5). A este material se le conoce como “patrones moleculares asociados al daño celular” (DAMPs) y está formado por proteínas del shock y de la matriz extracelular (fragmentos de ácido hialurónico, proteoglicanos y fibronectina), ácido úrico, DNA y RNA que son ligandos de los receptores tipo Toll (TLRs) y de los de reconocimiento patrón del citosol (receptores de proteínas dominio-oligomerización de unión a nucleótidos - NLRs)<sup>14</sup>.

Las células epiteliales, endoteliales y mesenquimales del injerto, poseen ambos tipos de receptores, especialmente los TLR2 y TLR4<sup>15</sup>. Una vez estimulados por sus ligandos, son el punto de partida de una vía de señales bioquímicas que activan la respuesta inmune innata, incluida la producción de citocinas y la expresión de moléculas coestimuladoras.

Los órganos procedentes de donantes con muerte cerebral, muestran una mayor expresión de TLRs, que los de donante vivo. Estudios experimentales, han demostrado que mutaciones de TLR4 con menor afinidad para los ligandos DAMPs, reducen la respuesta inflamatoria en el órgano y la incidencia de función retrasada del injerto<sup>16-18</sup>.

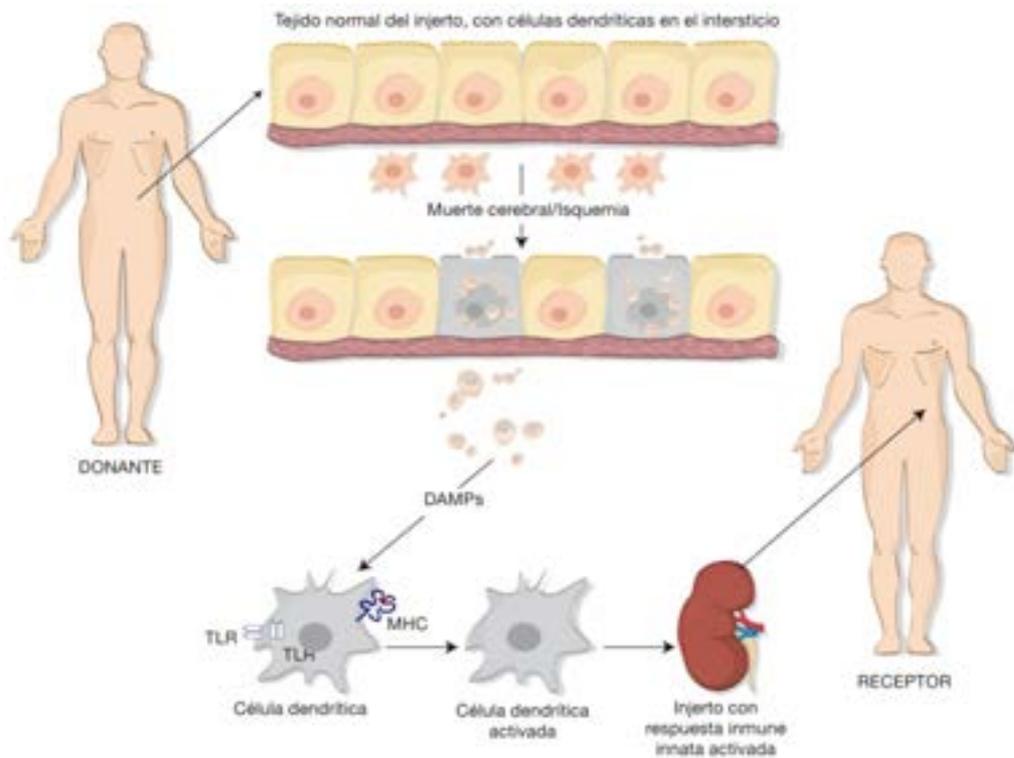


Figura 5. Células del injerto lesionadas o lisadas por efecto de la muerte cerebral/isquemia, liberan material intracelular (DAMPs) al medio, que estimula a las células dendríticas intersticiales del injerto a través de sus TLR y NLR. Tras el desclampaje vascular penetran en la circulación del receptor, para emigrar a zonas ricas en linfocitos T vírgenes de los órganos linfoides secundarios y presentarles antígenos del CMH. Si los linfocitos T se activan, emigran guiados por quimiocinas al injerto para iniciar el rechazo (Gentileza de la doctora D. Burgos).

## RESPUESTA CELULAR

La teoría celular propone que células mononucleares del receptor (linfocitos T), reconocen como extraños a través de sus receptores, componentes moleculares del donante (antígenos), presentados en moléculas HLA por células especializadas llamadas presentadoras de antígenos (CPA) e iniciar su activación (Fig. 6). Esta respuesta se lleva a cabo por una serie de pasos que aumentan la especificidad para el antígeno y por los que las células T vírgenes se transforman en efectoras. El proceso comienza con la sinapsis inmunológica. Las moléculas de superficie de las CPA y linfocito T en acción forman una estructura supramolecular durante el estímulo antigénico. En esta concentración, el complejo TCR-péptido junto con el correceptor CD4 o CD8 (señal 1) y las moléculas CD28 y B7.1/B7.2 (señal 2) se agregan en la zona central

de la sinapsis, mientras que las moléculas de adhesión ICAM-1 y LFA-1 se localizan en el exterior estabilizando la estructura de la sinapsis. Esta estructura permite concentrar las moléculas del TCR y coestimuladoras en un área de elevada adhesión, lo que facilita la eficacia de la activación del linfocito T<sup>19</sup>.

La señal 2 está formada por las moléculas coestimuladoras<sup>20</sup> de la familia CD28 (CD28, CTLA-4, ICOS, OX40), los ligandos de la familia B7 (B7.1, B7.2, B7-H1, ICOSL, OX40L) y la de las moléculas CD40L (CD154) y CD40. La señal 3 está formada por el receptor de IL-2.

El número de células T que reaccionan frente a un antígeno es muy pequeño, por lo que una respuesta inmunitaria efectiva precisa de una expansión clonal y de la diferenciación de las células T. Ambos procesos requieren de citocinas que son secretadas y actúan de forma auto o paracrina. De ellas, la primera en producirse es la IL-2. Las células T activadas sintetizan la subunidad alfa del receptor de IL-2 (CD25) lo que permite la formación de un receptor totalmente funcionante compuesto de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  que unen IL-2 con alta afinidad, lo que activa las vías de proliferación de la célula T<sup>20</sup>.

Los linfocitos T una vez activados salen de los órganos linfoides secundarios y atraídos por quimiocinas emigran al órgano trasplantado a las zonas en las que se expresan estas citocinas. Por ello en la biopsia (Fig. 1) se aprecia una localización determinada de los linfocitos T<sup>19</sup>.

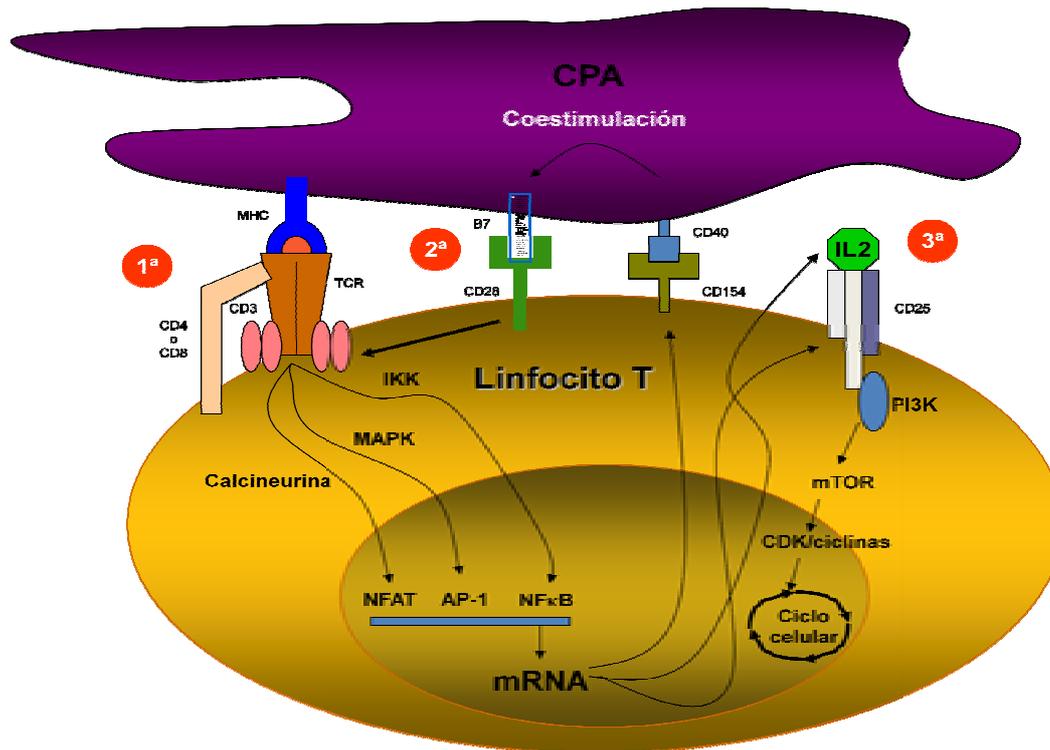


Figura 6. Presentación del antígeno en una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de una célula presentadora de antígenos (CPA) al receptor del linfocito T (TCR) (Señal 1). Coestimulación (Señal 2) y receptor de IL-2 (Señal 3) (Gentileza del Dr. M. López Hoyos).

El linfocito activado tiene un efecto citotóxico sobre las células afectadas a través de la secreción de perforina que polimeriza en la membrana celular formando orificios por los que penetra Granzima B que activa caspasas que provocan en colaboración con Fas y su ligando la fragmentación del DNA y la consecuente apoptosis celular (Fig. 7)<sup>19</sup>.

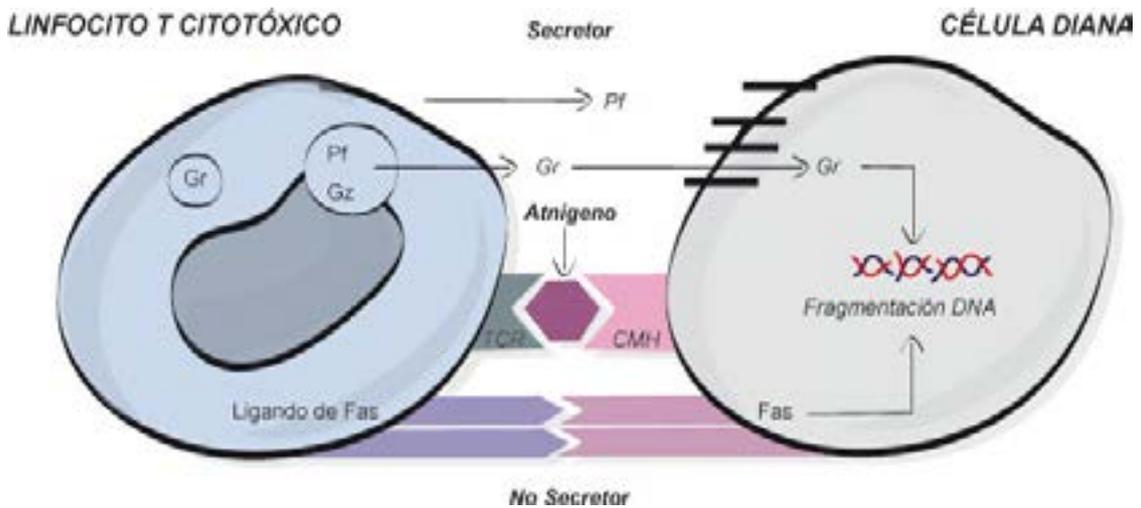


Figura 7. Citotoxicidad mediada por linfocitos T. El efecto citocida de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se produce mediante la secreción de perforina y granzima B (vía secretora) o por la acción de ligando de Fas-Fas (vía no secretora). Ambas provocan la muerte de la célula diana por apoptosis. Cuando el linfocito T CD8<sup>+</sup> reconoce la molécula diana, se une fuertemente a la célula portadora y los gránulos de Perforina se insertan en la membrana de la célula formando canales de polímeros por los que penetra la Granzima B para estimular caspasas que fragmentan el DNA y provocan la muerte de la célula por apoptosis. Pf: Perforina, Gz: Granzima B y Gr: gránulo.

La continuidad de este proceso provoca una desestructuración y destrucción progresiva del injerto (Fig. 8).

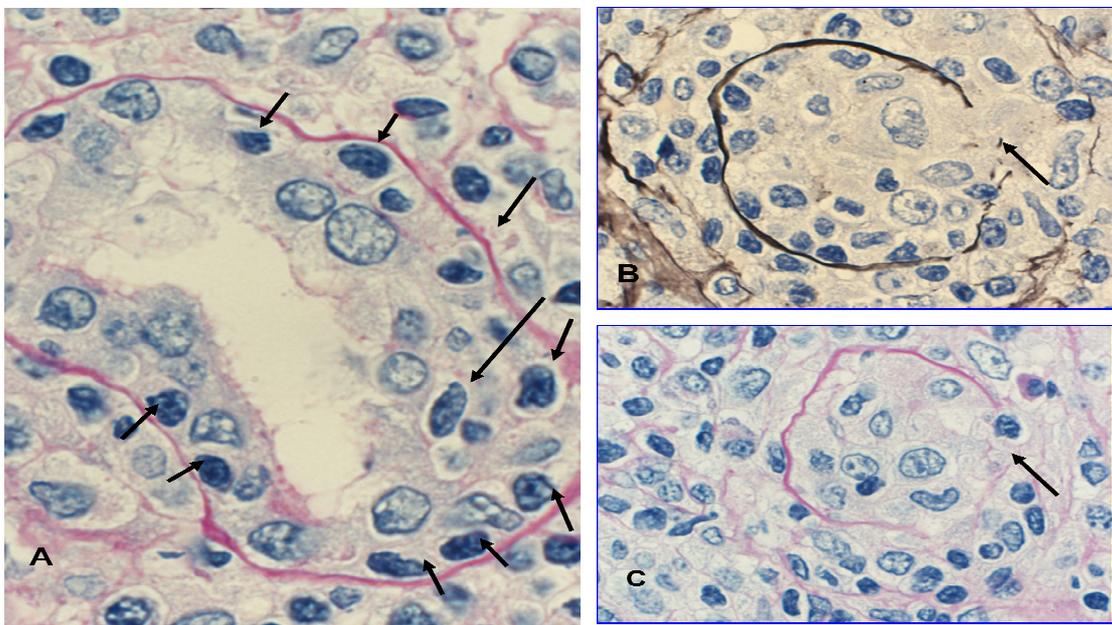


Figura 8. Secuencia de incremento progresivo del daño del injerto (PAS). Las células mononucleares (linfocitos T CD8<sup>+</sup>) emigran desde los capilares tubulares al epitelio tubular atraídas por quimiocinas. A) Infiltrado de células mononucleares en el túbulo renal (tubulitis). B) Infiltrado de células mononucleares con rotura de la membrana basal tubular. C) Destrucción estructural del túbulo renal.

Además, los linfocitos T segregan citocinas y otros factores que reclutan fibroblastos y pericitos, miofibroblastos y fibrocitos que producen matriz extracelular (Fig. 9). El resultado final es una fibrosis generalizada del órgano (Fig. 10).

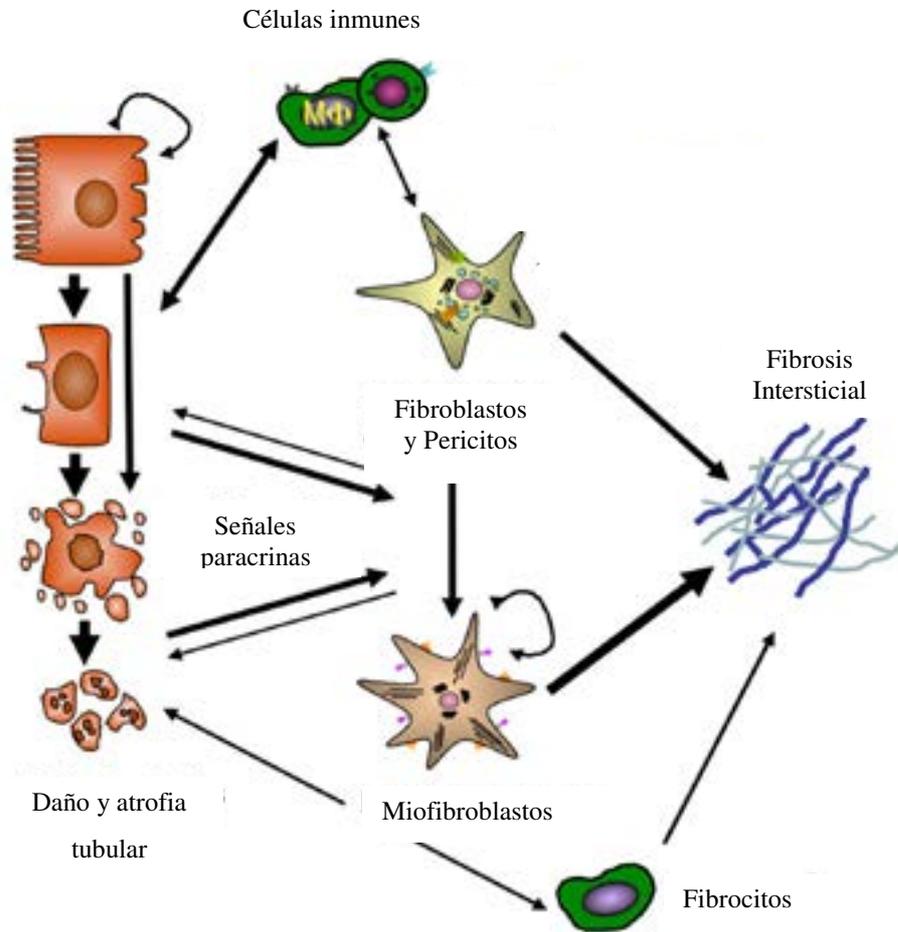


Figura 9. Células inmunes activadas dañan al epitelio tubular, seguida de una respuesta de células inflamatoria que secretan una variedad de mediadores, citocinas y otros factores que estimulan el reclutamiento de otras células de origen mesenquimal, como fibroblastos, pericitos, miofibroblastos y fibrocitos derivados de la transición epitelial a mesenquimal, que segregan proteínas de la matriz extracelular que conduce a la fibrosis intersticial del órgano trasplantado<sup>21</sup>.

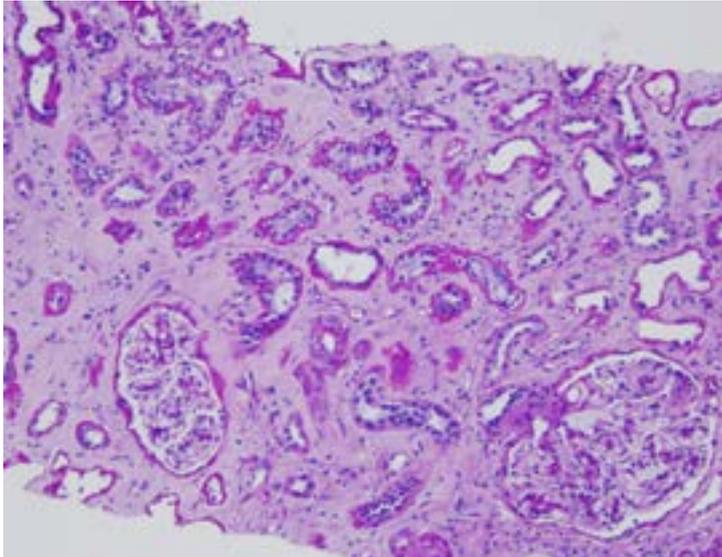


Figura 10. Fibrosis intersticial y atrofia tubular difusas (PAS).

Pero durante muchos años se ignoraron los trabajos experimentales de Gorer, que demostraban la formación de anticuerpos contra antígenos H-2 de histocompatibilidad en 21 de 22 ratones, tras el implante de células alogénicas de sarcoma y en

respuesta a la estimulación antigénica<sup>22-24</sup>; así como a la aportación de Morris, que mostraba ya en 1968 la presencia de anticuerpos citotóxicos después del TR en el hombre<sup>25</sup> y que ello pudiera suponer un mecanismo de daño tisular del órgano trasplantado de fisiopatología distinta al celular.

Hubo que esperar a los inicios de la década del 90, cuando Feucht demostró la presencia de depósitos de C4d en los capilares peritubulares como huella de la activación del sistema del complemento por la acción de anticuerpos anti-HLA<sup>26</sup>. En los años siguientes, los trabajos de Terasaki<sup>27,28</sup> y las sucesivas aportaciones de la clasificación de Banff<sup>29-31</sup> fueron despejando el camino del diagnóstico del RA humoral; y aunque, persisten dudas sobre las vías celular y molecular que regulan el rechazo mediado por anticuerpos, los conocimientos actuales sobre su inmunobiología permiten afirmar que la activación de los linfocitos B inducida por moléculas polimórficas (HLA o no HLA), provoca la formación y secreción de anticuerpos donante específicos (DSA) que lesionan al aloinjerto<sup>32,33</sup>.

## RESPUESTA HUMORAL

La respuesta humoral alogénica se inicia con el reconocimiento de antígenos del aloinjerto por el linfocito B que activado prolifera formando un clon antígeno específico, que secreta anticuerpos y genera células de memoria<sup>33</sup>.

Las vías de activación de los linfocitos B son<sup>34</sup>:

1. Dependiente de células T. Esta vía se produce como respuesta a proteínas HLA o no HLA y requiere la unión del antígeno al receptor y la participación de linfocitos Th, especialmente por medio de las interacciones de CD40 con su ligando.
2. Respuesta a disacáridos (por ejemplo, frente a antígenos A y B del grupo sanguíneo). Se conoce como B-independiente, dado que se genera sin la participación de los linfocitos T.
3. Tipo 1 independiente de células T. Aunque el concepto clásico es que los anticuerpos anti-HLA responsables del rechazo humoral son T dependientes, es evidente que, también, que hay casos de rechazo que no se acompañan de un claro efecto destructivo de los linfocitos T. En este caso, es posible que los linfocitos B sean estimulados directamente por CPAs.

La doble pregunta que se puede hacer es como las células B son estimuladas para generar la respuesta humoral; y a la vez, como su respuesta es controlada. Esto es, al mismo tiempo que se produce la estimulación de células B junto con señales coestimuladoras, antígenos monoméricos solubles suprimen sus funciones. Así, por ejemplo, en el trasplante hepático el injerto puede liberar antígenos solubles que inhiben la respuesta de células B y ello contribuye a los efectos supresores que los injertos hepáticos se cree que tienen en la respuesta aloinmune. Mediante receptores Fc, las inmunoglobulinas y sobre todo los inmuno-complejos inhiben la respuesta de células B. De esta forma, la producción de anticuerpos contra aloantígenos pueden suprimir la respuesta humoral al injerto. El complemento facilita la respuesta de las células B; sin embargo, el fragmento C4b puede inhibirla. Estos datos, aunque

aún no bien comprendidos, hablan a favor de que el conocimiento del mecanismo de control de las células B puede ser la vía para poder controlar la respuesta humoral.

Dado que la activación del linfocito B conduce a la formación y secreción de anticuerpos como arma lesiva, su detección en sangre se ha convertido en la forma de valorar la respuesta humoral. Pero, sorprende que a pesar de que la técnica de su detección se ha perfeccionado<sup>35</sup>, la presencia de anticuerpos contra antígenos HLA sea baja en la primera fase del trasplante, pese a disponer de un tratamiento inmunosupresor más eficaz frente a linfocitos T que a B. Este dato, se ha interpretado por algunos autores como reflejo de la ausencia de respuesta de la célula B al estímulo alogénico<sup>36</sup> y por otros, como la posibilidad de que la respuesta sea más elevada y que los anticuerpos fueran absorbidos y aclarados por el aloinjerto<sup>37</sup>.

Ante esta situación se ha propuesto un procedimiento más directo de valoración de la respuesta humoral alogénica, mediante el cálculo de la frecuencia de células B secretoras de anticuerpos por la técnica de ELISPOT<sup>38</sup>. En un ensayo con este método en receptores de un TR alogénico que ha usado como diana fibroblastos cultivados del donante, en vez de antígenos purificados, se ha demostrado que pese a que ninguno de los nueve pacientes incluidos en el estudio tenía DSA en el suero antes y después del trasplante, todos exhibieron a las ocho semanas post-trasplante un aumento del número de células secretoras de DSA dirigidas contra antígenos HLA de clase I del donante. Lo que apoyaría que la respuesta alogénica humoral sea más frecuente de lo deducido por la detección de anticuerpos en sangre<sup>39</sup>.

La causa por la que no se detecta un mayor porcentaje de pacientes con anticuerpos tras el trasplante de un aloinjerto, es un tema por dilucidar.

## INFRAESTRUCTURA DE LA RESPUESTA HUMORAL

La clasificación de Banff<sup>31</sup> basa el diagnóstico del RA humoral en la presencia de DSA en el suero, en criterios histológicos de daño tisular agudo de la pared vascular (arteritis intimal o transmural y microangiopatía trombótica aguda) y en la interacción de anticuerpos con el endotelio vascular (depósitos de C4d en capilares peritubulares, inflamación microvascular y aumento de la actividad endotelial y de la codificación de transcritos (Fig. 11) de lesión endotelial (ENDATs))<sup>40,41</sup>.

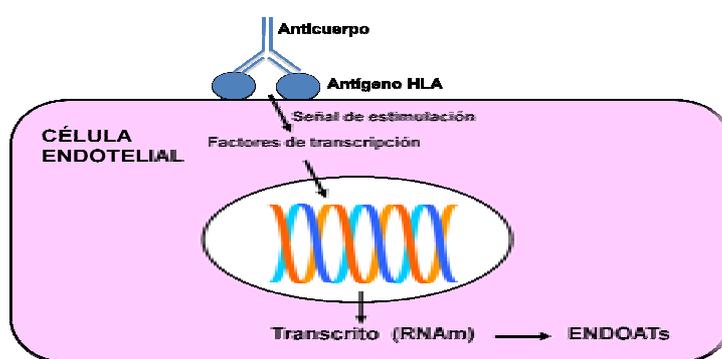


Figura 11. Formación de transcritos de actividad endotelial.

La infraestructura específica de la respuesta inmune que causa estas lesiones histológicas está formada por: linfocitos B, anticuerpos (anti-HLA u otros), células inflamatorias (neutrófilos, monocitos-macrófagos y NK) y el sistema del complemento; y como diana, las células endoteliales.

- 1. Linfocito B.** Es la célula generadora de anticuerpos. Existen dos tipos de linfocitos B generadores de anticuerpos<sup>42,43</sup>. El B1 que reside en la pleura y peritoneo y produce anticuerpos de baja afinidad con independencia de los linfocitos Th; y el B2, que circula permanentemente por los órganos linfoides secundarios hasta encontrar un antígeno que lo active y lo expanda (proliferación clonal). Una vez activado interactúa con el receptor del linfocito Th, para presentarle el antígeno en moléculas HLA de clase II y activarlo. Además, el linfocito B produce citocinas que estimulan a la célula T. De esta forma, el

linfocito B juega un papel destacado en la activación y desarrollo de las células T de memoria<sup>44</sup>.

Los linfocitos B activados forman plasmablastos extrafoliculares que producen anticuerpos de baja afinidad o emigran al centro germinal donde se origina la hipermutación somática de los genes de la región variable de las inmunoglobulinas, el cambio de clase de inmunoglobulina y la generación de células plasmáticas y de memoria que fabrican y secretan anticuerpos IgG. Para que se formen los centros germinales de células B, es necesaria la presencia de los linfocitos T foliculares<sup>45</sup>.

Un dato a destacar, es que en modelos animales<sup>46</sup> y en humanos<sup>47</sup> de trasplante, se ha apreciado la formación de órganos linfoides terciarios en el aloinjerto, lo que sugiere que las células B puedan activarse directamente en el órgano trasplantado.

También, se ha demostrado la existencia de una subpoblación de células B inhibitoras de la respuesta inmune<sup>48</sup>. Esta función reguladora la llevan a cabo por la secreción de IL-10.

- 2. Anticuerpos.** Son glicoproteínas de estructura simétrica de doble cadena pesada y ligera, que forman parte del sistema de defensa contra patógenos. En el TR alogénico, se generan como respuesta a estímulos antigénicos causados por diferencias moleculares polimórficas y se han descrito contra antígenos HLA, MICA, ABO, vimentina, fosfolípidos, proteínas de estrés y receptor AT1 de la angiotensina II en relación con el RA y crónico<sup>49</sup>. Los anticuerpos más frecuentemente generados son los dirigidos contra las moléculas HLA, por ser las más polimórficas y el hecho de expresarse en la membrana de las células endoteliales, las hace muy vulnerables.

Para comprender el papel de los anticuerpos en TR conviene centrar su análisis en los apartados siguientes:



- d. Región Fab. Consta de dos brazos de unión al antígeno. Cada uno de ellos formado, tanto en la cadena pesada como en la ligera, por un dominio variable y otro constante. El variable se llama así porque posee en cada cadena tres segmentos de variabilidad formados por diez residuos de aminoácidos que son los que diferencian anticuerpos producidos por un determinado clon de células B de otro (Fig. 12).

Los tres segmentos variables de las cadenas pesadas y ligeras se unen formando un espacio tridimensional de superficie de unión al antígeno. Dado que esta superficie es complementaria a la zona de unión del antígeno (como la llave y la cerradura), se les llama regiones determinantes de complementariedad (CDRs) o CDR1, 2 y 3. Los de mayor variabilidad y de contacto con el antígeno son los CDR3.

- e. Región Fc. Está formada por dos o tres dominios constantes de la cadena pesada (Fig. 12), según el serotipo de inmunoglobulina (tres para IgM y dos para las restantes) y es la que media las funciones efectoras del anticuerpo al unirse a la fracción C1q del complemento y a células con receptores para la región Fc (FcRs) que poseen una cadena polipeptídica  $\alpha$  de carácter polimórfica que es la que determina la unión a la región Fc.

**3. Células inflamatorias.** La fisiopatología del RA humoral se inicia con la unión de los DSA a antígenos HLA o no HLA del aloinjerto, expresados en la membrana de las células endoteliales. Este proceso va a generar dos vías de atracción y activación de células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y células NK):

- a. Dependiente del complemento. La activación del complemento por anticuerpos citotóxicos unidos a su antígeno HLA de la membrana de células endoteliales, genera las fracciones C3a y C5a que son opsoninas potentes que atraen por gradiente quimiotáctico a células inflamatorias a los capilares peritubulares (Capilaritis) y glomerulares (Glomerulitis), y las activan a través de la interacción con sus receptores afines (C3aR y C5aR) para que segreguen enzimas y citocinas pro-inflamatorias (Fig. 13).

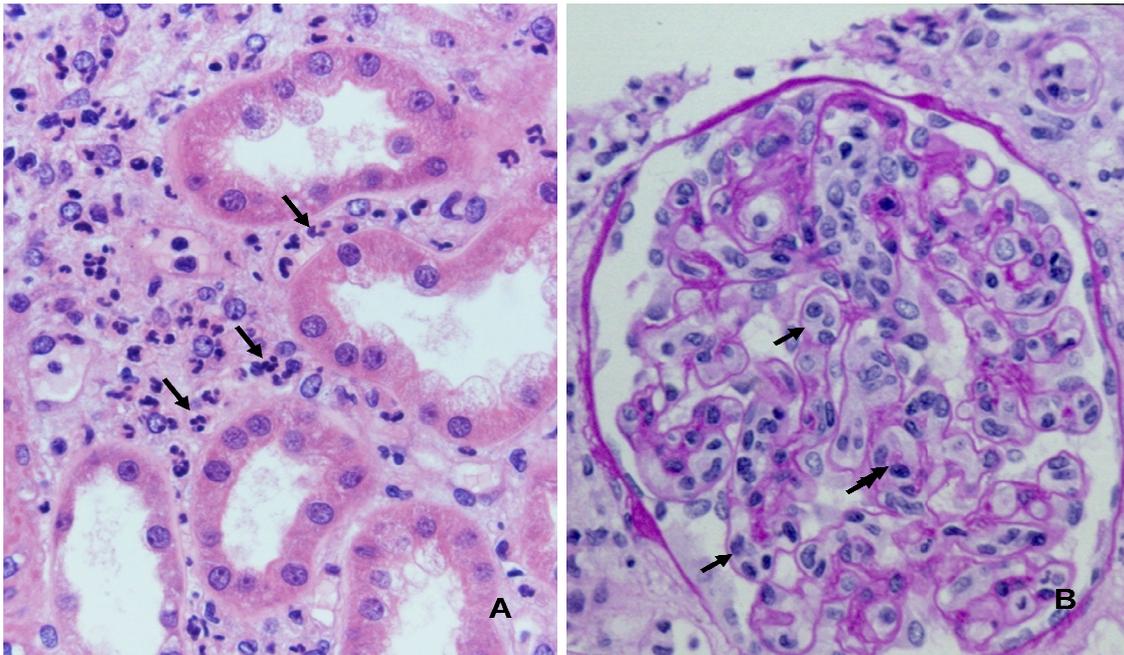


Figura 13. Rechazo agudo humoral. A) Capilaritis. Presencia de células inflamatorias (polinucleares) en capilares peritubulares (HE). B) Glomerulitis. Presencia de células mononucleares (macrófagos) en capilares glomerulares (PAS).

- b. Independiente del complemento. Los anticuerpos de isotipo IgG actúan como ligandos de moléculas de membrana de células endoteliales de los capilares peritubulares y glomerulares y se unen por su dominio CH2 de la región Fc a células inflamatorias que poseen Fc $\gamma$ RIII que inducen lisis celular mediada por anticuerpos (Fig. 12).

Destacar en la citotoxicidad mediada por anticuerpos, el papel de las células NK. Una vez que se unen al dominio CH2 de la región Fc por su Fc $\gamma$ RIIIA, se activan y segregan INF- $\gamma$  y el contenido de sus gránulos con los que provocan la lisis celular.

- 4. **Sistema del complemento.** La activación de la vía clásica del complemento tras un episodio de respuesta humoral al aloinjerto en trasplante de órganos, se inicia con la unión de su primer fragmento C1q al dominio CH2 de la región Fc de inmunoglobulinas de isotipo IgG. Aunque no todas las subclases de IgG lo activan. Sólo la IgG3 e IgG1 (en este orden de intensidad), la IgG2 lo hace débilmente y no tiene

reactividad la IgG4<sup>50</sup>. Esta diferencia viene determinada por el polimorfismo del dominio CH2.

Basándose en estudios de ingeniería de proteínas IgG2b de ratones, se demostró que tres aminoácidos (glicina 318, lisina 320 y lisina 322) localizados en un segmento  $\beta$  de CH2 eran los constituyentes esenciales para unirse al motivo de unión de C1q<sup>51</sup>. Pero la unión no es suficiente para activar el complemento, ya que este motivo está presente en todas las subclases de IgG. Se necesita algo más.

Estudios con mutantes de subclases de IgG han demostrado que la presencia de lisina en la posición 276, muy próxima al motivo de unión de C1q (glicina 318, lisina 320 y lisina 322), es la que confiere a la IgG3 su capacidad para iniciar la activación del complemento y en la IgG1 la presencia de prolina en posición 291. En cambio, IgG4 es incapaz de activar el complemento, pese a unirse a C1q, por la presencia de un residuo de serina en posición 331. Lo que confirma que solo la unión de C1q al dominio CH2 de la región Fc de la inmunoglobulina, no es suficiente para activar el complemento, sino que la presencia de determinados aminoácidos en distintas posiciones en el dominio CH2 de la región Fc determina si el subtipo de IgG lo activa o no<sup>52</sup>.

Los anticuerpos IgG tienen una vida media más larga que otras proteínas debido a que el receptor neonatal de Fc, se une a la IgG después de ser endocitado por la célula y en vez de ser degradado se recicla a la superficie de la célula<sup>53</sup>. Ratones con un déficit del receptor neonatal de Fc tienen una disminución de los niveles circulantes de IgG y una vida media de la inmunoglobulina reducida. La administración de inmunoglobulinas como tratamiento del rechazo humoral, tiene entre otras propiedades la de unirse a los receptores neonatales y saturarlos con lo que inhibe la interacción de los anticuerpos IgG endógenos con el receptor neonatal Fc, lo que favorece su degradación<sup>53</sup>.

Además de la función quimiotáctica, previamente citada, el complemento tiene las funciones siguientes:

- a. Las opsoninas C3b, iC3b y C3d favorecen la lisis celular.
- b. El complejo de ataque a la membrana (C5b-9) lisa células o patógenos opsonizados.
- c. Modelos experimentales han demostrado que la activación incontrolada del complemento aumenta la reactividad de los linfocitos T a través de señales coestimuladoras sobre las CPAs y los linfocitos T del reconocimiento antigénico del aloinjerto<sup>54,55</sup>.
- d. Las fracciones C3a y C5a estimulan la diferenciación de células Th0 en Th1 y la señalización C3aR y C5aR inhibe el desarrollo de células T reguladoras<sup>56</sup>.
- e. Las células del aloinjerto que están opsonizadas por fracciones del complemento tienen una mayor interacción con los linfocitos T, lo que sugiere que la adhesión celular mediada por el complemento puede ser un factor importante de daño tisular mediado por células T<sup>57</sup>.

El inicio de la formación de anticuerpos contra antígenos del aloinjerto depende del complemento<sup>58-60</sup>.

## **CÉLULA DIANA DE LOS ANTICUERPOS**

La célula endotelial constituye la diana de los anticuerpos en la respuesta humoral. Por lo que se puede afirmar que el rechazo humoral es un modelo de disfunción endotelial provocado por anticuerpos.

Las células endoteliales forman una unidad funcional con las del músculo liso y la matriz intersticial subyacente. Controlan el paso de solutos, macromoléculas y células de la sangre a los tejidos. Un proceso regulado por moléculas que aumentan la permeabilidad vascular (histamina, trombina, TNF- $\alpha$ , bradiquinina, etc) o la disminuyen (heparán sulfato, prostaglandinas, catecolaminas, péptido natriurético, estimuladoras de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, etc).

Además, contribuyen al balance hemostático al separar los factores de coagulación del plasma de activadores de la coagulación presentes en la matriz intersticial secretados por las

células del músculo liso. Si el efecto barrera se lesiona, se exponen entre sí, iniciándose un proceso de activación de los factores plasmáticos IX y X por el complejo tisular VIIa; y en respuesta a la trombina, las plaquetas expresan receptores para el factor de von Willebrand y se activa la agregación plaquetaria. Por esta vía, la lesión de la pared vascular termina provocando lo que se conoce como microangiopatía trombótica. El riñón posee una gran superficie de endotelio en los capilares peritubulares y glomérulos, que son los que van a sufrir la lesión más significativa por la acción de los anticuerpos. Las vías de inducción por las que los anticuerpos provocan la lesión de las células endoteliales y del músculo liso permanecen en estudio, aunque las causadas por los anticuerpos de clase I (anticuerpos anti-HLA A, B y Cw) son mejor conocidas que las que provocan los de clase II (anticuerpos anti-HLA DR, DQ y DP).

### **¿POR QUÉ HUBO Y AÚN PERSISTEN DIFICULTADES PARA DIAGNOSTICAR EL RECHAZO AGUDO HUMORAL?**

Las células endoteliales expresan nativamente en su membrana antígenos HLA de clase I y tras estimulación con INF- $\gamma$  de clase II; y el riñón, ofrece una amplísima superficie endotelial en sus capilares peritubulares y glomerulares sobre la que los anticuerpos anti-HLA pueden actuar.

La pregunta es ¿por qué en las enfermedades glomerulares autoinmunes no hubo serias dificultades para demostrar con la biopsia su origen autoinmune y si las hay para diagnosticar el RA humoral? Para contestarla hay que tener en cuenta las diferencias fisiopatológicas y sobre todo el tejido diana y su “turnover”. En las enfermedades glomerulares autoinmunes, además de sus diferencias fisiopatológicas, los inmunocomplejos se localizan en tejidos de bajo turnover; como por ejemplo, el subendotelio en la nefritis lúpica o la membrana basal en el síndrome de Goodpasture y glomerulonefritis membranosa. Tejidos de bajo turnover en los que los inmunocomplejos son retenidos durante largos periodos de tiempo. El suficiente para ponerlos en evidencia en la biopsia renal.

En cambio, en el RA humoral, los anticuerpos se dirigen contra los antígenos HLA de las células endoteliales, que tienen un alto turnover. Si sufren el ataque de la respuesta humoral pueden ocurrir diferentes acontecimientos. Se pueden eliminar rápidamente de su superficie las inmunoglobulinas mediante “lavado” y/o internalización<sup>61,62</sup> (Fig. 14); y también de inhibir, a la vez, la activación del sistema del complemento en estadios precoces del proceso y en los tardíos de degradar sus componentes por la acción de la proteína del cofactor de membrana<sup>63</sup> (MCP), “decay accelerating factor”<sup>64</sup> (DAF) y CD59<sup>65</sup> (Fig. 15). Por ello, la presencia de las proteínas del complemento en la membrana de las células endoteliales es pasajera; y como el comienzo del daño inmunológico precede a los signos clínicos de rechazo, no sorprende que cuando se haga la biopsia no se detecte que el origen de la agresión fue humoral.

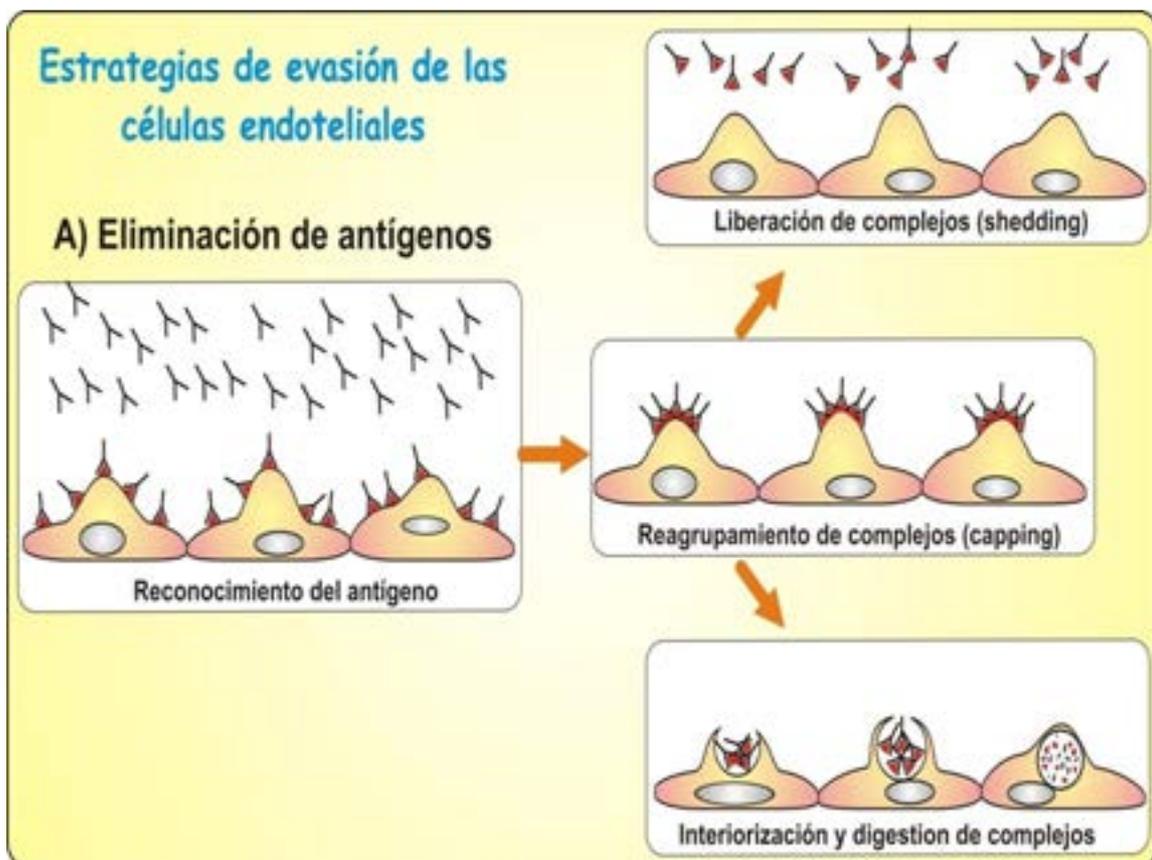


Figura 14. Estrategias de evasión de las células endoteliales de los complejos antígeno-anticuerpos. Los anticuerpos se dirigen contra los antígenos HLA expresados en las células endoteliales, que tienen un alto turnover. Si sufren el ataque de la respuesta humoral pueden eliminar rápidamente de su superficie las inmunoglobulinas mediante “lavado o shedding” y/o internalización (Gentileza del profesor. A. Alonso).

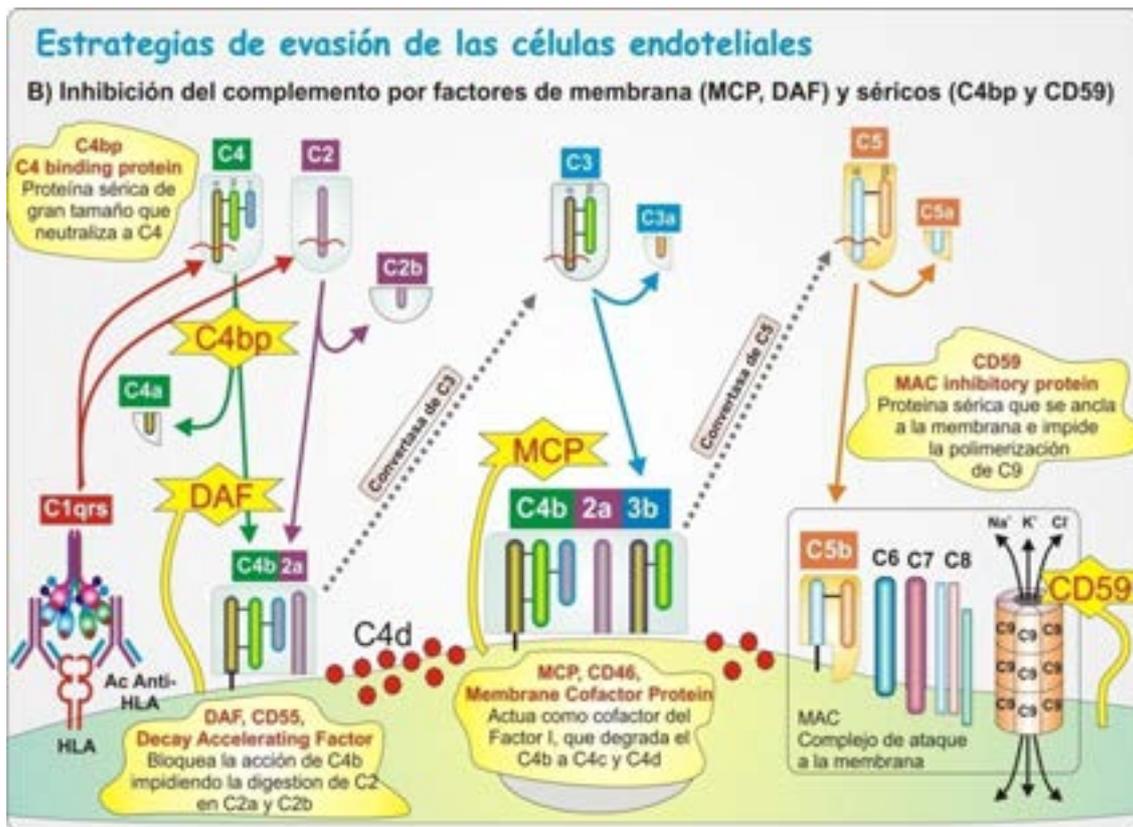


Figura 15. Estrategias de evasión de las células endoteliales del ataque humoral. Reguladores del sistema del complemento. “Decay accelerating factor” (DAF) bloquea la acción de C4b y así impide la digestión de C2 en C2a y C2b. La proteína del cofactor de membrana (MPC) actúa sobre el Factor I que degrada C4b a C4c y C4d. La proteína inhibidora MAC (CD59) se ancla en la membrana e impide la polimerización de C9 (Gentileza del profesor A. Alonso).

Si el complemento se activa queda anclada la fracción C4d en la membrana de las células endoteliales. Esta fracción del complemento se une a las células endoteliales de forma covalente mediante enlace thio-éster para formar una unión estable resistente al “lavado”. Esta es la causa de que el C4d se detecte en biopsias con rechazo agudo humoral. Todo lo contrario de lo que ocurre con el fragmento C4c, que rápidamente se degrada (Fig. 16).

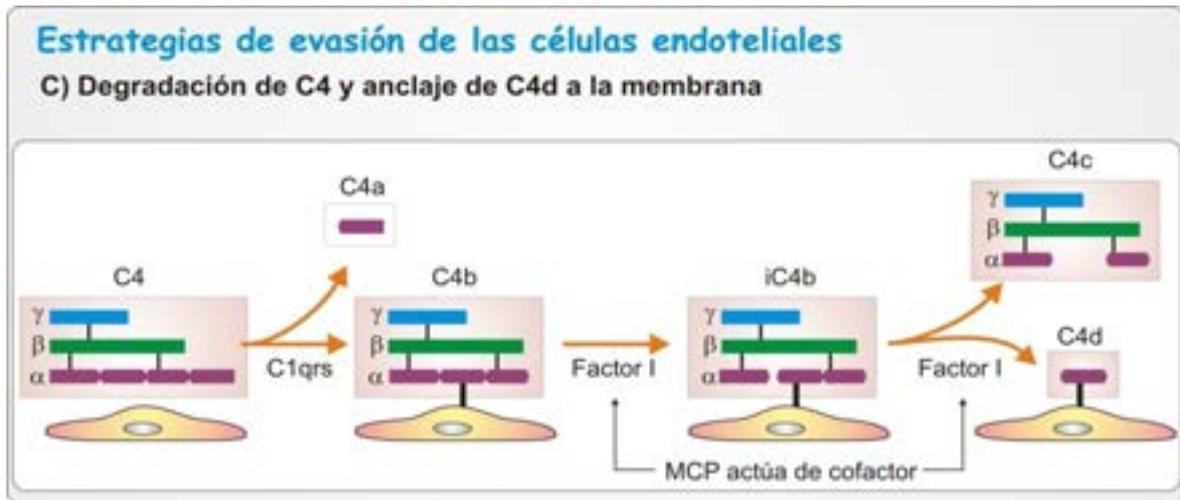


Figura 16. Estrategias de evasión de las células endoteliales. Desaparición del fragmento C4c del complemento y unión estable del fragmento C4d a la membrana de las células endoteliales a través de enlace thio-éster (Gentileza del profesor A. Alonso).

Por ello, el depósito de C4d pudo demostrar la presencia de una respuesta humoral que previamente era indetectable. No obstante, hay que constatar que la última clasificación de Banff considera como dato histológico de RA o crónico humoral, la evidencia de daño endotelial por la interacción de anticuerpos sobre las células endoteliales en pacientes con DSA circulantes<sup>29</sup>. Reconoce, así, la evidencia del rechazo humoral con C4d negativo<sup>31</sup>. Ante esto, el razonamiento ha sido que los anticuerpos actúan sobre las células endoteliales, estimulando la expresión de genes de activación (ENDATs) que generen transcritos que se pueden determinar mediante microarrays. De esta forma, se podría identificar un fenotipo de rechazo humoral con anticuerpos circulantes, pero C4d negativo. Así, riñones con alta expresión en el injerto de ENDATs y anticuerpos citotóxicos anti-HLA en sangre, presentaban lesiones histológicas compatibles con rechazo mediado por anticuerpos. Las conclusiones son: una alta expresión de ENDAT con anticuerpos circulantes predice la pérdida del injerto con alta sensibilidad (77 vs 31%) y una especificidad ligeramente más baja (71 vs 94%) que la presencia de C4d. Sin embargo, la expresión elevada de ENDAT no era un indicador de daño renal o de eventual pérdida del injerto en pacientes con ausencia de anticuerpos anti-HLA<sup>40</sup>.

## IMPACTO CLÍNICO DEL RECHAZO HUMORAL Y DESARROLLO DE DSA.

Aunque estudios realizados en la última década muestran un moderado incremento de la supervivencia del injerto en TR<sup>66,67</sup>, la pérdida a largo plazo persiste a un ritmo no deseado y la causa principal es el daño tisular provocado por anticuerpos anti-HLA<sup>68</sup>. El incremento en la incidencia de rechazo mediado por anticuerpos se debe en gran parte al aumento del número de trasplantes, especificidad de las técnicas que detectan títulos más bajos de DSA e incompatibilidades HLA y ABO<sup>69,70</sup>. Otros autores relacionan el incumplimiento terapéutico<sup>68</sup> y los cambios o reducción de la inmunosupresión como posible causa de la formación de DSA de novo<sup>71</sup>.

El rechazo mediado por anticuerpos; y por tanto el desarrollo de DSA es un fuerte predictor de la pérdida del injerto<sup>72</sup>. En este sentido, el grupo de Loupy et al<sup>73</sup> observó que pacientes con rechazo subclínico mediado por anticuerpos tenían peor supervivencia del injerto a los 8 años (56%) frente aquellos que presentaban rechazo celular (88%) o aquellos sin disfunción inmunológica (90%). Además, el rechazo humoral fue un factor de riesgo 3,5 veces mayor de pérdida del injerto. Coincide con el grupo de Orandi et al<sup>74</sup>, donde la supervivencia del injerto en los pacientes que presentaron rechazo humoral a los 5 años fue del 75,7% frente al 88,4% del grupo control. De igual forma, el rechazo subclínico por anticuerpos supuso un factor de riesgo 2,5 veces mayor de pérdida del injerto. Wiebe et al.<sup>72</sup> describieron que la supervivencia del injerto a 10 años en los pacientes que desarrollaron DSA fue más baja que los que no (57% vs 96%).

La incidencia de DSA es variable en función de la metodología y el punto de corte de MFI utilizada para su detección, pero en series previas el intervalo es del 44,8-8,2%<sup>71-73,75-79</sup>.

Los factores de riesgo asociados a la formación de DSA son: incompatibilidad HLA<sup>71,72,80</sup>, tipo de anticalcineurínico (mayor incidencia con CsA que con TaC)<sup>81-83</sup>, incumplimiento del tratamiento inmunosupresor<sup>72</sup> y el RA celular<sup>72,80,84,85</sup>.

Pese al incremento en los conocimientos patogénicos del rechazo humoral, aún se desconoce cuál es el tratamiento más idóneo para este tipo de disfunción inmunológica. En este sentido, el grupo de Lefaucheur<sup>86</sup> proponen un tratamiento dirigido hacia las células B (Rituximab) y anticuerpos (plasmaféresis e inmunoglobulinas) que mejoran la supervivencia del injerto. Sin embargo, existe otro estudio randomizado que no mostró beneficio con Rituximab frente a la plasmaféresis, inmunoglobulina y corticoides<sup>87</sup>.

Hoy día, una estrategia podría ser la prevención de esta entidad mediante una estrecha monitorización de la formación de anticuerpos anti-HLA<sup>69</sup>. En este sentido, para el clínico es vital conocer qué pacientes tienen riesgo de formación de anticuerpos anti-HLA y distinguir, una vez formados, aquellos con potencial efecto deletéreo. Los datos actuales sugieren como variables determinantes la activación de la fracción C1q del complemento y el subtipo de IgG<sup>88,89</sup>.

Actualmente, el progreso ha sido evidente, pero quedan cuestiones por resolver, como por ejemplo, ¿por qué hay pacientes que histológicamente tienen lesiones típicas de RA humoral y no se detectan DSA circulantes? Es posible que anticuerpos no anti-HLA intervengan en estos casos. Esto abriría un nuevo campo dirigido a una mayor sensibilidad de las técnicas de detección de anticuerpos o la búsqueda de nuevas moléculas polimórficas causantes de la respuesta humoral, como el receptor tipo 1 de la angiotensina 2 en TR o la vimentina en trasplante cardíaco<sup>90,91</sup>.

### **ANTICUERPOS Y LESIONES HISTOLÓGICAS EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO**

Los anticuerpos citotóxicos en el trasplante de órganos causan daño endotelial por (Fig. 17):

1. Activación del sistema del complemento.
2. Acción directa.
3. Reclutamiento de células inflamatorias vía receptores Fc (inmunidad celular mediada por anticuerpos).

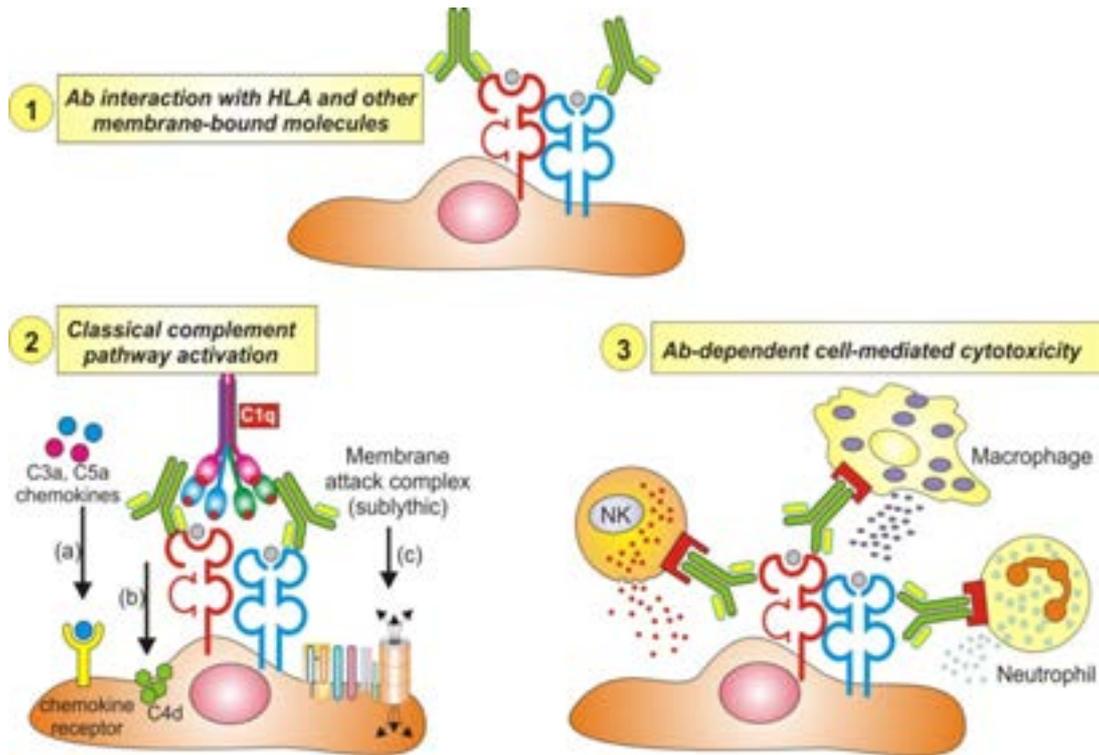


Figura 17. Mecanismo de daño endotelial por anticuerpos donante específicos. 1) La interacción de anticuerpos con antígenos HLA de las células endoteliales genera un aumento de la expresión de receptores de fibroblastos que estimulados incrementan la proliferación celular o se produce resistencia a la lisis por el complemento con la formación de factores antiapoptóticos (BCL-2, BCL-XL y CD59). 2) Activación de la vía clásica del complemento. Formación del complejo de ataque a la membrana, aumento de la expresión de moléculas de adhesión que inducen adherencia leucocitaria, formación de los factores C3a y C5a que atraen a la zona leucocitos por quimiotaxis, pérdida de la barrera endotelial que activa la coagulación y liberación de citocinas y quimiocinas que favorecen la proliferación celular. 3) Citotoxicidad mediada por anticuerpos y receptores para Fc. Las células inflamatorias se unen por su Fc $\gamma$ RIII al anticuerpo. Una vez activadas liberan su contenido de gránulos que lesionan el endotelio provocando capilaritis y/o glomerulitis (Gentileza del profesor A. Alonso).

### 1. Activación del sistema del complemento.

a. **Rechazo hiperagudo.** Es el ejemplo más demostrativo de daño endotelial severo en el trasplante alogénico, inducido por anticuerpos preformados que activan el complemento por la vía clásica.

Una vez que se desclaman los vasos del aloinjerto y la sangre comienza a fluir en el órgano trasplantado, los anticuerpos se unen a los antígenos HLA de clase I expresados en la membrana de las células endoteliales de glomérulos y microvasos. Se activa el complemento y el injerto toma de inmediato una textura flácida y un color moteado azulado que habitualmente es consecuencia de un daño irreversible.

Datos experimentales sugieren las secuencias fisiopatológicas siguientes:

- La membrana de las células endoteliales está recubierta de una capa de heparán sulfato. Este proteoglicano mantiene un ambiente local anticoagulante al activar la antitrombina III, que es un potente inhibidor de la formación de trombina. Además, participa en la regulación de la impermeabilidad de la barrera endotelial al paso de células y moléculas al formar parte de la unión entre células endoteliales y de su citoesqueleto; y además, por su carga eléctrica rechaza de la superficie endotelial los factores de coagulación del plasma.
- Datos experimentales han mostrado que la exposición de células endoteliales porcinas a anticuerpos naturales humanos xenoreactivos, provoca la liberación progresiva de heparán sulfato de su superficie mediada por “cleavage” enzimático del corazón de la proteína y/o de las cadenas del glucosaminoglicano. Por el contrario, el supernadante de células endoteliales expuesto durante cuatro horas a suero humano contenía un proteoglicano intacto o en fragmentos, posiblemente reflejando vesiculación o lisis celular. La “cleavage” y secreción de proteoglicano por las células endoteliales estaba producido por la unión de anticuerpos naturales a las células endoteliales y activación del complemento<sup>92</sup>.
- La pérdida de heparán sulfato se acompaña de alteraciones de la forma y del citoesqueleto de las células que interrumpen la integridad monocapa y conducen a la formación de huecos intercelulares que permiten el paso de células y moléculas. Datos que provocan que en la biopsia se vea edema y hemorragia intersticial<sup>93</sup> (Fig. 18).

La pérdida del efecto barrera del endotelio expone entre sí el complejo tisular VIIa intersticial y los factores plasmáticos de la coagulación IX y X que se activan; y en respuesta a la trombina, las plaquetas expresan receptores para el factor de von Willebrand y se activa la agregación plaquetaria. El final del proceso es la microangiopatía trombótica (Fig. 18).

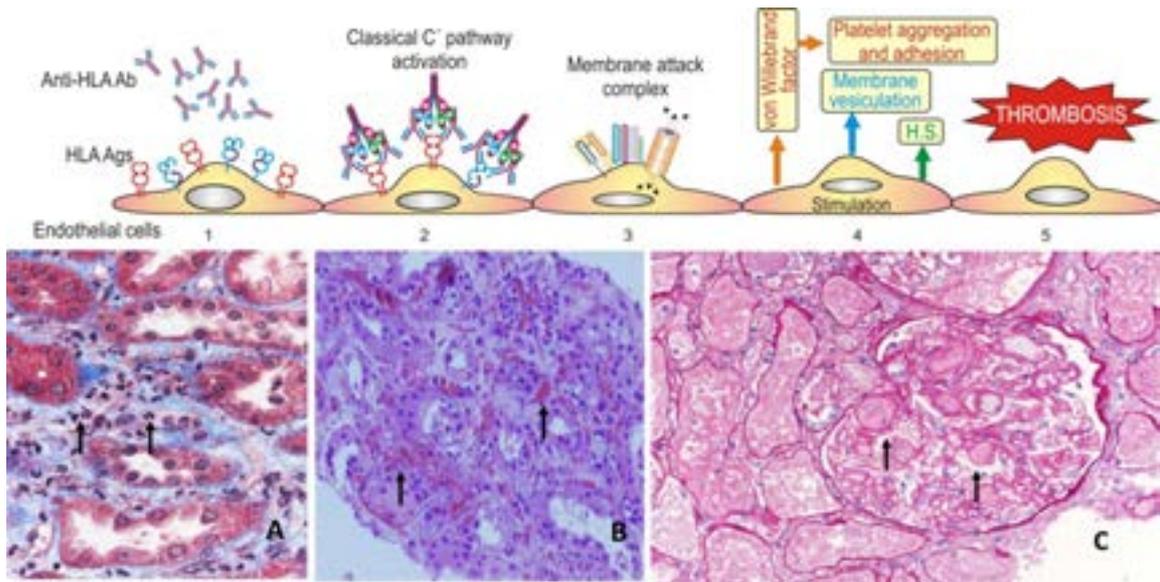


Figura 18. Secuencia de acontecimientos del rechazo hiperagudo. Tras el implante del injerto, anticuerpos preformados de clase I se unen a antígenos HLA expresados en las células endoteliales. Activación del sistema del complemento con la formación del complejo de ataque a la membrana. Activación y lesión de células endoteliales con vesiculización y pérdida de heparán sulfato de la membrana, secreción por exocitosis del factor de von Willebrand, aumento de la adhesión y agregación plaquetaria. Trombosis.

- Los túbulos reciben oxígeno y elementos nutrientes a través de los capilares peritubulares; y como efecto de la lesión vascular, se produce la necrosis de las células epiteliales tubulares y la continuidad del proceso conduce a la necrosis tisular.

La presencia de células inflamatorias, especialmente neutrófilos, en los capilares peritubulares (capilaritis) y glomérulos (glomerulitis) se debe al efecto quimiotáctico de los factores C3a y C5a del complemento que son opsoninas muy potentes que atraen a estas células al foco de la lesión, donde segregan citocinas pro-inflamatorias (Fig. 13).

**b. Rechazo agudo humoral.** Promovido por una respuesta humoral de memoria generada por exposición previa a antígenos HLA u otros, aportados por el aloinjerto y expresados en el endotelio de los capilares peritubulares y glomerulares<sup>27,94,95</sup>.

Aparece a los pocos días del trasplante y si el paciente recibe inducción con anticuerpos anti-linfocitarios, su aparición se retrasa en semanas<sup>96</sup>. Se genera por la respuesta de

memoria a una exposición previa a antígenos HLA en la fase precoz del TR y en la tardía, generalmente, por incumplimiento del tratamiento inmunosupresor<sup>68</sup> (Fig. 19).

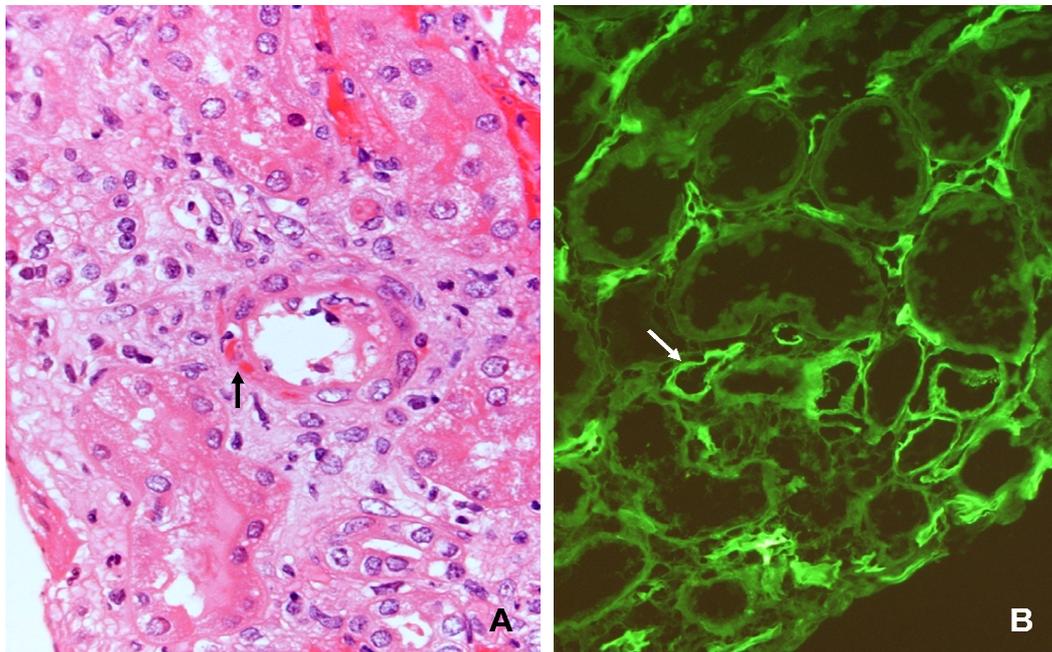


Figura 19. Rechazo humoral agudo. A) Arteritis transmural (Necrosis fibrinoide de la pared vascular) (HE). B) Depósito de C4d en los capilares peritubulares (Inmunofluorescencia).

Desde el punto de vista del pronóstico existen claras diferencias entre el RA humoral y el hiperagudo. Éste, generalmente irreversible y el agudo no. Sin embargo, los participantes son los mismos (DSA y células endoteliales). Las células endoteliales tienen las mismas características en ambos casos. La diferencia está en los anticuerpos. En el rechazo hiperagudo son preformados, generalmente activadores del complemento, de alta concentración y con una gran afinidad por su aloantígeno. En cambio, la disminución de la expresión de estas cualidades desencadenará un episodio de rechazo de menor severidad y estaremos frente al rechazo agudo. Lógicamente la escala no es tan simple, pero en estos momentos es imposible una explicación más amplia, ya que entre otras dificultades, no se puede medir la concentración ni la afinidad de los anticuerpos aloespecíficos.

## 2. Acción directa, independiente del complemento

En este caso, los anticuerpos causan daño tisular directo al actuar como agonistas de antígenos expresados en la membrana de las células endoteliales e inducir señales intracelulares pro-inflamatorias y proliferativas, tanto en el RA como en el crónico.

La lesión más genuina de esta vía de actuación de los anticuerpos es la **vasculopatía del trasplante** (Fig. 20). Una lesión obliterativa de los vasos del injerto provocada por la proliferación e hiperplasia de las células endoteliales y del músculo liso que disminuye el calibre del vaso y causa daño isquémico y deterioro progresivo de la función renal.

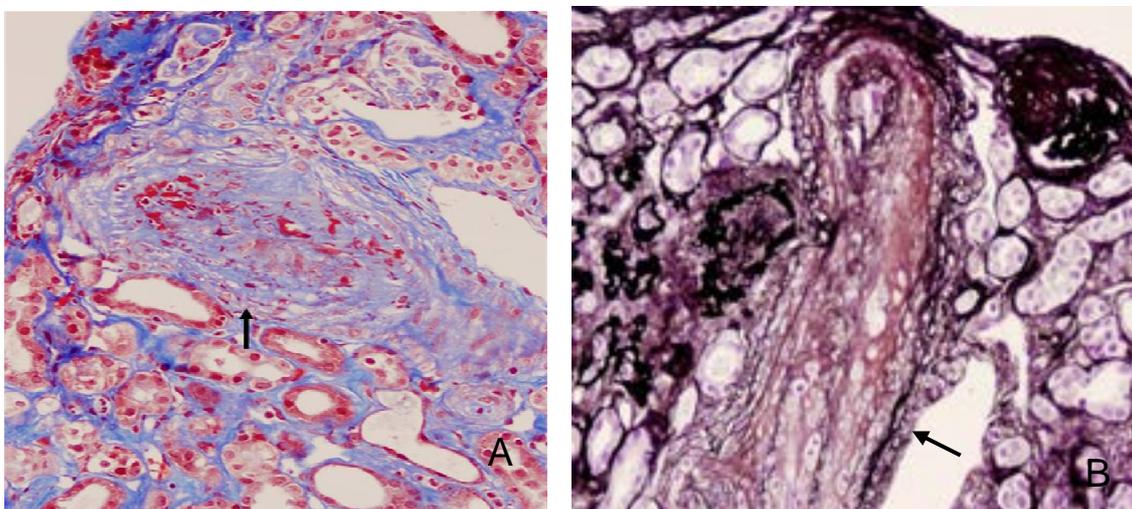


Figura 20. Vasculopatía del trasplante. Proliferación miointimal con oclusión vascular. A) Tetrómico de Masson. B) Metenamina plata.

Su fisiopatología puede resumirse así: los anticuerpos anti-HLA de clase I se unen como ligandos a los antígenos HLA expresados en las células endoteliales para inducir la estimulación de la vía mTOR y la fosforilación de la cinasa S6 (S6K) y de la proteína ribosomal S6 (S6RP) que promueven la síntesis de proteínas y la proliferación celular<sup>97,98</sup>.

Estos datos se han reproducido en un modelo experimental de trasplante cardíaco murino de incompatibilidad en el CMH, con la administración continuada de anticuerpos de clase I. La cantidad de anticuerpos suministrada se correlaciona con el aumento de fosforilación de S6K y de S6RP en las células endoteliales de los capilares del injerto. Una situación similar a la ocurrida en el trasplante cardíaco humano con rechazo mediado por anticuerpos en el que la

fosforilación de S6RP en biopsias de endocardio se asocia con la presencia de anticuerpos circulantes<sup>99</sup> (Fig. 21).

Además, los anticuerpos que actúa como agonistas de los antígenos HLA de clase I inducen la expresión de receptores del factor de crecimiento de los fibroblastos con una intensidad dependiente del nivel que alcanzan en sangre. En este caso, la vía celular inducida es la señal MEK-ERK que estimula la proliferación de células endoteliales<sup>100</sup> (Fig. 21).

El efecto de los anticuerpos de clase II es menos conocido, aunque datos actuales sugieren que la proliferación celular, se produce a través de la vía de activación de S6 y S6RP<sup>97</sup>.

Estudios recientes, sugieren que las células NK juegan un papel destacado en la regulación de la aceptación o rechazo del aloinjerto<sup>101</sup>. Su papel no se limita a lo descrito hasta ahora de “killing” y producción de citocinas, sino que pueden tener un papel destacado en el desarrollo de la vasculopatía del trasplante. En un modelo en el que DSA eran infundidos en ratones inmunodeficientes Rag<sup>-/-</sup> que eran trasplantados con un corazón contra el que los DSA eran dirigidos, se ha reproducido la vasculopatía del injerto, en un tiempo de cuatro semanas.

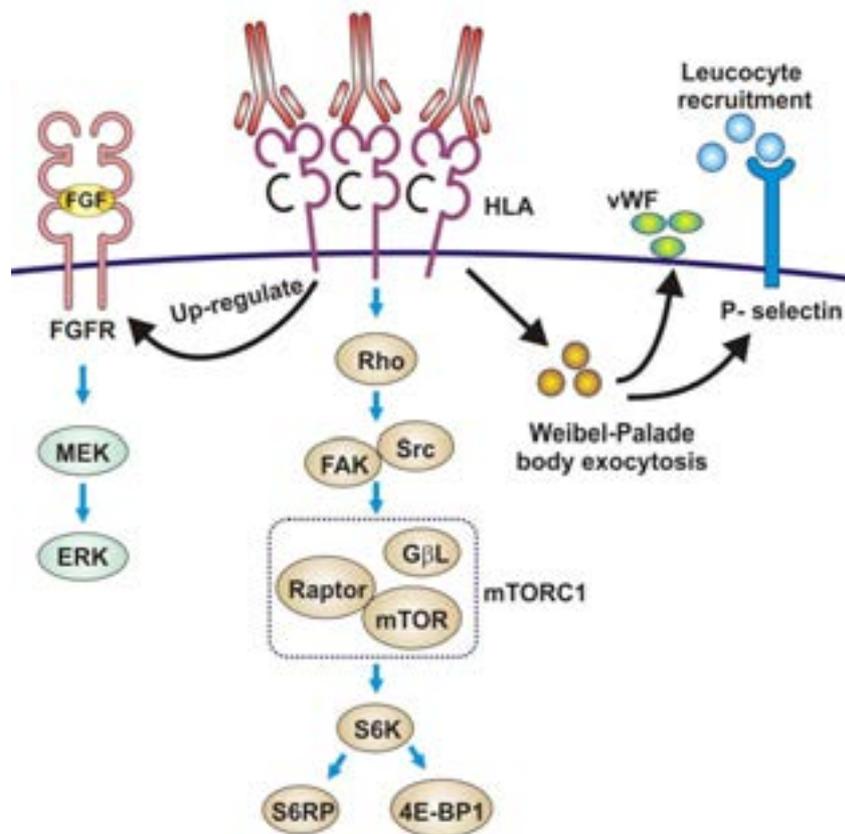


Figura 21. Fisiopatología de la vasculopatía crónica del trasplante. La unión antígeno-anticuerpo genera: 1) Incremento de la expresión de receptores de fibroblastos, que activan la vía MEK/ERK and AP-1 and NF- $\kappa$ B que inducen proliferación celular. 2) Los cuerpos de Weibel-Palade secretan su contenido en factor de von Willebrand y P-selectina que favorece el reclutamiento de leucocitos. 3) Estimulación de la vía Rho que induce la síntesis de proteínas y la proliferación celular<sup>97</sup>.

Mecanismo de acción de las células NK en el desarrollo de la vasculopatía del injerto. Las células NK se unen por sus receptores FcR al dominio Fc del anticuerpo y se activan segregando citocinas proinflamatorias que inducen la proliferación de las células endoteliales y del músculo liso<sup>102,103</sup>. Las conclusiones del estudio son:

- Las células NK son necesarias para el desarrollo de las lesiones vasculares del injerto; de hecho, ratones deplecionados de células NK o genéticamente deficientes de células NK (Rag<sup>-/-</sup> mice) no desarrollan vasculopatía del trasplante.
- La infusión de fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> de DSA, falló para inducir vasculopatía del trasplante.

- c. No es necesaria la participación del complemento. La vasculopatía del trasplante se puede inducir con anticuerpos no fijadores de complemento y en ratones Rag<sup>-/-</sup> con déficit de C3 en los que el complemento está inhibido.

Otros autores sugieren que la valoración del inmunofenotipo de las células NK puede contribuir a definir señales de la respuesta humoral aloreactiva en receptores de un TR<sup>104</sup>.

### **3. Reclutamiento de células inflamatorias vía receptores Fc (inmunidad celular mediada por anticuerpos)**

Las células endoteliales activadas por anticuerpos expresan moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, que promueven la adhesión de células inflamatorias<sup>37</sup> que activan la exocitosis de los cuerpos Weibel-Palade mediada por la activación de los canales del calcio y que están formados por gránulos que contienen mediadores pro-trombóticos, tales como el factor de von Willebrand y la P-selectina (Fig. 17). Además, el factor C5a del complemento incrementa significativamente la exocitosis de los cuerpos de Weibel-Palade inducidos por los anticuerpos. Crosslinking de HLA parecen ser críticos en la estimulación de la exocitosis, porque solo el bivalente F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo de clase I W6/32 es efectiva en marcar la exocitosis. El ligamiento de moléculas del CMH de clase I por anticuerpos, también conduce a una producción, dosis dependiente, de la proteína-1 quimiotáctica de los monocitos y del oncogen  $\alpha$  relacionado con el factor quimiotáctico de los neutrófilos que atrae a los macrófagos al injerto<sup>105</sup>.

### **GLOMERULOPATIA DEL TRASPLANTE**

Se trata de una entidad de definición histológica, relacionada con DSA de vías moleculares de inducción no bien conocidas<sup>106</sup>. Junto a la vasculopatía del trasplante es la entidad más representativa del rechazo crónico.

La histología se caracteriza por (Fig. 22):

1. Multilaminación y doble contorno de la membrana basal, expansión de la matriz mesangial y glomerulitis (Microscopía óptica-PAS y tinción de plata).
2. Pérdida de la fenestración endotelial, inflamación de las células endoteliales y expansión de la matriz mesangial (Microscopía electrónica).
3. Depósitos de IgM y C3, con C4d positivo en proporción variable (Inmunofluorescencia).

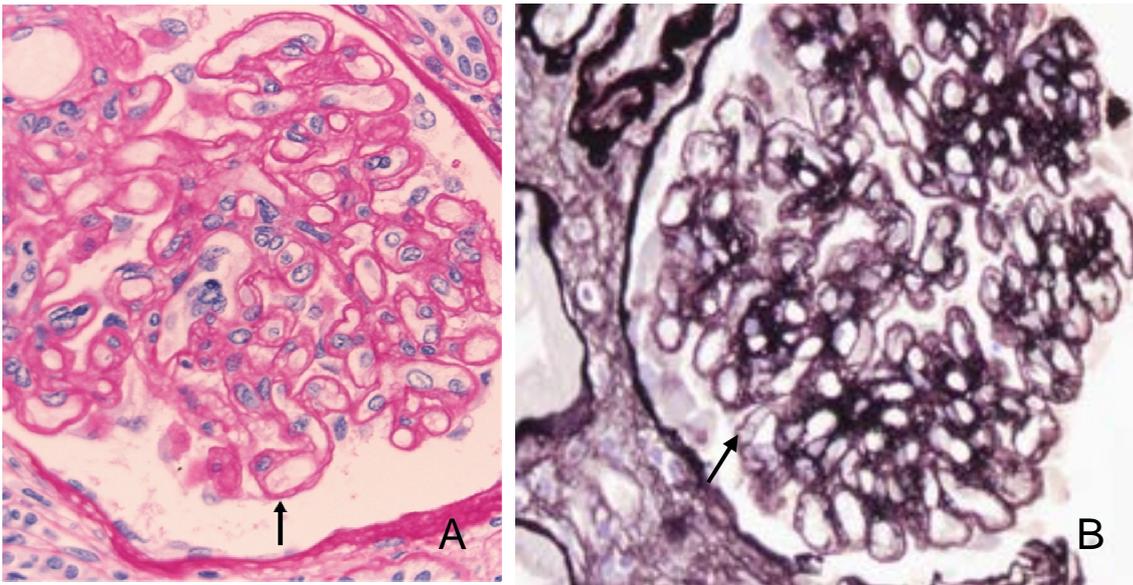


Figura 22. Glomerulopatía del trasplante. Duplicación diseminada de la membrana basal glomerular. A) PAS. B) Metenamina plata.

Factores de riesgo son: la edad del paciente, presencia de DSA, RA previo y serología positiva para virus C. En su fisiopatología intervienen DSA de clase I y II, pero más frecuentemente de clase II, tanto DP como DR y DQ. Aunque se ha considerado que los DQ tienen un mayor riesgo de glomerulopatía del trasplante<sup>107</sup>, no todos los autores están de acuerdo con esta teoría y llegan a afirmar que no hay diferencias entre los DSA DP, DR y DQ<sup>108,109</sup>. Se desconoce por qué la glomerulopatía del trasplante (GT), está relacionada con anticuerpos de clase II<sup>72,110</sup>.

Dado que alrededor de la mitad de los pacientes no presentan anticuerpos anti-HLA se ha sugerido la implicación de otras etiologías y entre las que destacan la microangiopatía trombótica y la hepatitis C<sup>111</sup>.

## **Papel del C4d en el diagnóstico de la glomerulopatía del trasplante**

Los datos actuales sobre los depósitos de C4d como marcador de rechazo humoral en la GT se pueden resumir en los apartados siguientes:

1. La presencia de depósitos de C4d en el glomérulo se ha interpretado como un dato útil para su diagnóstico<sup>112</sup>.
2. Hay una fuerte asociación entre la GT y la presencia de anticuerpos anti-HLA circulantes y depósitos de C4d en los capilares peritubulares<sup>113</sup>.
3. En pacientes con anticuerpos circulantes pueden detectarse depósitos de C4d en los glomérulos y no en los capilares peritubulares. En este caso, el depósito de C4d debe valorarse con cortes en parafina, ya que por congelación es posible encontrar en glomérulos normales la presencia periférica de depósitos de C4d<sup>114,115</sup>.
4. La detección de depósitos de C4d varía en las series publicadas y según la técnica empleada. Dado que la lesión crónica por anticuerpos se produce en ondas, es posible que los depósitos de C4d se produzcan en los periodos de pico.
5. Ante la problemática que plantean los depósitos de C4d se ha propuesto el concepto de rechazo humoral C4d negativo, para los casos que la microscopía óptica muestre glomerulitis y capilaritis.

## **ANTICUERPOS NO HLA EN EL RECHAZO HUMORAL**

Se han descrito una plétora de moléculas polimórficas no HLA asociadas con rechazo humoral agudo y crónico. Pero la ausencia de disponibilidad de ensayos comerciales impide su diagnóstico. Terasaki sugiere que en los casos con C4d positivo sin la demostración de anticuerpos anti-HLA circulantes, se debe tener en cuenta esta posibilidad<sup>116</sup>.

Entre ellos, hay que destacar a:

1. Antígenos MICA. Los antígenos polimórficos CMH de la cadena A relacionados con los de clase I (MICA), que se expresan en las células endoteliales se han implicado en la patogénesis del rechazo hiperagudo, agudo y crónico del aloinjerto; aunque hasta ahora, ninguno de los estudios en los que se implique a los anticuerpos MICA mostrara pruebas de especificidad contra el donante<sup>49</sup>.
2. Receptor AT1 de la angiotensina II. En pacientes con pre-eclampsia con convulsiones e hipertensión arterial severa, se han detectado en el suero anticuerpos agonistas del receptor AT1 de la angiotensina II<sup>117</sup>. Basándose en estos datos, se analizó si receptores de un TR con rechazo vascular refractario al tratamiento y con hipertensión arterial severa tenían anticuerpos agonistas del receptor AT1 de la angiotensina II. De 20 casos, 16 presentaban estos anticuerpos IgG de las subclases IgG1 e IgG3. Estudios in vitro de estimulación de células endoteliales por medio de anticuerpos contra el receptor AT1 indujo la fosforilación de la cinasa ERK y aumentó la actividad de unión al DNA de los factores de transcripción AP-1 and NF-kB, lo que provocó un aumento de la expresión de citocinas proinflamatorias, de genes procoagulantes y de proliferación celular. Además, en un modelo de TR en ratas, la administración de anticuerpos contra el receptor AT1 de la angiotensina II provocaba vasculopatía que era prevenida con la administración de losartan<sup>91</sup>.
3. Vimentina. Es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de células embrionarias, sanguíneas y del endotelio de vasos coronarios. Los monómeros de vimentina se enrollan entre sí formando parte del soporte de los orgánulos intracelulares (mitocondrias, retículo endoplásmico, etc). Se ha descrito como elemento inductor de la enfermedad coronaria después del trasplante cardíaco<sup>90</sup>.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

El RA humoral ha sido el gran desconocido durante algo más de cuatro décadas en TR, pese a la evidencia de que el receptor con anticuerpos preformados contra antígenos HLA del donante, rechazaba el injerto de forma inmediata. En este caso, la histología mostraba daño endotelial generalizado por microangiopatía trombótica con infarto cortical. La interpretación dada era que se trataba de una lesión provocada por anticuerpos preformados y no como consecuencia de la respuesta alógena contra el órgano trasplantado. Además, la histología del RA habitual mostraba, en general, un infiltrado de linfocitos T; y por ello, se interpretó que eran las células reguladoras y efectoras del RA del injerto. La conclusión fue que el RA estaba provocado por células inflamatorias.

En los inicios de la década del 90 Feucht demostró, la presencia de depósitos de C4d en los capilares peritubulares como huella de la activación del sistema del complemento por la acción de anticuerpos anti-HLA que lesionaban gravemente el endotelio. En años posteriores, se evidenció que los anticuerpos también producían daño tisular a través del reclutamiento de células inflamatorias vía receptores Fc (inmunidad celular mediada por anticuerpos).

Los trabajos de Terasaki y las sucesivas clasificaciones de Banff fueron despejando el camino del diagnóstico del RA humoral y crónico y se añadieron nuevas posibilidades terapéuticas que suponían efectividad frente a un RA de peor pronóstico que el celular. Pero pese a los avances logrados, persisten muchas dudas sobre las vías celular y molecular que regulan la formación de anticuerpos, los mecanismos del daño tisular y los factores de riesgo que desencadenan su formación. Ello ha provocado que el rechazo humoral sea un objetivo de investigación de primer nivel en trasplante de órganos.

### **Hipótesis de trabajo**

El estudio parte del desconocimiento actual sobre aspectos tan importantes en el trasplante de órganos sólidos, como el análisis de los factores de riesgo que provocan la formación de DSA. Así mismo, sería crucial dilucidar el papel que juegan en la formación de DSA y en el RA humoral, la dosis y variabilidad de los niveles plasmáticos de los ICN.

Finalmente queda por aclarar las vías patogénicas del impacto de los DSA sobre la histología del injerto, una cuestión que se debate entre la activación del sistema del complemento y la inmunidad celular mediada por anticuerpos.

## Objetivos del estudio

Los objetivos primarios son:

1. Analizar la incidencia de formación de DSA en la población trasplantada en el Hospital Regional Universitario de Málaga en un estudio retrospectivo de 591 receptores de un TR de donante cadáver, de vivo y de riñón-páncreas realizados en los años 2008-2012 con un seguimiento hasta el 30 de Junio de 2014.
2. Describir la naturaleza de los DSA (anti-HLA de clase I [A, B] o II [DR y DQ]) y su evolución en el tiempo.
3. Identificar los factores de riesgo de formación de anticuerpos anti-HLA DSA.
4. Determinar la incidencia del rechazo humoral agudo y crónico y su impacto en la supervivencia del injerto.
5. Identificar los factores de riesgo del rechazo humoral.
6. Valorar la intensidad de la fluorescencia media y la fijación de C1q como métodos de diferenciación de anticuerpos que provocan daño tisular de aquellos que no.
7. Evaluar el coeficiente de variabilidad de niveles en sangre del inmunosupresor básico usado (TaC) como factor de riesgo de formación de DSA y de rechazo humoral.

Los objetivos secundarios son:

1. Analizar el impacto del RA humoral en la función renal medida por la creatinina sérica y el aclaramiento de creatinina (método CKD-EPI).
2. Determinar si el RA humoral agudo tiene impacto en la supervivencia de pacientes.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# III. MATERIAL Y MÉTODOS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y POBLACIÓN DE PACIENTES

Estudio de cohortes, observacional, longitudinal, retrospectivo y analítico que incluye todos los pacientes con TR (donante Cadáver, Vivo y R-P) desde el 1 de Enero del 2008 al 31 de Diciembre del 2012 en el Hospital Regional Universitario de Málaga, con seguimiento hasta el 30 de Junio del 2014. La información clínica se recogió de forma prospectiva en todos los pacientes incluidos en una base de datos diseñada para tal fin, que se actualizaba anualmente.

Se excluyeron los pacientes trasplantados de Riñón-hígado (n=2) durante este periodo. El número total de pacientes incluidos es de 591.

## 2. VARIABLES CLÍNICAS

Se recogieron los siguientes parámetros clínicos y demográficos:

### a. Donante:

- Edad (años).
- Sexo (Hombre/Mujer).
- IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).
- Causa de Muerte (TCE, ACV, Vivo y Otras).
- Grupo Sanguíneo (A, B, AB y 0).
- Serología Viral (CMV, VHC).
- Comorbilidad (Diabetes, HTA y Ambas).

### b. Receptor:

- Edad (años).
- Sexo (Hombre/Mujer).
- IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).
- Enfermedad de Base (Glomerular, PQR, Intersticial, Diabetes, Nefroangiosclerosis, Familiar, Otras y No filiada).
- Retrasplante (Si/No).
- TIF (horas).

- TSV (min).
- TLE (meses).
- Tipo de Diálisis (HD, CAPD → HD, HD → CAPD y CAPD).
- FRI (Si/No).
- Serología Viral (CMV, VHB, VHC).
- Comorbilidad Pre-trasplante (HTA, Diabetes, Ambas y Dislipemia).
- Tratamiento Inmunosupresor (TAC+P+MMF, CsA+P+MMF y Otros) (Ver Anexo A).
- Tratamiento de Inducción (Basiliximab, Timoglobulina y No Inducción).
- Retirada de Esteroides (Si/No).
- Conversión mTOR (Si/No).
- Re-conversión ICN (Si/No).
- PRA Virtual (%).
- Ac. Anti-HLA (%).
- DSA (%).
- Tiempo Aparición DSA (meses).
- DSA anti-HLA Clase I (%).
- DSA anti-HLA Clase II (%).
- Activación C1q (%).
- MFI acumulada.
- MFI máxima.
- Rechazo Humoral (Si/No).
- Tipo Rechazo Humoral (Agudo y Crónico).
- Rechazo Agudo Celular (Si/No).
- Tipo de Rechazo Agudo Celular (Bordeline, IA, IB, IIA, IIB y III).

- Causa de pérdida de Injerto (Injerto nunca funcionante, RA, FIAT, Poliomavirus BK, Muerte Injerto Funcionante, Abandono Inmunosupresión y Otras).
- Causa de Éxitus (Cardiovascular, Tumoral, Infecciosa, Hepatopatía, Otras y Desconocida).
- Creatinina Sérica (mg/dL) al 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 meses postrasplante.
- CKD-EPI (mL/min/1.73 m<sup>2</sup>) al 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 meses postrasplante.

### 3. DEFINICIÓN DE VARIABLES

- Función Retrasada del Injerto: Se define como la necesidad de diálisis durante la primera semana postrasplante, una vez excluidos el rechazo hiperagudo o acelerado, trombosis vascular y obstrucción urinaria.
- Rechazo Agudo Celular: Se define como aquellas características anatoma-patológico de la biopsia que siguiendo la Clasificación de BANFF-2013(Anexo B) las define como Rechazo Agudo Celular y el subtipo correspondiente.
- Rechazo Humoral: Se define como aquellas características anatoma-patológico observadas en la biopsia que concuerda con Rechazo Humoral en la clasificación de BANFF-2013 (Anexo B). Todas las biopsias fueron reclasificadas siguiendo la clasificación de BANFF-2013.
- Fallo del Injerto: Se define como la vuelta a diálisis o muerte del paciente.
- Incompatibilidad HLA: Suma de antígenos no compartidos en los loci A, B, DR y DQ entre el donante y receptor del CMH.
- Pacientes Hiperinmunizados: Aquellos con un PRA $\geq$ 50%.
- Isquemia Fría: Periodo de tiempo transcurrido desde el clampaje vascular en el donante al descampaje en el receptor en horas.
- Tiempo en Lista de Espera: Periodo de tiempo transcurrido desde la inclusión en la lista de espera al trasplante en meses.

- Anticuerpos Anti-HLA Donante Específicos: Formación de anticuerpos anti-HLA específicos frente a antígeno del donante.
- Función Renal: Determinada por el aclaramiento de creatinina por el método Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI).

#### **4. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA**

La monitorización de los anticuerpos anti-HLA se realizó mediante el ensayo Luminex y la tecnología X-MAP. Todos los pacientes fueron evaluados para determinar la presencia en muestras de sueros obtenidas al tiempo del trasplante, primer, tercer, sexto mes, anualmente y en el caso de RA.

Antes del trasplante se determinó en todos los pacientes los anticuerpos anti-HLA por el ensayo Luminex Mixed (One Lambda®), el cual detecta la presencia de anticuerpos frente a los antígenos HLA-clase I y clase II. En los casos positivos, se determinó la especificidad de dichos anticuerpos por el ensayo Luminex *Single Antigen*. (One Lambda®) en la plataforma Luminex™100.

El suero en estudio se incubó con las microesferas LABScreen. Los productos LABScreen emplean microesferas recubiertas con antígenos HLA de Clase I o Clase II purificados y reactivos optimizados previamente para detectar anticuerpos frente al HLA de Clase I (A, B y Cw) o Clase II (DR y DQ) en suero humano. Los anticuerpos frente al HLA presentes en el suero en estudio se unen a los antígenos en las microesferas y se marcan con anti-IgG humana de cabra conjugada con r-ficoeritrina (PE). Los analizadores de flujo LABScan™100 detectan simultáneamente la emisión de fluorescencia de PE y la identificación de cada microesfera mediante la combinación de dos colorantes, lo cual permite adquirir los datos prácticamente en tiempo real.

Si los pacientes no presentan anticuerpos anti-HLA pre-TR, la monitorización de estos anticuerpos se realizó mediante el ensayo Luminex Mixed (One Lambda®). Cuando este ensayo

fue positivo en alguna de las determinaciones establecidas, se realizó el ensayo Luminex Single Antigen (One Lambda®) para detectar las especificidades.

Por el contrario, los enfermos que tuvieron un Luminex Mixed (One Lambda®) positivo pre-TR, se realizó sólo el ensayo Luminex Single Antigen (One Lambda®) en todas las visitas.

Todas las determinaciones con una intensidad media de fluorescencia (MFI) >1500 fueron consideradas positivas <sup>118</sup>.

En el Anexo C se describe pormenorizadamente el procedimiento.

## **5. ACTIVACIÓN DE C1q**

En aquellos pacientes en los que se detectó DSA, se utilizó las muestras de suero (200µl) para realizar el ensayo C1qScreen™ (One Lambda®) para detectar la activación de C1q. C1qScreen™ (One Lambda®) se utilizó con una mezcla de microesferas revestida de HLA para detectar anticuerpos anti-HLA de unión al complemento en suero humano. Las microesferas HLA-revestidas de LABScreen® y las microesferas del complemento humano C1q control positivo fueron incubadas con el suero problema y el complemento humano C1q. Los anticuerpos HLA se unieron a los antígenos de destino seguido de la unión de C1q a los anticuerpos. C1q PE-conjugado anti-Humano se usa como un informador, que indica la presencia de unión al complemento de los anticuerpos.

Las microesferas se analizaron usando un LABScan100™. La intensidad de fluorescencia media en LABScan100™ indica la cantidad relativa de anticuerpo unido a la muestra de ensayo. Un cambio de fluorescencia significativo indica una reacción positiva. El programa HLA FUSION™ ayudó en la asignación de especificidad HLA mediante comparación del perfil de reactividad del código de antígenos unidos a cada microesfera.

El procedimiento pormenorizado se describe en el Anexo D.

## 6. CÁLCULO DEL PRA VIRTUAL

Para la determinación del PRA virtual se utilizó el programa elaborado por el laboratorio de referencia de Eurotransplant (<https://www.etr1.org/Virtual%20PRA/Default.aspx>) para los laboratorios de HLA y especialistas para definir los porcentajes del Panel Reactivo de anticuerpos (PRA).

Las especificidades HLA utilizadas en este programa son de donantes de órganos trasplantados en la zona Eurotransplant (N=4000). Para los diferentes países participantes fueron seleccionados 1000 donantes. En general, el usuario puede seleccionar un país, pero también tiene la posibilidad de seleccionar todo Eurotransplant. Este último caso fue el utilizado para la determinación del PRA virtual.

El cálculo se realizó para HLA de clase I (A, B y Cw) y clase II (DR y DQ).

Si un paciente reacciona hacia varios antígenos HLA, se introducían éstos separados por una “;” en la especificidades y se pulsaba en el botón “Calcular % PRA”. En el cuadro “Positivo” se encuentra el número de donantes para los antígenos (cada donante se cuenta una vez), en “Donantes” el número total de donantes que entró en el análisis y, finalmente, el valor de % de PRA aparece en el cuadro “PRA”.

Esto se realizó a todos aquellos pacientes en los que aparecieron especificidades HLA en cada uno de los momentos del estudio (Pre-TR, 1, 3, 6 meses y anualmente)

## 7. COEFICIENTE DE VARIABILIDAD DE NIVELES EN SANGRE DE TACROLIMUS

### Cohorte Rechazo Humoral:

Se realizó un sub-estudio de casos y controles (1:2) de la cohorte de pacientes trasplantados entre 1 de enero 2008 y 31 de diciembre de 2012 que presentaron Rechazo Humoral durante el periodo de seguimiento (hasta el 30 junio del 2014), con un total de 21 pacientes. Los pacientes del grupo control fueron aleatorizados y agrupados por edad, sexo y

año de trasplante. Se excluyeron del análisis aquellos pacientes que tomaron fármaco anti-TOR en el momento del suceso.

Aunque existen diferentes métodos para el cálculo del coeficiente de variabilidad<sup>119-121</sup>, se ha usado el definido previamente por la National Institute of Statistics and Economic Studies (Insee) (<http://www.insee.fr/en/methodes/default.asp?page=definitions/coefficient-de-variation.htm>).

Por tanto, el CV empleado fue:

$$CV (\%) = \frac{DE}{\mu} \times 100$$

Dónde:

CV≡ Coeficiente de Variabilidad.

DE≡ Desviación Estándar de los niveles de TaC.

μ≡ Media de los niveles de TaC.

Para ello se seleccionaron 5 mediciones de los niveles de TaC anteriores a la fecha del Diagnóstico de RA humoral, salvo en tres pacientes que tuvieron un RA humoral precoz y solo se disponían de 3 niveles en sangre. Para el grupo control se siguió el mismo criterio.

#### Cohorte DSA:

Se realizó un segundo sub-estudio de casos y control (1:2) de una cohorte de pacientes trasplantados entre 1 de enero 2008 y 31 de diciembre de 2012 que presentaron DSA durante el periodo de seguimiento (hasta el 30 junio del 2014), con un total de 51 pacientes, de los que 21 tuvieron rechazo humoral. Los pacientes del grupo control fueron aleatorizados y agrupados por edad, sexo y año de trasplante. Se excluyeron del análisis aquellos pacientes que tomaron fármaco anti-mTOR en el momento del suceso.

## 8. INMUNOSUPRESIÓN

El tratamiento inmunosupresor por intención de tratar fue con TaC+MMF/AMF+P con o sin inducción con anticuerpos monoclonales anti-CD25 o anticuerpos policlonales (Timoglobulina) para receptores de R-P o hiperinmunizados.

Solo un pequeño número de pacientes (1,8 %) recibieron una inmunosupresión distinta que incluye CsA o un fármaco anti-mTOR por su inclusión en protocolos de investigación.

En los pacientes que desarrollaron tumores o poliomavirus BK, TaC fue sustituido por un fármaco anti-mTOR (EVE o SRL).

En el Anexo A se adjunta el Protocolo de Inmunosupresión utilizado en el centro.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información se procesó en una base de datos elaborada específicamente para ello. La depuración, re-codificación de variables y el análisis estadístico fue realizado con el uso del software IBM SPSS versión 20.0® para Windows.

Para la descripción de variables cuantitativas se realizó la media (medidas de centralización) y desviación estándar (medidas de variabilidad). En el caso de las variables cualitativas se usaron frecuencias relativas. Se realizó el análisis de la normalidad para todas las variables utilizando el test de **Kolmogorov-Smirnov**. Para la comparación de variables cuantitativas entre grupos se usaron pruebas paramétricas (**t-Student** o **ANOVA**) o no paramétricas (**Mann-Whitney** o **Kruskal-Wallis**) según procediera. Para la comparación entre grupos de variables cualitativas se realizó la prueba **Chi-Cuadrado** o **Test de Fisher**, si la distribución de los datos sigue la normalidad o no.

El **ANOVA de medidas repetidas** determinó la variabilidad de las distintas determinaciones a lo largo del tiempo de estudio. Se realizó el **test de Bonferroni** para determinar entre cuales determinaciones hubo diferencias significativas.

Se realizó análisis de **Regresión Logística** multivariante para determinar factores asociados a la aparición de DSA y rechazo humoral en los pacientes trasplantados.

La supervivencia fue analizada para un tiempo de trasplante máximo de 6 años, con la pérdida del injerto y del paciente como evento de interés. Los datos de supervivencia del injerto fueron censurados para la muerte. La tasa de supervivencia del injerto renal fue trazada en las curvas de **Kaplan-Meier** y la comparación de las variables con el uso del **test Log-Rank**.

Se aplicaron modelos de riesgos proporcionales, **de Cox**, para estimar los factores de riesgo asociados a la pérdida del injerto y del paciente. Se realizó un análisis parsimonioso de la regresión de Cox con todas las variables para la supervivencia del paciente y del injerto. En él, se van eliminando las variables cuya presencia no mejora el modelo, generando un modelo más preciso y válido.

Se realizaron curvas **ROC** para mostrar el poder predictivo y discriminatorio del coeficiente de variabilidad a través del área bajo la curva para los pacientes que presentaron DSA y para los que presentaron Rechazo humoral. Se determinó el **Índice de Youden** para determinar el punto en el que el coeficiente de variabilidad es más predictivo y discriminatorio.

Se consideró diferencias estadísticamente significativas aquellos valores que fueran inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## **10. PROTECCIÓN DE PACIENTES**

La revisión de historias clínicas se llevó a cabo según la ley española de confidencialidad, Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del hospital y se llevó a cabo de acuerdo a los principios de buena práctica clínica y de la declaración de Helsinki.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## IV. RESULTADOS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## ANÁLISIS GLOBAL DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

El estudio incluyó 591 receptores de un TR de donante cadáver (n=502), de vivo (n=37) y de R-P (n=52) realizados en el Hospital Regional Universitario de Málaga desde el 1 de Enero del 2008 hasta el 31 de Diciembre del 2012 con seguimiento hasta el 30 de Junio de 2014.

### **1. DATOS DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS**

#### **a. Donantes**

El análisis global mostró una edad media de  $50,9 \pm 16,2$  años con predominio del sexo masculino (54,4%). La causa principal de éxitus fue el ACV (63,8%), seguido por TCE (19,5%) y otras causas (10,5%).

La tabla 1 muestra los datos demográficos y características clínicas por tipo de trasplante. No hubo diferencia significativa entre la edad de donantes de cadáver y de vivo, pero sí entre la de éstos y la de donantes de R-P. Algo similar se observó con el IMC. Destaca, la elevada tasa de muerte por ACV (70,1%) del donante en el TR de cadáver. Aunque en el trasplante combinado de R-P la causa de muerte del donante por ACV fue del 48,1%, hay que señalar que fueron de donantes jóvenes con rotura de aneurisma cerebral.

Es de destacar, la elevada tasa de comorbilidad por hipertensión arterial (36,1%), diabetes mellitus (15,2%) y de ambos procesos (10,4%) en el donante de cadáver. De hecho, la incidencia de donantes con criterios expandidos fue 45,2% (n=227), con injertos renales seleccionados por biopsia y tratados con un protocolo de inmunosupresión específico (Anexo A).

**Tabla 1. Datos demográficos y características clínicas de los donantes.**

	<b>Cadáver (n=502)</b>	<b>Vivo (n=37)</b>	<b>Riñón-Páncreas (n=52)</b>	<b>p</b>
Edad del Donante (años)	53,0±15,8	48,6±9,6	32,2±10,7	<0,001
Sexo (H) %	55,7	43,2	50,0	0,274
Raza (%)				
Caucásico	97,2	94,6	100,0	0,418
Negra	0,8	-	-	
Otras	2,0	5,4	-	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,9±4,1	26,7±4,2	24,0±2,7	<0,001
Causa de Éxito (%)				
ACV	70,1	-	48,1	<0,001
TCE	19,3	-	34,6	
Otras	10,6	-	17,3	
Grupo Sanguíneo (%):				
A	44,0	32,4	42,3	0,626
B	8,6	8,1	5,8	
AB	4,0	-	5,8	
0	43,4	59,5	46,2	
Serología Viral (%)				
CMV	68,5	64,9	63,5	0,906
VHC	1,0	-	-	0,297
Cormobilidad (%)				
HTA	36,1	-	-	<0,001
Diabetes	15,2	-	-	<0,001
HTA + Diabetes	10,4	-	-	0,007

H: hombre. IMC: índice de masa corporal. ACV: accidente cerebrovascular. TCE: traumatismo craneoencefálico. CMV: citomegalovirus. HTA: hipertensión arterial.

### **b. Receptores**

Los receptores en el análisis global tuvieron una edad media de 50,1±13,8 años con predominio del sexo masculino (63,5%). La enfermedad de base más frecuente fue la glomerular (21,3%), seguida por no Filiada (19%), Diabetes (17,7%) y PQR (15,5%). Un 13,9% de los pacientes fueron retrasplantes. El 34,0% presentaron FRI. El TIF medio fue de 14,3±5,0 horas.

**Tabla 2. Datos demográficos y características clínicas de los receptores (N=591).**

	<b>Cadáver (n=502)</b>	<b>Vivo (n=37)</b>	<b>Riñón-Páncreas (n=52)</b>	<b>P</b>
Edad del Receptor (años)	51,8±13,6	42,2±13,4	39,3±7,0	<0,001
Sexo (H) (%)	63,5	51,4	71,7	0,160
Raza (%)				
Caucásico	92,2	94,6	88,5	
Negra	1,2	-	-	0,334
Magrebí	4,8	2,7	11,5	
Otras	1,8	2,7	-	
IMC(Kg/m <sup>2</sup> )	26,1±4,2	24,7±4,3	23,7±3,3	<0,001
Enfermedad de Base (%)				
Glomerular	22,8	29,7	-	
PQR	17,0	16,2	-	
Intersticial	9,6	13,5	-	
Diabetes	9,8	8,1	100,0	<0,001
Nefroangioesclerosis	7,4	2,7	-	
No Filiadas	21,2	16,2	-	
Otras	7,8	2,7	-	
Familiar	4,2	10,8	-	
TLE (meses)	39,1±32,2	21,4±36,4	15,3±18,8	<0,001
Tipo de Diálisis (%)				
HD	86,3	51,4	67,3	
HD-CAPD	0,6	-	-	<0,001
CAPD	10,4	5,4	-	
CAPD-HD	2,4	2,7	1,9	
Prediálisis	0,4	40,5	30,8	
Retrasplante (%)	14,3	18,9	5,8	0,154
FRI (%)	39,4	2,9	5,8	<0,001
TIF (horas)	15,5±3,8	0,9±0,8	12,9±2,5	<0,001
TSV (min)	36,5±10,0	29,5±6,9	38,8±7,7	<0,001
Serología Viral (%)				
CMV	85,7	85,7	76,9	0,530
VHB	0,8	-	-	0,124
VHC	3,0	2,7	-	0,418
Cormobilidad (%)				
HTA	64,3	83,3	90,4	<0,001
Diabetes	13,0	5,4	100,0	<0,001
HTA+Diabetes	8,6	5,4	90,4	<0,001
Dislipemia	46,3	58,1	65,2	0,028

H: hombre. IMC: índice de masa corporal. PQR: poliquistosis renal del adulto. TLE: tiempo en lista de espera. HD: hemodiálisis. CAPD: diálisis peritoneal ambulatoria continua. FRI: función retrasada del injerto. TIF: tiempo de isquemia fría. TSV: tiempo de sutura vascular. CMV: citomegalovirus. VHB: virus hepatitis B. VHC: virus hepatitis C. HTA: hipertensión arterial.

La tabla 2 mostró las características clínico-demográficas de los receptores en función del tipo de trasplante. Se observó una diferencia significativa en la edad entre los receptores que reciben un TR de donante cadáver, vivo y R-P; así como, en el IMC, TLE, incompatibilidad HLA, FRI y TIF.

Las causas más frecuentes de insuficiencia renal fueron las de origen glomerular (22,8%) y la PQR (17%). Destacar que el porcentaje de pacientes en prediálisis previo al trasplante fue elevado en los casos de donante vivo y R-P. El tipo de diálisis más frecuente fue la hemodiálisis.

Los receptores de un trasplante combinado de R-P tuvieron una mayor comorbilidad, reflejada por una mayor incidencia de HTA y de dislipemia (Tabla 2).

## **2. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR**

El 98,1% de los pacientes recibieron triple terapia inmunosupresora TaC+MMF+P por intención de tratar. El tratamiento de inducción predominante fue Basiliximab (51,7%), seguido por Timoglobulina (29,2%). La Tabla 3 muestra el tratamiento inmunosupresor en función del tipo de TR. La inmunosupresión predominante usada por intención de tratar fue el TaC+MMF+P, seguido por CsA+MMF+P. Los pacientes con trasplante de donante vivo recibieron mayoritariamente anticuerpos monoclonales anti-CD25; por el contrario, los enfermos con trasplante R-P recibieron anticuerpos policlonales. Suprimieron los esteroides: TR cadáver (17,8%) y vivo (18,9%), en un plazo medio de  $10,7 \pm 13,9$  meses.

De los 591 enfermos 53 (9,0%) fueron convertidos a un fármaco anti-mTOR, como sustituto de MMF o de TaC, por la presencia de tumor, nefropatía por poliomavirus BK o ensayo clínico. De los 53 pacientes, se reconvirtieron al tratamiento por intención de tratar el 16,7% de donante cadáver y el 33,3% de R-P.

**Tabla 3. Tratamiento inmunosupresor.**

	Cadáver (n=502)	Vivo (n=37)	Riñón-Páncreas (n=52)	P
Tratamiento Inmunosupresor (%)				
TaC+MMF+P	97,8	100,0	100,0	0,919
CsA+MMF+P	1,4	-	-	
Otros	0,8	-	-	
Tratamiento de Inducción (%)				
Basiliximab	55,1	78,4	-	<0,001
Timoglobulina	23,1	10,8	100,0	
No Inducción	21,8	10,8	-	
Retirada de Esteroides (%)	17,8	18,9	1,9	0.012
Conversión mTOR (%)	10,0	8,1	5,8	0,591
• SRL+MMF+P	56,0	0,0	100,0	
• EVE+MMF+P	4,0	66,7	-	0,003
• TaC+SRL+P	28,0	33,3	-	
• TaC+EVE+P	12,0	-	-	
Reconversión Anticalcineurínicos (%)	16,7	-	33,3	0,549

TaC: tacrolimus. MMF: micofenolato mofetilo. P: prednisona. SRL: sirólimus. EVE: everolimus.

La dosis de TaC se estableció según niveles en sangre, que a lo largo del tiempo fue descendiendo hasta mantenerse en valores de 6-7,5 ng/ml a partir de los 6 meses de evolución postrasplante en los receptores de un TR de donante cadáver o vivo y moderadamente más elevados en los trasplantados de R-P (Fig. 23). El análisis de medidas repetidas mostró que este descenso fue significativo desde el primer mes postrasplante hasta el final del seguimiento ( $p<0,001$ ).

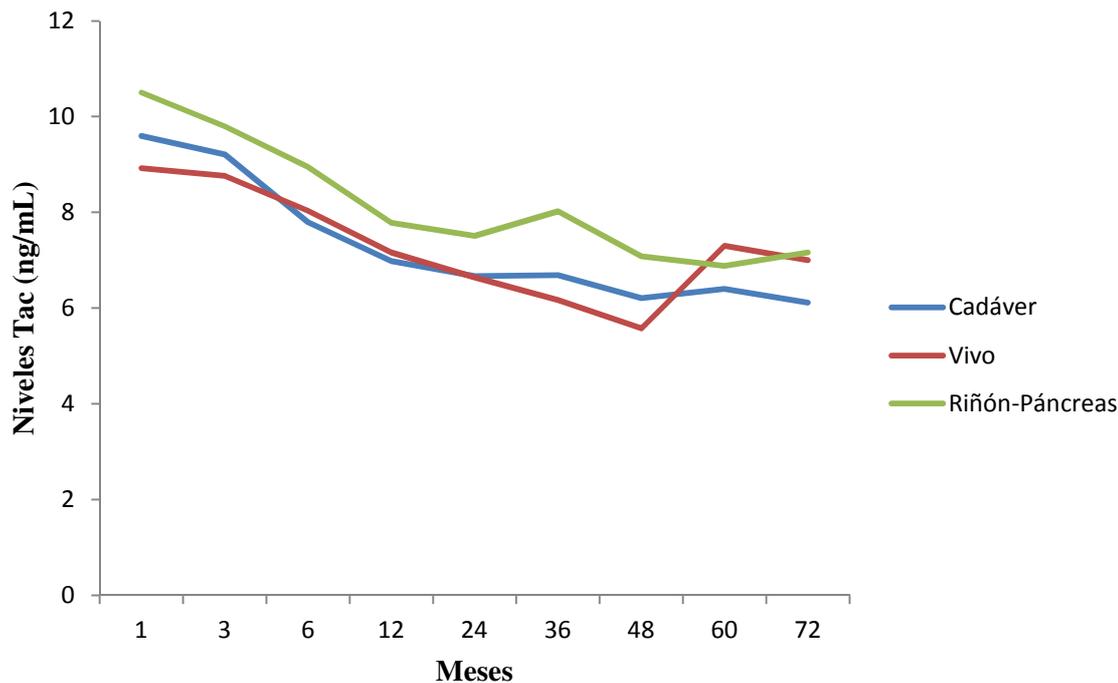


Figura 23. Evolución de los niveles medios de TaC durante el periodo de seguimiento para los distintos subgrupos de trasplantes (ANOVA de medidas repetidas;  $p < 0,001$ ).

De igual forma, la dosis de MMF descendió hasta estabilizarse en un valor próximo a 1.000 mg/día (Fig. 24). El análisis de medidas repetidas mostró, también, un descenso significativo desde el primer mes postrasplante hasta el final del seguimiento ( $p < 0,001$ ).

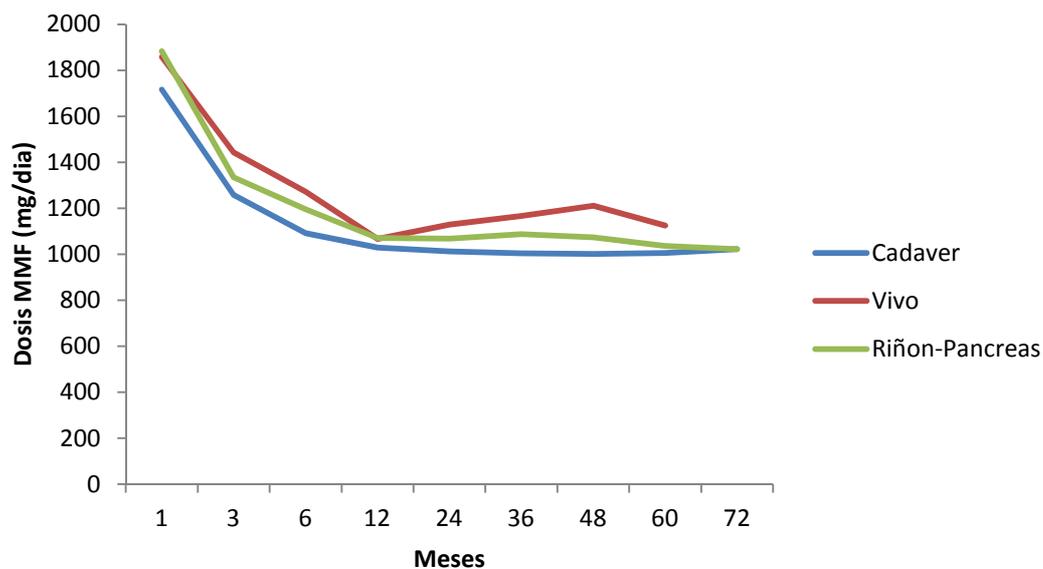


Figura 24. Evolución de las dosis de MMF durante el periodo de seguimiento para los distintos tipos de trasplantes (ANOVA de medidas repetidas;  $p < 0,001$ ).

### 3. DATOS INMUNOLÓGICOS

EL 22,0% de los pacientes con TR presentaron algún tipo de anticuerpos anti-HLA durante el periodo de seguimiento. El 8,6% formaron DSA anti-HLA, de los cuales el 29,4% fue DSA anti-HLA de clase I, el 56,9% DSA anti-HLA de clase II y el 13,7% DSA anti-HLA de clase I y II. El 23,5% de los pacientes con DSA, fijaban C1q (Fig. 25).

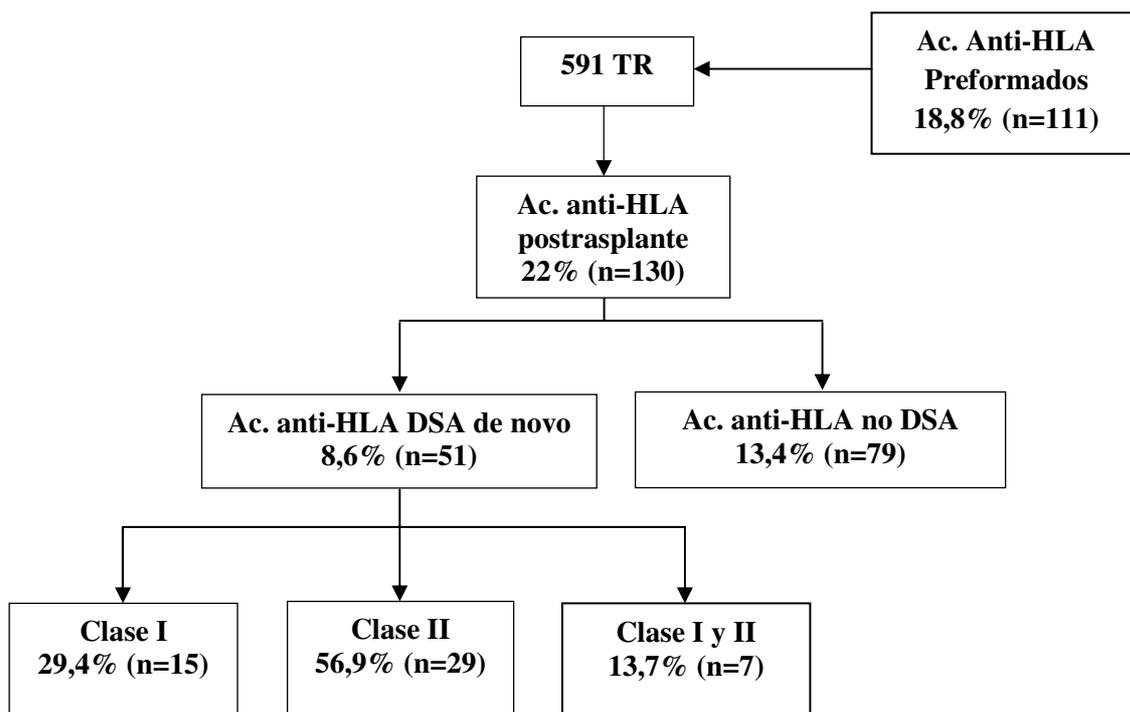


Figura 25. Incidencia de anticuerpos anti-HLA.

El 3,6% de los pacientes presentaron rechazo humoral y el 20,6% RA celular.

La tabla 4 muestra los datos inmunológicos de los pacientes agrupados según el tipo de trasplante (donante cadáver y vivo y R-P). Hubo diferencias significativas en el PRA máximo, anticuerpos anti-HLA pretrasplante y la incidencia de RA celular al excluir el borderline. El tiempo medio de aparición de DSA fue mayor en el orden: TR de cadáver, R-P y vivo, respectivamente.

**Tabla 4. Datos inmunológicos de los receptores.**

	Cadáver (n=502)	Vivo (n=37)	Riñón-Páncreas (n=52)	P
Último PRA Virtual (%)	6,8±18,4	6,9±18,6	0,5±3,5	0,050
Máximo PRA Virtual (%)	8,7±21,7	9,3±22,6	1,0±5,0	0,038
Anticuerpos Anti-HLA pre-TR (%)	19,9	24,3	3,8	0,012
Anticuerpos Anti-HLA post- TR no DSA (%)	15,5	18,2	4,1	0,083
Anticuerpos Anti HLA DSA (%)	8,8	10,8	5,8	0,679
Tiempo aparición DSA anti-HLA (meses)	23,5±19,2	4,5±7,7	14.3±11.1	0.121
Pacientes con DSA anti-HLA (%) (n=51):				
Clase I (%)	43,2	50,0	33,3	0,907
Clase II (%)	70,5	75,0	66,7	0,970
Activación de C1q (%)	22,7	25,0	33,3	0,914
Rechazo Humoral (%)	3,4	8,1	1,9	0,261
Rechazo Agudo Celular (%)	20,3	29,7	17,3	0,325
Rechazo Agudo Celular Excluyendo Bordeline (%)	7,8	21,6	11,5	0,014

TR: trasplante renal. PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos. DSA: anticuerpos donante específicos. HLA: antígeno leucocitario humano.

Los pacientes que recibieron un trasplante combinado de R-P presentaron un número mayor de incompatibilidades en los loci A/B/DR ( $p<0,001$ ) que los pacientes que recibieron un TR de donante vivo o cadáver (Fig. 26).

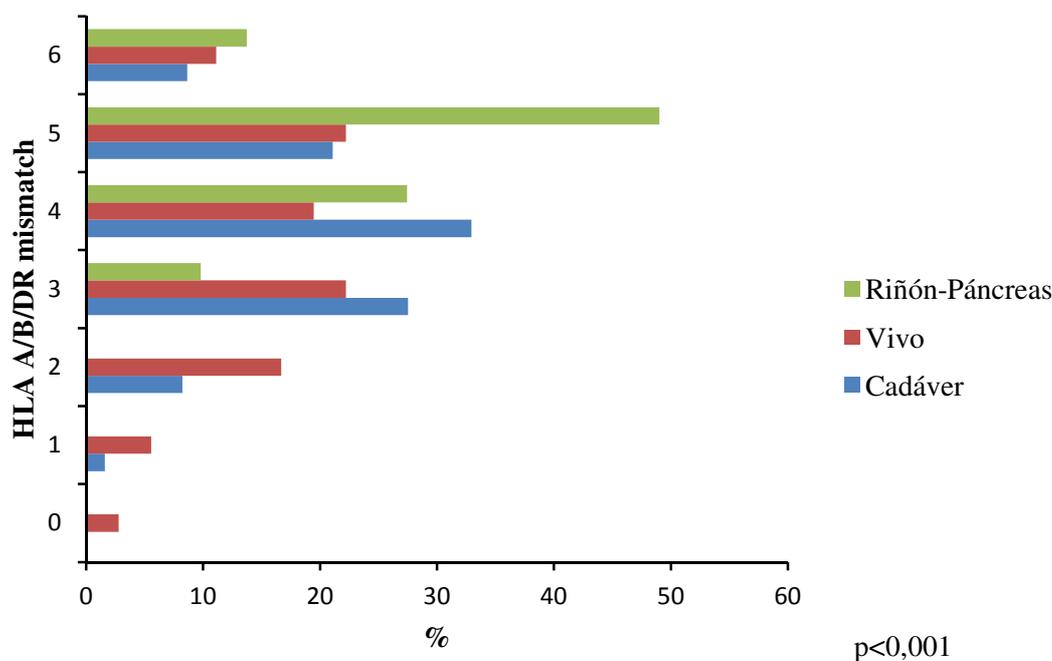


Figura 26. Incompatibilidades HLA A/B/DR según el tipo de trasplante.

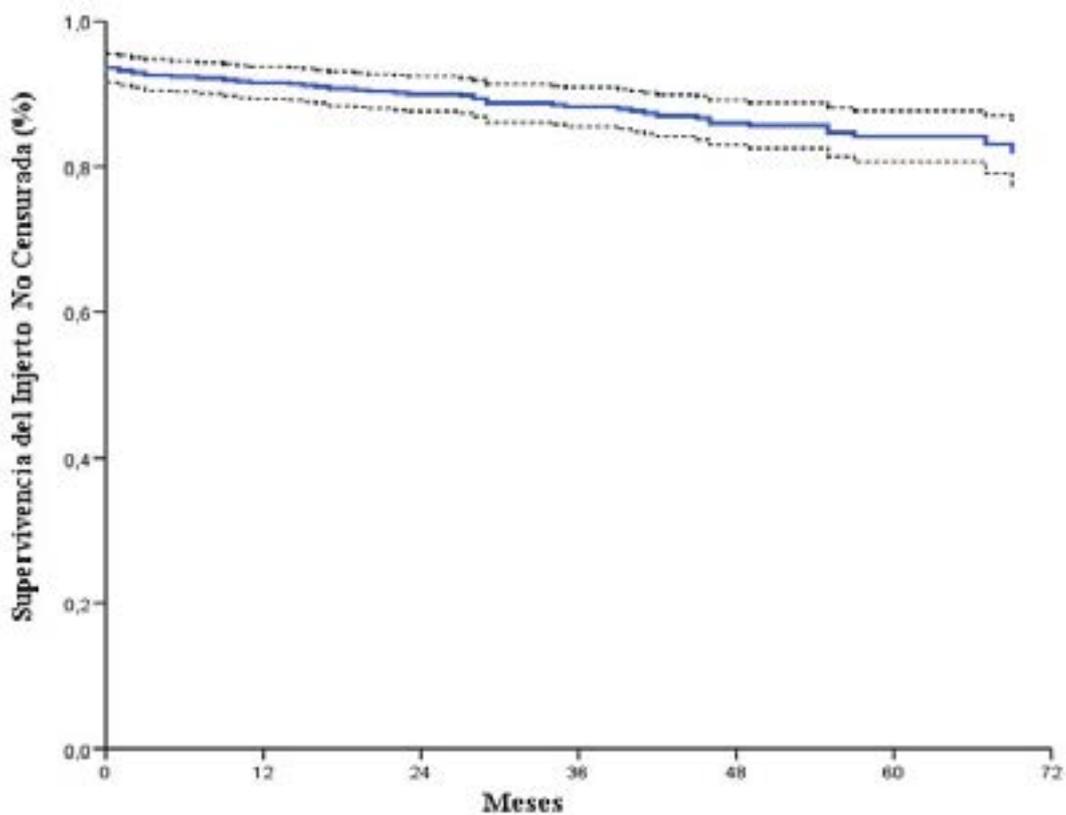
#### 4. SUPERVIVENCIA DEL INJERTO RENAL

##### a. Causas de pérdida del injerto.

Durante el periodo del estudio 80 pacientes (13,5%) perdieron el injerto. Las causas más frecuentes de pérdida del injerto fueron: 28 (35%) injertos nunca funcionantes (en este grupo se incluyen pérdidas por trombosis vascular, otras complicaciones quirúrgicas e injertos no funcionantes), muerte con injerto funcionante (31,3%), RA celular y humoral (11,3%), FIAT (7,5%) y el resto (15%) por poliomavirus BK, abandono de la inmunosupresión y recidiva de la enfermedad base.

##### b. Supervivencia global de injertos no censurada.

La supervivencia global del injerto renal no censurada para la muerte del paciente fue del 91,8% al año, 88,2% a los tres años y 81,9% a los seis años (Fig. 27).



Nº en Riesgo	541	471	340	234	135	51
--------------	-----	-----	-----	-----	-----	----

Figura 27. Supervivencia global del injerto renal no censurada con I.C. 95%.

### c. Supervivencia global del injerto censurada.

La supervivencia global del Injerto renal censurado para la muerte del paciente, fue del 93,2% al año, del 91,3% a los tres años y del 88,4% a los seis años (Fig. 28).

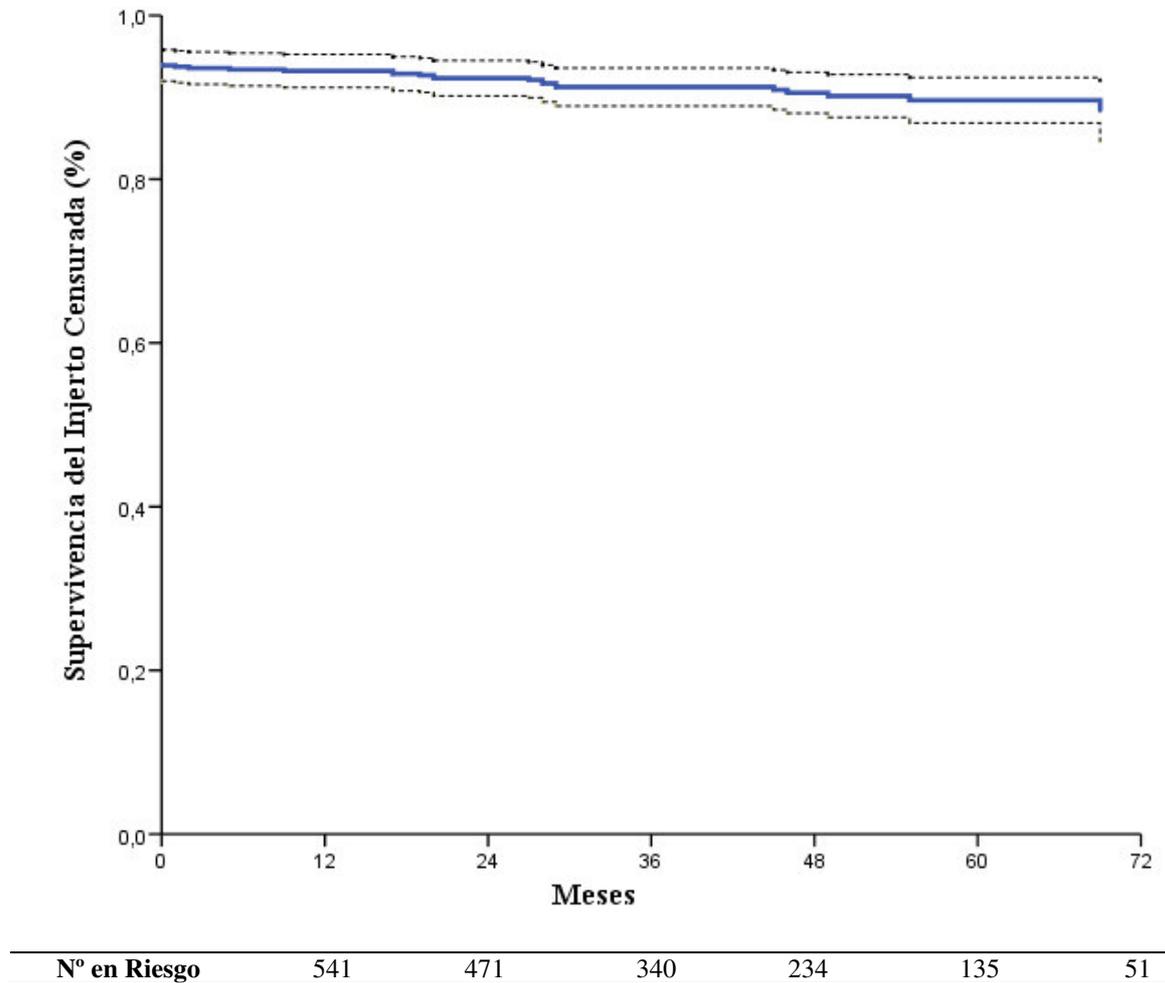
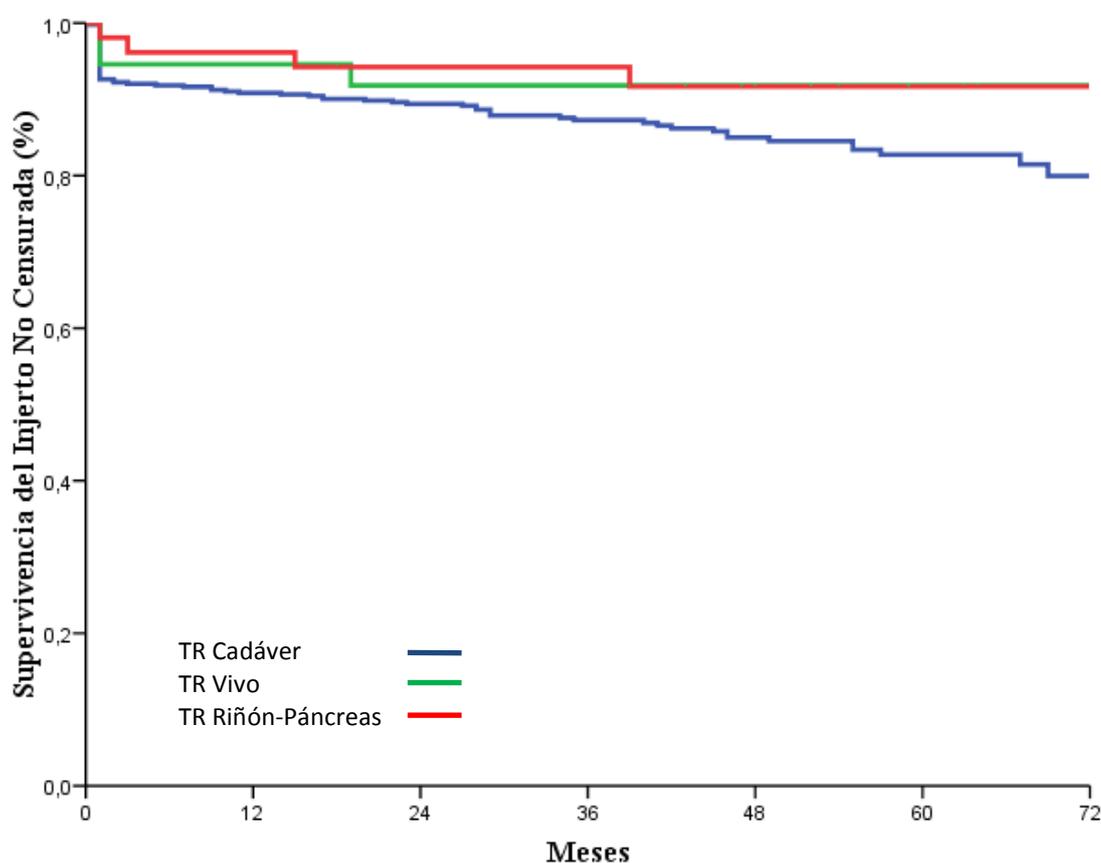


Figura 28. Supervivencia global del injerto censurada con I.C. 95%.

#### d. Supervivencia del injerto no censurada en función del tipo de trasplante.

La supervivencia del injerto no censurada para la muerte no mostró diferencias significativas ( $p=0,203$ ) entre las distintos tipos de trasplante. La supervivencia del injerto de los pacientes que recibieron un TR de donante cadáver fue del 90,8% año, 87,3% a los tres años y 80,0% a los seis años. En los receptores de donante vivo del 94,6% al año, 91,8% a partir del segundo año hasta los seis años y en los pacientes que recibieron un trasplante combinado de R-P la supervivencia del injerto fue del 96,2% al año, 94,2% a los tres años y 91,7% a los seis años (Fig. 29).

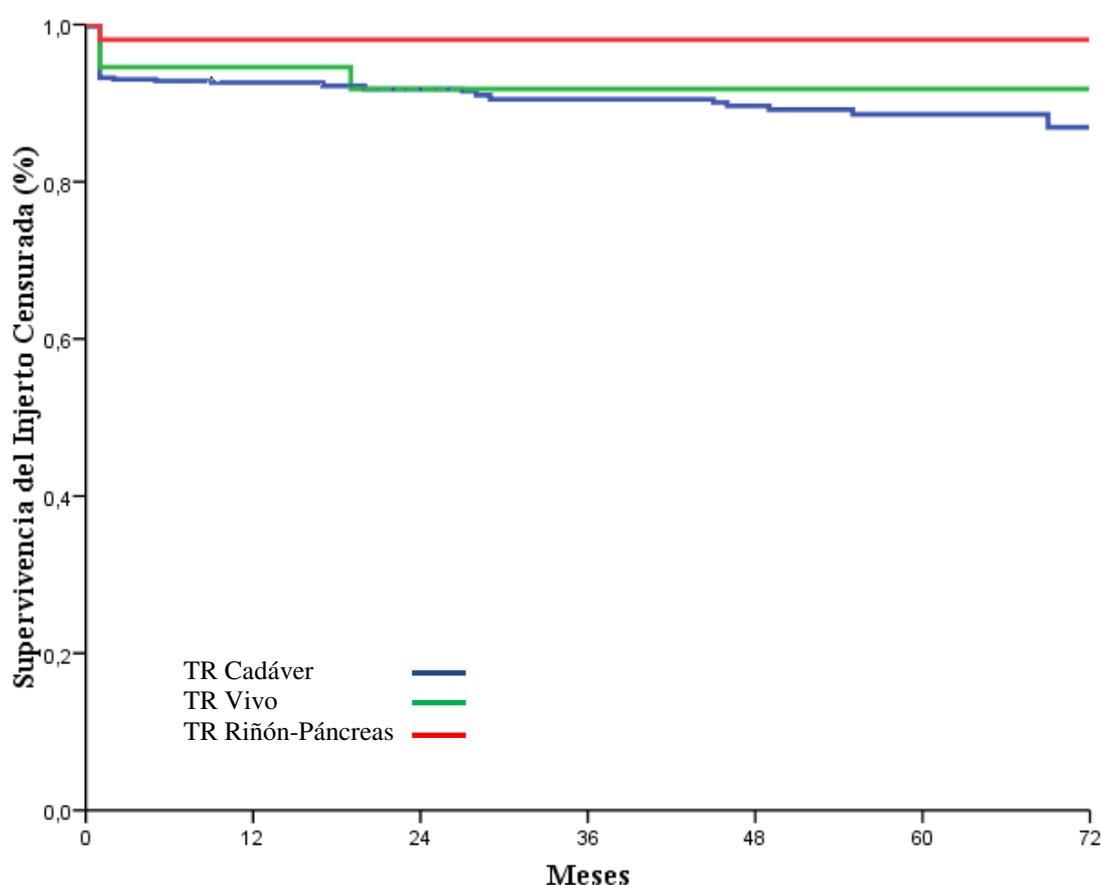


Nº en Riesgo						
TR Cadáver	456	395	278	194	109	39
TR Vivo	35	29	25	12	4	2
TR Riñón-Páncreas	50	47	39	27	20	9

Figura 29. Supervivencia del injerto no censurada en función del tipo de trasplante (log-rank: 3,192;  $p=0,203$ ).

**e. Supervivencia del injerto censurada en función del tipo de trasplante.**

La supervivencia del injerto censurada no mostró diferencias significativas ( $p=0,132$ ) en función del tipo de trasplante. En los pacientes que recibieron un trasplante de donante cadáver fue del 92,6% el primer año, 90,5% el tercer año y 86,9% el sexto año. En los de donante vivo, la supervivencia del injerto censurada fue del 94,6% al año y 91,8% a partir del segundo año y en el trasplante combinado de R-P del 98,1% durante todo el seguimiento (Fig. 30), un dato que muestra posiblemente el impacto beneficioso de la edad del donante en la supervivencia del injerto.



Nº en Riesgo						
TR Cadáver	456	395	278	194	109	39
TR Vivo	35	29	25	12	4	2
TR Riñón-Páncreas	50	47	39	27	20	9

Figura 30. Supervivencia del injerto censurada en función del tipo de trasplante (log-rank: 4,043;  $p=0,132$ ).

**f. Factores de riesgos asociados a la supervivencia del Injerto.**

El modelo univariante de regresión de Cox mostró que los factores de riesgos para la supervivencia del injerto no censurado fueron: Edad del donante, el RA celular excluyendo el tipo borderline, el rechazo humoral y la creatinina sérica a los 12 meses (Tabla 5).

**Tabla 5. Modelo univariante de regresión de Cox para la supervivencia del injerto no censurado.**

Variables	HR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad del Donante	1,02	1,00	1,03	0,027
Edad del Receptor	1,01	0,99	1,02	0,367
Sexo del Donante	0,86	0,56	1,34	0,504
Sexo del Receptor	1,15	0,72	1,82	0,562
Retrasplante	0,77	0,38	1,54	0,457
TIF	1,01	0,96	1,05	0,809
FRI	1,47	0,80	2,69	0,215
TTO. de Inducción	0,98	0,57	1,70	0,945
TLE	1,00	0,99	1,01	0,315
DSA	1,01	0,46	2,19	0,983
Rechazo Celular	1,53	0,95	2,49	0,083
Rechazo Celular (excluyendo borderline)	2,30	1,31	4,03	0,004
Rechazo Humoral	2,83	1,30	6,15	0,009
Anticuerpos Pretrasplante	0,97	0,54	1,73	0,917
PRA $\geq$ 25%	1,04	0,50	2,16	0,915
Creatinina 12 meses	2,71	1,63	4,53	<0,001

TIF: tiempo de isquemia fría; FRI: función retrasada del injerto; TLE: tiempo de lista en espera; DSA: Anticuerpos donante específicos; PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos.

El modelo univariante de regresión de Cox para la supervivencia del injerto censurada para la muerte mostró como factores de riesgos: el RA celular excluyendo el borderline, el rechazo humoral y la creatinina sérica a los 12 meses (Tabla 6).

**Tabla 6. Modelo univariante de regresión de Cox para la supervivencia del injerto censurado.**

Variables	HR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad del Donante	1,01	0,99	1,02	0,502
Edad del Receptor	0,90	0,97	1,01	0,182
Sexo del Donante	0,92	0,54	1,57	0,764
Sexo del Receptor	0,94	0,54	1,62	0,815
Retrasplante	0,90	0,41	1,98	0,785
TIF	0,99	0,94	1,05	0,737
FRI	1,41	0,60	3,68	0,399
TTO. de Inducción	0,88	0,46	1,67	0,694
TLE	1,00	0,99	1,01	0,867
DSA	1,54	0,70	3,40	0,288
Rechazo Celular	1,41	0,78	2,55	0,257
Rechazo Celular (Excluyendo Bordeline)	2,24	1,13	4,45	0,021
Rechazo Humoral	4,20	1,90	9,28	<0,001
Anticuerpos Pretrasplante	1,25	0,66	2,38	0,489
PRA $\geq$ 25%	1,12	0,48	2,61	0,797
Creatinina 12 meses	4,46	2,31	8,61	<0,001

TIF: tiempo de isquemia fría; FRI: función retrasada del injerto; TLE: tiempo de lista en espera; DSA: Anticuerpos donante específicos; PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos.

El modelo multivariante de regresión de Cox para la supervivencia del injerto no censurada mostró los siguientes factores de riesgo de pérdida de injerto: RA celular excluyendo el bordeline y la creatinina sérica a los 12 meses (Tabla 7). En concreto el RA celular y la función renal confieren 4 y 2 veces más riesgo de pérdida del injerto, respectivamente.

**Tabla 7. Modelo multivariante de regresión de Cox para la supervivencia del injerto no censurado.**

Variables	HR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad del Donante	1,02	0,99	1,04	0,245
Rechazo Humoral	3,29	0,90	12,09	0,072
Creatinina 12 meses	2,01	1,15	3,51	0,015
Retrasplante	1,28	0,41	3,98	0,674
Anticuerpos Pretrasplante	2,53	0,63	10,14	0,191
TIF	1,06	0,98	1,16	0,674
TTO. de Inducción	0,76	0,28	2,02	0,578
Rechazo celular (excluyendo bordeline)	4,37	1,88	10,20	0,001

TIF: tiempo de isquemia fría.

El modelo multivariante de regresión de Cox para la supervivencia del injerto censurado mostró que el rechazo humoral y la creatinina sérica a los 12 meses como factores de riesgo de pérdida del injerto (Tabla 8). Es importante destacar que la presencia de rechazo humoral confiere 8 veces más riesgo de pérdida del injerto.

**Tabla 8. Modelo multivariante de regresión de Cox para la supervivencia del injerto censurado.**

Variables	HR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Rechazo Humoral	8,83	1,59	49,11	0,013
Creatinina 12 meses	3,08	1,54	6,17	<0,001
Anticuerpos Pretrasplante	3,06	0,52	17,85	0,215
Rechazo Celular (Excluyendo Bordeline)	2,65	0,69	10,11	0,155
Edad Receptor	0,99	0,95	1,04	0,700

El modelo multivariante parsimonioso de la supervivencia del injerto no censurado mostró como factores de riesgo la edad del receptor, el rechazo celular excluyendo el bordeline y la creatinina sérica a los 12 meses (Tabla 9). En términos cuantitativos, por cada año de la edad del receptor, se incrementa 3% el riesgo de pérdida del injerto. Así mismo, por cada incremento de un punto en la creatinina sérica el riesgo de pérdida del injerto se duplica.

**Tabla 9. Modelo multivariante parsimonioso de regresión de Cox para la supervivencia del injerto no censurado.**

Variables	HR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad del Receptor	1,03	1,00	1,06	0,027
Rechazo Celular (Excluyendo Bordeline)	5,37	2,41	11,96	<0,001
Creatinina 12 meses	2,08	1,22	3,55	0,007

El modelo multivariante parsimonioso para la supervivencia del injerto censurado mostró que la creatinina sérica al año y el rechazo humoral fueron los factores de riesgo de pérdida del injerto, confirmando lo mencionado anteriormente (Tabla 10).

**Tabla 10. Modelo multivariante parsimonioso de regresión de Cox para la supervivencia del injerto censurado.**

Variables	HR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Rechazo Humoral	7,13	2,03	25,01	0,002
Creatinina 12 meses	3,44	1,71	6,90	<0,001

## 5. SUPERVIVENCIA DEL PACIENTE

### a. Causa de muerte del paciente.

Durante el periodo de seguimiento fallecieron 25 pacientes (4,2%). Las causas de éxitus más frecuente fueron la tumoral (32%), seguida de la infecciosa (24%) y cardiovascular (20%). En 3 pacientes (12%) no se determinó la causa de la muerte (Fig. 31).

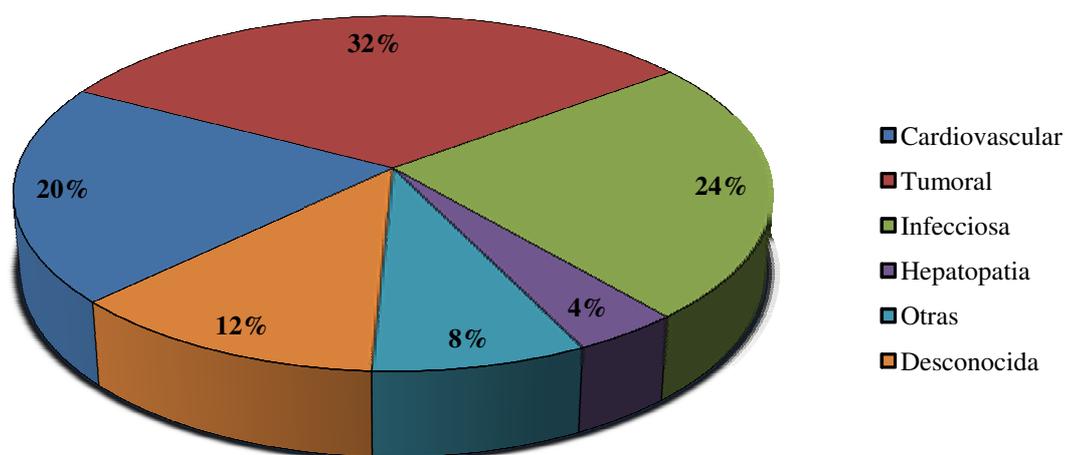
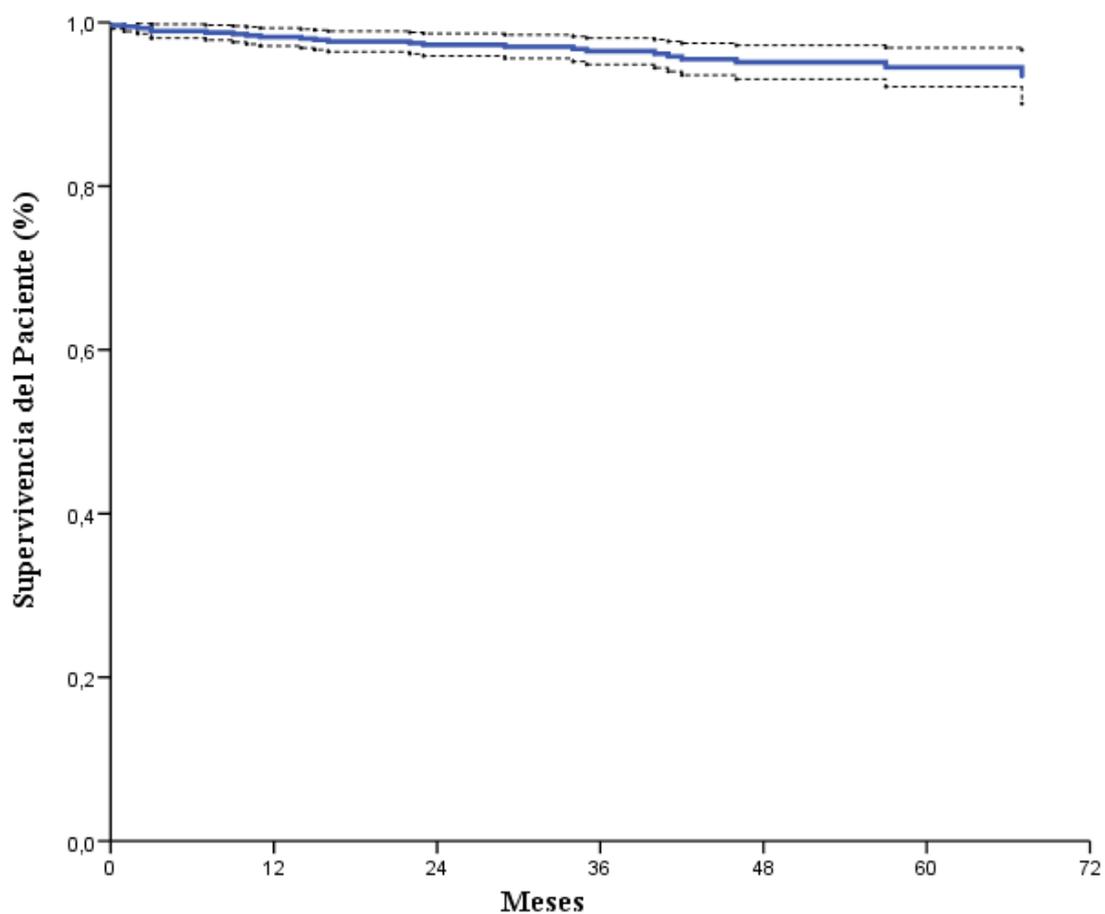


Figura 31. Causa de muerte de los pacientes.

No se observaron diferencias significativas ( $p=0,229$ ) en los distintos tipos de trasplantes en cuanto a las causas de éxitus. No obstante, destacar que ninguno de los pacientes de donante vivo falleció y en R-P hubo dos éxitus por infección y causa no determinada.

### b. Supervivencia global del paciente.

La supervivencia global de pacientes fue del 98,2% al año, 96,5% a los tres años y 92,8% a los 6 años (Fig. 32).

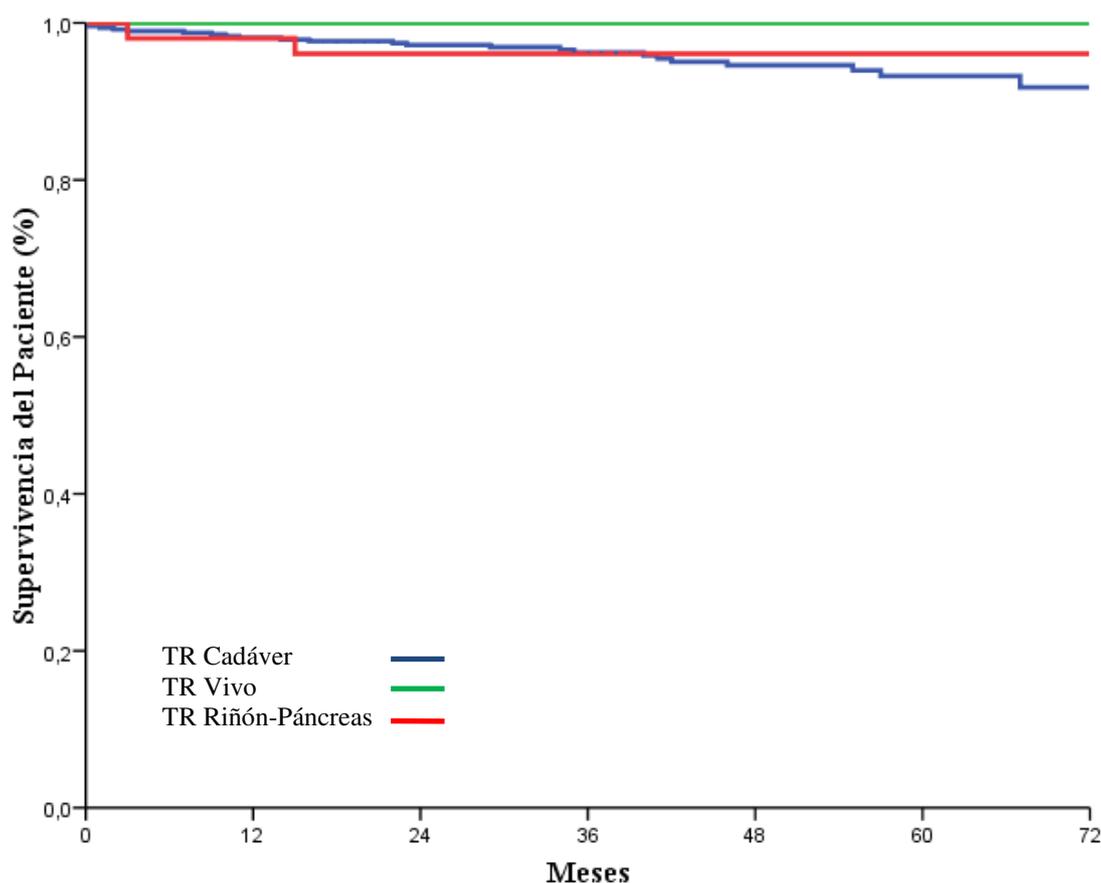


Nº en Riesgo	541	471	340	234	135	51
--------------	-----	-----	-----	-----	-----	----

Figura 32. Supervivencia global del paciente con I.C. 95%.

### c. Supervivencia del paciente en función del tipo de trasplante.

La supervivencia del paciente no mostró diferencias significativas ( $p=0,394$ ) entre los distintos tipos de TR. En receptores de un TR de donante cadáver fue del 98,1% al año, 96,2% al tercer año y 91,8% al sexto año. Los pacientes que recibieron un TR de donante vivo la supervivencia del paciente fue del 100% durante el periodo de seguimiento y la de los pacientes de R-P del 98% al primer año y del 96,1% a partir del primer año (Fig. 33).



Nº en Riesgo						
TR Cadáver	456	395	278	194	109	39
TR Vivo	35	29	25	12	4	2
TR Riñón-Páncreas	50	47	39	27	20	9

Figura 33. Supervivencia del paciente según tipo de trasplante (log-rank: 1,861;  $p=0,394$ ).

#### d. Factores de riesgo asociados a la supervivencia del paciente.

El análisis univariante de regresión de Cox para la supervivencia del paciente mostró como factores de riesgos para la muerte del paciente: la edad del donante, la edad del receptor y el TLE (Tabla 11).

**Tabla 11. Modelo univariante de regresión de Cox para la supervivencia del paciente.**

Variables	HR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad del donante	1,05	1,02	1,08	0,003
Edad del receptor	1,07	1,03	1,11	<0,001
Sexo del Donante	0,75	0,34	1,63	0,461
Sexo del Receptor	1,88	0,75	4,70	0,179
Retrasplante	0,51	1,12	2,18	0,365
TIF	1,05	0,96	1,14	0,319
FRI	1,45	0,64	3,27	0,369
TTO. de Inducción	1,29	0,44	3,77	0,648
TLE	1,01	1,00	1,02	0,032
Rechazo Celular	1,45	0,61	3,47	0,404
Rechazo Celular (excluyendo borderline)	1,84	0,63	5,36	0,264
Rechazo Humoral	0,05	0,00	1118,04	0,553
Anticuerpos Pretrasplante	0,41	0,1	1,75	0,229
PRA $\geq$ 25%	0,86	0,20	3,65	0,836
Creatinina a los 12 meses	1,62	0,69	3,80	0,268

TIF: tiempo de isquemia fría. FRI: función retrasada del injerto. TLE: tiempo en lista de espera. PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos.

El análisis multivariante de regresión de Cox, mostró como factores de riesgo asociados a la supervivencia del paciente la edad del receptor y el TLE (Tabla 12).

**Tabla 12. Modelo multivariante de regresión de Cox para la supervivencia del paciente.**

Variables	HR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad del Donante	1,00	0,96	1,05	0,845
Edad del Receptor	1,07	1,01	1,13	0,013
TLE	1,01	1,00	1,02	0,020

TLE: tiempo en lista de espera.

El análisis multivariante parsimonioso de regresión de Cox, mostró como factores de riesgo de la supervivencia del paciente: la edad del receptor y el TLE, aumentando el riesgo un 7% por año de edad y un 1% por mes en tiempo en lista de espera, respectivamente (Tabla 13).

**Tabla 13. Análisis multivariante parsimonioso de factores de riesgos asociados a la supervivencia del paciente.**

Variables	HR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad del Receptor	1,07	1,03	1,11	<0,001
TLE	1,01	1,00	1,02	0,019

TLE: tiempo en lista de espera.

## ESTUDIO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-HLA

De los 591 enfermos estudiados, 111 (18,8%) tenían anticuerpos anti-HLA pretrasplante, 21 (3,6%) formaron anticuerpos de novo no DSA y 51 (8,6%) DSA de novo postrasplante (Fig. 25).

### 1. ANTICUERPOS anti-HLA PREFORMADOS NO DSA

No se observaron diferencias significativas en las características demográficas de los donantes entre los pacientes con o sin anticuerpos anti-HLA preformados no DSA (Tabla 14).

**Tabla 14. Datos demográficos del donante en pacientes con o sin anticuerpos anti-HLA preformados no DSA**

	Anticuerpos anti- HLA no DSA pretrasplante n=111	No Anticuerpos anti-HLA pretrasplante n=480	P
Edad del Donante (años)	52,9±13,7	50,4±16,7	0,101
Sexo (H) %	56,8	53,9	0,581
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,9±3,9	26,6±4,2	0,454
Causa de Éxito (%)			
ACV	66,7	63,1	
TCE	17,1	20,0	0,563
Otras	8,1	11,0	
Vivo	8,1	5,8	
Grupo Sanguíneo (%):			
A	51,4	39,8	
B	6,3	9,0	0,121
AB	1,8	4,2	
0	40,5	47,1	
Serología Viral (%)			
CMV	65,8	68,3	0,429
VHC	1,8	0,6	0,129
Cormobilidad (%)			
HTA	32,7	30,2	0,603
Diabetes	16,4	12,2	0,236
HTA + Diabetes	10,9	8,4	0,401

H: hombre. IMC: índice de masa corporal. ACV: accidente cerebrovascular. TCE: traumatismo craneoencefálico. CMV: citomegalovirus. HTA: hipertensión arterial.

Las variables significativas que diferencian demográfica y clínicamente a estas dos poblaciones fueron: un mayor porcentaje de mujeres, de retrasplantados, de TLE y de serología viral positiva para CMV y VHC en la subpoblación con anticuerpos anti-HLA preformados; todas ellas variables ligadas a la actividad del SI. Además, estos receptores tuvieron una mayor incidencia de FRI (Tabla 15, página 73) y prevalencia de RA celular y humoral y de formación de DSA de novo (Tabla 16).

**Tabla 16. Incidencia de rechazo agudo celular, humoral y formación de DSA según la ausencia o presencia de anticuerpos anti-HLA no DSA preformados.**

	<b>Anticuerpos anti-HLA no DSA pretrasplante n=111</b>	<b>No Anticuerpos anti-HLA pretrasplante n=480</b>	<b>p</b>
Rechazo Agudo Celular (%)	31,5	18,1	0,002
Rechazo Agudo Celular Excluyendo Bordeline (%)	11,7	8,3	0,262
Rechazo Humoral (%)	14,0	1,0	<0,001
DSA (%)	33,3	2,9	<0,001

DSA: Anticuerpo donante específico.

**Tabla 15. Datos demográficos de pacientes que desarrollaron anticuerpos anti-HLA preformados no DSA frente a los que no desarrollan anticuerpos pretrasplante.**

	Anticuerpos anti-HLA no DSA pretrasplante n=111	No Anticuerpos anti-HLA pretrasplante n=480	P
Edad del Receptor (años)	49,6±14,2	50,2±13,7	0,650
Sexo (M) (%)	56,8	31,9	<0,001
Raza (%)			
Caucásico	95,5	91,2	
Negra	0,9	1,0	0,357
Magrebí	3,6	5,6	
Otras	0,0	2,1	
IMC(Kg/m <sup>2</sup> )	25,5±4,9	25,8±4,1	0,485
Enfermedad de Base (%)			
Glomerular	25,5	20,3	
PQR	10,9	16,5	
Intersticial	12,7	8,2	
Diabetes	6,4	20,3	<0,001
Nefroangioesclerosis	4,5	6,9	
No Filiadas	23,6	18,0	
Otras	6,4	6,9	
Familiar	10,0	2,9	
TLE (meses)	58,0±45,2	30,8±26,2	<0,001
Tipo de Diálisis (%)			
HD	91,9	80,2	
HD-CAPD	-	0,6	0,061
CAPD	5,4	10,0	
CAPD-HD	0,9	2,7	
Prediálisis	1,8	6,5	
Retrasplante (%)	53,2	4,8	<0,001
FRI (%)	48,5	30,7	0,001
TIF (horas)	14,2±5,5	14,4±4,9	0,804
TSV (min)	35,7±9,7	36,5±9,8	0,457
Serología Viral (%)			
CMV	89,8	83,8	0,023
VHB	0,9	0,6	0,754
VHC	7,3	1,7	0,004
Cormobilidad (%)			
HTA	55,7	70,8	0,003
Diabetes	12,6	21,9	0,028
HTA+Diabetes	9,9	16,9	0,067
Dislipemia	41,2	50,4	0,105

M: mujer. IMC: índice de masa corporal. PQR: poliquistosis renal del adulto. TLE: tiempo en lista de espera. HD: hemodiálisis. CAPD: diálisis peritoneal ambulatoria continua. FRI: función retrasada del injerto. TIF: tiempo de isquemia fría. TSV: tiempo de sutura vascular. CMV: citomegalovirus. VHB: virus hepatitis B. VHC: virus hepatitis C. HTA: hipertensión arterial.

## 2. DATOS DEMOGRÁFICOS Y CLÍNICOS DE DONANTES Y RECEPTORES QUE DESARROLLAN DSA

No hubo diferencias significativas en los datos demográficos del donante entre pacientes que formaron DSA, los que presentaron anticuerpos anti-HLA no DSA y los que no presentaron anticuerpos anti-HLA, salvo en la edad del donante (Tabla 17).

**Tabla 17. Datos demográficos del donante en pacientes que desarrollaron DSA, anticuerpos anti-HLA no DSA y aquellos que no formaron anticuerpos.**

	Anti-HLA-DSA (n=51)	Anti-HLA no DSA (n=79)	No Anticuerpos anti-HLA (n=461)	P
Edad del Donante (años)	46,3±14,7	55,4±14,1	50,3±16,6	0,026
Sexo (H) %	54,9	54,4	54,3	0,997
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,9±4,4	26,7±3,3	26,6±4,2	0,903
Causa de Éxito (%)				
ACV	66,7	65,8	63,1	
TCE	17,6	19,0	19,7	0,914
Otras	7,8	7,6	11,3	
Vivo	7,8	7,6	5,9	
Grupo Sanguíneo (%):				
A	56,9	46,8	41,0	
B	9,8	7,6	8,2	0,390
AB		2,5	4,6	
0	33,3	43,0	46,3	
Serología Viral (%)				
CMV	60,8	70,9	68,1	0,216
VHC	7,8	5,1	1,8	0,616
Cormobilidad (%)				
HTA	32,7	38,0	29,2	0,280
Diabetes	12,2	12,7	13,1	0,983
HTA + Diabetes	10,2	11,4	8,3	0,628

H: hombre. IMC: índice de masa corporal. ACV: accidente cerebrovascular. TCE: traumatismo craneoencefálico. CMV: citomegalovirus. HTA: hipertensión arterial.

Los datos demográficos y clínicos de los pacientes que presentaron DSA, anticuerpos anti-HLA no DSA y que no tuvieron anticuerpos en su evolución, mostraron diferencias significativas en el sexo-hombre, IMC, TLE, trasplante, FRI y VHC (Tabla 18).

**Tabla 18. Datos demográficos de pacientes que desarrollaron DSA, anticuerpos anti-HLA no DSA y aquellos que no formaron anticuerpos.**

	Anti-HLA-DSA (n=51)	Anti-HLA no DSA (n=79)	No Anticuerpos anti-HLA (n=461)	P
Edad del Receptor (años)	46,8±13,6	52,7±13,9	50,0±13,7	0,055
Sexo (H) (%)	52,9	45,6	67,7	<0,001
Raza (%)				
Caucásico	94,1	94,9	91,3	
Negra	2,0	1,3	0,9	0,755
Magrebí	3,9	2,6	5,9	
Otras	-	1,3	2,0	
IMC(Kg/m <sup>2</sup> )	24,62±3,98	26,37±4,77	25,83±4,11	0,038
Enfermedad de Base (%)				
Glomerular	36,0	15,2	20,7	
PQR	8,1	10,1	17,2	
Intersticial	12,0	12,7	8,1	
Diabetes	12,0	8,9	19,8	0,001
Nefroangioesclerosis	4,0	6,3	6,8	
No Filiadas	12,0	30,4	17,9	
Otras	10,0	6,3	6,5	
Familiar	6,0	10,1	3,1	
TLE (meses)	56,2±54,8	51,6±36,5	31,0±26,1	<0,001
Tipo de Diálisis (%)				
HD	90,2	87,3	80,7	
HD-CAPD	-	-	0,7	
CAPD	5,9	7,6	9,8	0,390
CAPD-HD	3,9	2,5	2,2	
Prediálisis	-	2,5	6,7	
Retrasplante (%)	49,0	43,0	5,0	<0,001
FRI (%)	54,2	39,7	30,7	0,003
TIF (horas)	14,6±5,1	14,0±5,2	14,4±5,0	0,752
TSV (min)	36,4±11,9	36,1±9,0	36,4±9,6	0,973
Serología Viral (%)				
CMV	88,2	89,6	83,7	0,663
VHB	-	2,5	0,4	0,258
VHC	7,8	5,1	1,8	<0,001
Cormobilidad (%)				
HTA	58,3	62,3	70,0	0,134
Diabetes	15,7	15,2	21,5	0,305
HTA+Diabetes	9,8	10,1	17,2	0,138
Dislipemia	42,9	50,7	48,9	0,706

H: hombre. IMC: índice de masa corporal. PQR: poliquistosis renal del adulto. TLE: tiempo en lista de espera. HD: hemodiálisis. CAPD: diálisis peritoneal ambulatoria continua. FRI: función retrasada del injerto. TIF: tiempo de isquemia fría. TSV: tiempo de sutura vascular. CMV: citomegalovirus. VHB: virus hepatitis B. VHC: virus hepatitis C. HTA: hipertensión arterial.

### 3. INMUNOSUPRESIÓN

En los grupos de pacientes con DSA, anticuerpos anti-HLA no DSA y aquellos con ausencia de anticuerpos, no hubo diferencia en el tratamiento inmunosupresor base, pero si en la inducción, conversión a un fármaco anti-mTOR y en la retirada de esteroides. En estos dos últimos casos, el cambio de inmunosupresión se hizo en pacientes seleccionados (Tabla 19).

**Tabla 19. Inmunosupresión en pacientes que desarrollaron DSA, anticuerpos anti-HLA no DSA y aquellos con ausencia de anticuerpos.**

	Anti-HLA-DSA (n=51)	Anti-HLA no DSA (n=79)	No Anticuerpos anti-HLA (n=461)	P
Tratamiento Inmunosupresor (%)				
• TaC+MMF+P	98,0	98,7	98,0	0,183
• CsA+MMF+P	-	-	1,5	
• Otros	2,0	1,3	0,4	
Tratamiento de Inducción (%)				
• Basiliximab	32,0	49,4	54,3	<0,001
• Timoglobulina	58,0	43,0	23,6	
• No Inducción	10,0	7,6	22,1	
Retirada de Esteroides (%)	3,9	15,2	18,3	0,031
Conversión mTOR (%)	15,7	16,5	7,6	0,013
Reconversión Anticalcineurínicos (%)	37,5	15,4	12,8	0,231

TaC: tacrólimus. MMF: micofenolato mofetilo. P: prednisona. SRL: sirólimus. EVE: everolimus.

#### 4. INCIDENCIA DE RECHAZO CELULAR SEGÚN LA AUSENCIA O FORMACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA DSA O NO DSA POSTRASPLANTE

Los pacientes que forman DSA presentaron una incidencia de RA celular (con o sin la inclusión de los episodios borderline) significativamente mayor que aquellos que forman anticuerpos anti-HLA no DSA y los que no los formaron (Tabla 20).

**Tabla 20. Incidencia de rechazo agudo celular agrupada según la ausencia o formación de anticuerpos anti-HLA DSA o no DSA postrasplante.**

	Anti-HLA- DSA (n=51)	Anti-HLA no DSA (n=79)	No Anticuerpos anti-HLA (n=461)	p
Rechazo Agudo Celular (%)	54,9	21,5	16,7	<0,001
Rechazo Agudo Celular (Excluyendo Borderline) (%)	25,5	7,6	7,4	<0,001

#### 5. INCIDENCIA DE DSA ANTI-HLA

De los 591 receptores de un TR de donante cadáver (n=502), vivo (n=37) y R-P (n=52); 51 (8,6%) formaron DSA anti-HLA de clase I (A o B) o de clase II (DR o DQ) durante el período de estudio. La incidencia fue: 25,5% a los tres meses, 41,2% al año, 17,7% a los dos años, 17,6% a los tres años, 13,7% a los cuatro años, 7,8% a los cinco años y 2,0% a los seis años (Fig. 34).

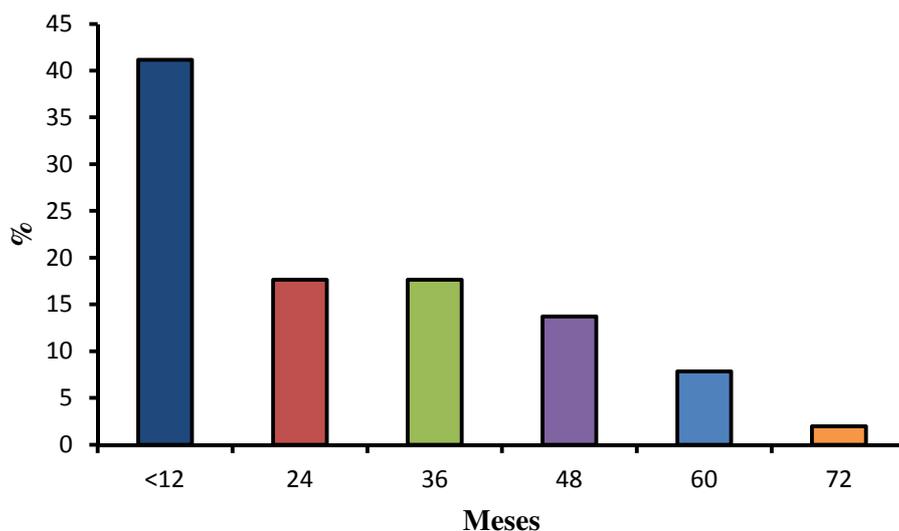


Figura 34. Tiempo de aparición postrasplante de los DSA anti-HLA.

## 6. CLASE DE DSA ANTI-HLA

Los DSA anti-HLA más frecuente fueron los de clase II (70,6%); y de ellos, el DQ2 en 8 pacientes y el DR13 en 9. Los pacientes que presentaron DSA anti-HLA de clase I (43,1%), el más frecuente fue el A1 en 3 pacientes y en el locus B, hay una mayor dispersión (Tabla 21).

Tabla 21. Tipos de DSA anti-HLA.

Anticuerpos Donante Específicos Anti-HLA							
CLASE I				CLASE II			
TIPO A		TIPO B		TIPO DQ		TIPO DR	
A1	3	B7	1	DQ2	8	DR4	2
A2	2	B8	2	DQ4	2	DR7	2
A3	1	B18	2	DQ5	6	DR8	2
A11	1	B27	1	DQ6	5	DR10	1
A26	1	B35	1	DQ7	2	DR11	2
A29	1	B44	2	DQ8	3	DR13	9
A30	2	B47	1	DQ9	1	DR14	1
A33	1	B50	1				
A68	1	B51	1				
		B52	1				
		B56	1				
		B60	1				
		B61	1				
		B65	1				

## 7. RELACIÓN DSA Y RECHAZO HUMORAL

De los 51 enfermos que formaron DSA, 21 (41,2%) tuvieron un rechazo humoral (19 agudo y 2 crónicos) (Fig. 35). Todos diagnosticados mediante biopsia renal siguiendo los criterios establecidos por la clasificación de Banff de 2013 (Anexo B).

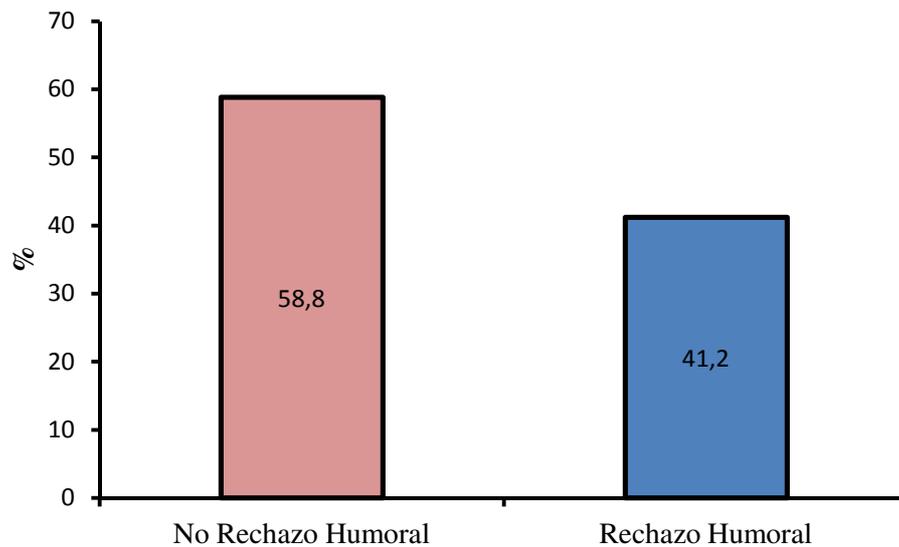


Figura 35. Porcentaje de pacientes con DSA que desarrollaron o no un rechazo humoral.

De los 30 pacientes (58,8%) que no presentaron rechazo humoral, 19 (63,3%) mantuvieron positivos los DSA durante el periodo de estudio y 11 (36,7%) los negativizaron. De los 21 pacientes (41,2%) con rechazo humoral, 14 (66,6%) mantuvieron los DSA y 7 (33,4%) los negativizaron ( $p=0,546$ ). De estos 21 pacientes, 7 (33,3%) perdieron el injerto y de los 14 restantes que no pierden el injerto, en 7 (54,5%) se negativizaron los DSA (MFI), en 4 (23,0%) se mantuvieron y en 3 (18,0%) aumentó el MFI (Fig. 36).

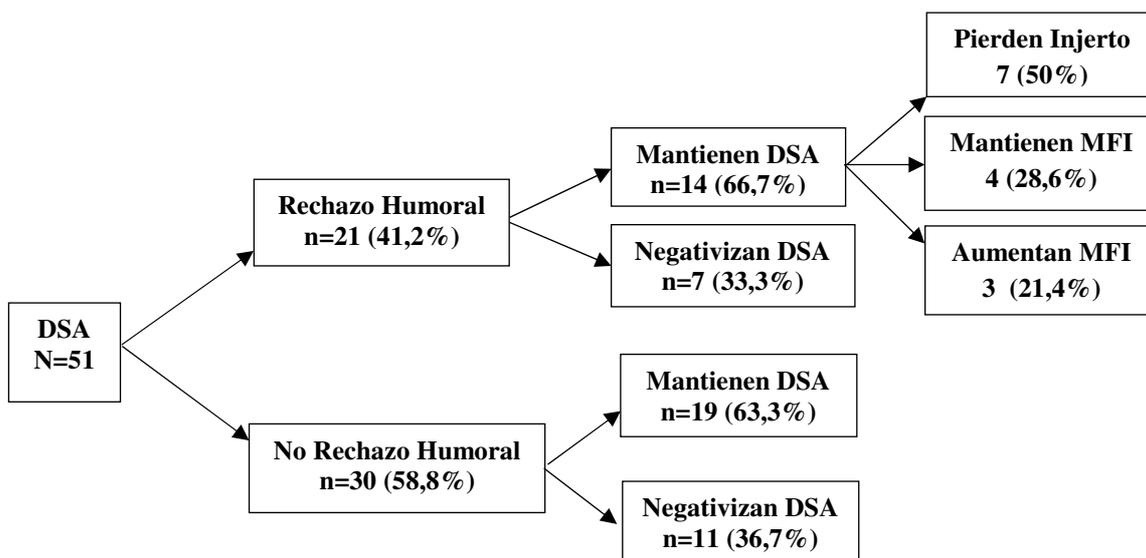


Figura 36. Evolución de los DSA anti-HLA.

De los pacientes con RA humoral que fijaron C1q, sólo uno negativizó los DSA. Los dos casos de GT, ninguno negativiza los DSA aunque estos no fijaron el complemento (Tabla 22).

Tabla 22. Negativización de los DSA en función del rechazo humoral.

	Negativización de DSA		Total
	No	Si	
No Rechazo Humoral	19 (63,3%)	11 (36,7%)	30
Rechazo Humoral	14 (66,6%)	7 (33,4%)	21
Total	33(64,7%)	18 (35,3%)	51

## 8. EXPANSIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA

Acorde al % del PRA virtual, en el periodo postrasplante, se produjo un incremento progresivo de la formación de anticuerpos anti-HLA, tanto en los pacientes que previamente los tenían como en los que formaron anticuerpos de novo; aunque en estos, en menor proporción (Fig. 37).

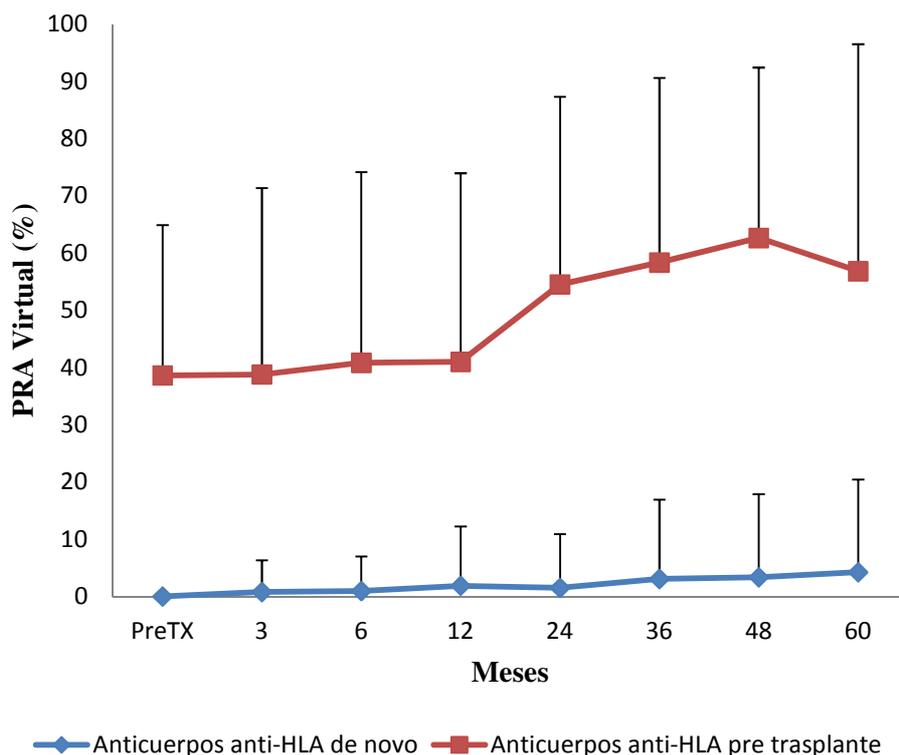


Figura 37. Evolución en el tiempo de los anticuerpos anti-HLA de novo no DSA.

El análisis de medidas repetidas muestra que durante los tres primeros años se produce un incremento progresivo y significativo de la formación de anticuerpos anti-HLA en toda la población estudiada ( $p < 0,001$ ; Tabla 23), en aquellos que previamente tenían anticuerpos anti-HLA ( $p < 0,001$ ; Tabla 24) y en los que formaron DSA ( $p = 0,025$ ; Tabla 25).

**Tabla 23. Evolución del PRA (%) durante los 3 primeros años post-trasplante en la población estudiada.**

<b>PRA (%) (n=307)</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Típica</b>
Pre TR	3,5	13,3
3 Meses	3,7	13,1
6 Meses	4,0	13,7
12 Meses	4,4	15,2
24 Meses	6,0	19,2
36 Meses	8,4	23,9

ANOVA de medidas repetidas  $p < 0,001$ .

**Tabla 24. Evolución del PRA (%) durante los 3 primeros años postrasplantes en pacientes que presentaron PRA positivo previo al trasplante**

<b>PRA (%) (n=31)</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación típica</b>
Pre TR	34,7	26,1
6 Meses	36,4	26,3
12 Meses	35,1	26,4
24 Meses	53,6	28,3
36 Meses	66,7	31,2

ANOVA de medidas repetidas  $p < 0,001$ .

**Tabla 25. Evolución del PRA (%) durante los 3 primeros años postrasplante en pacientes que presentaron DSA de novo.**

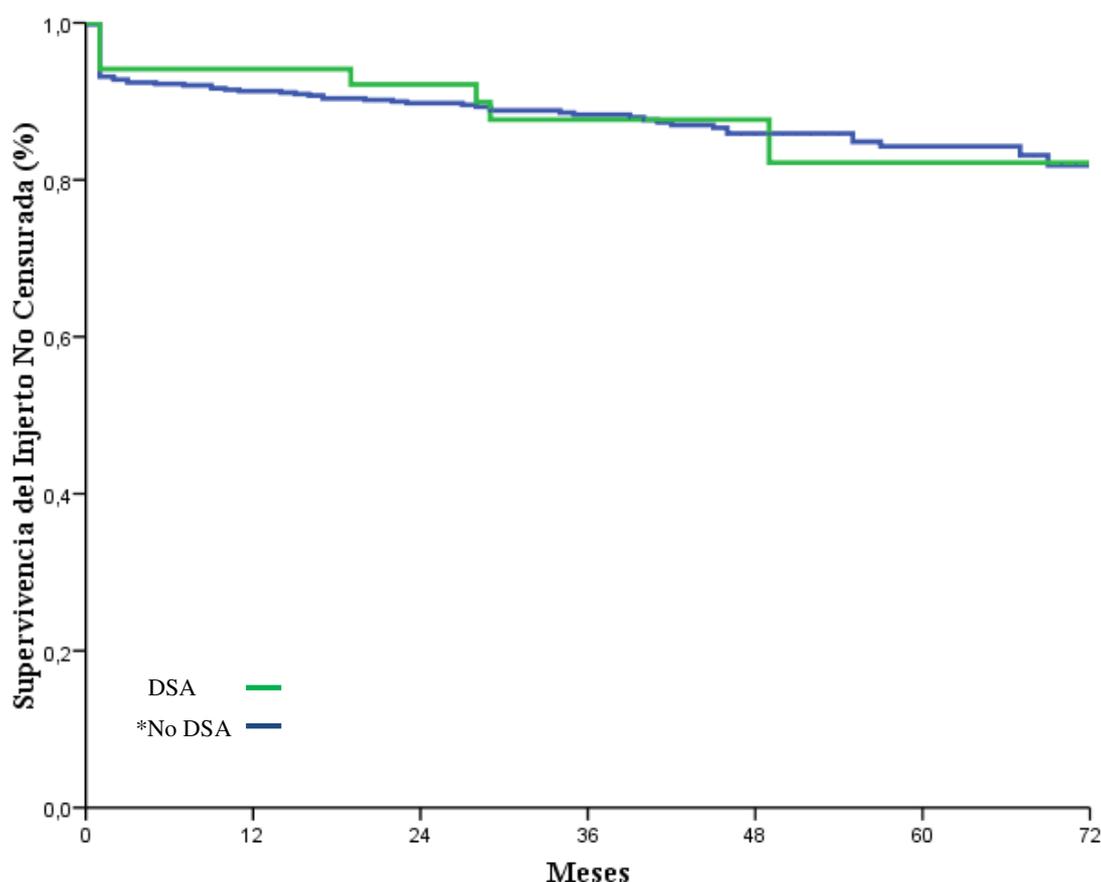
<b>PRA (%) (n=23)</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. típ.</b>
Pre TR	30,0	31,0
3 Meses	28,2	28,7
6 Meses	32,4	29,7
12 Meses	37,3	30,4
24 Meses	45,2	36,4
36 Meses	60,6	32,6

ANOVA de medidas repetidas  $p = 0,025$ .

En este último grupo hubo pacientes que tenían un PRA virtual positivo previo al TR por anticuerpos no DSA.

## 9. SUPERVIVENCIA DEL INJERTO NO CENSURADA

No se observaron diferencias significativas en la supervivencia del injerto de los 51 pacientes que presentaron DSA y los 540 que no desarrollaron DSA ( $p=0,167$ ). La supervivencia del injerto no censurada para los pacientes que presentaron DSA fue del 94,1% al año, 88,7% al tercer año y 82,2% al sexto año; y en los pacientes sin DSA del 91,3% al primer año, 88,3% al tercer año y 81,8% al sexto año (Fig. 38).



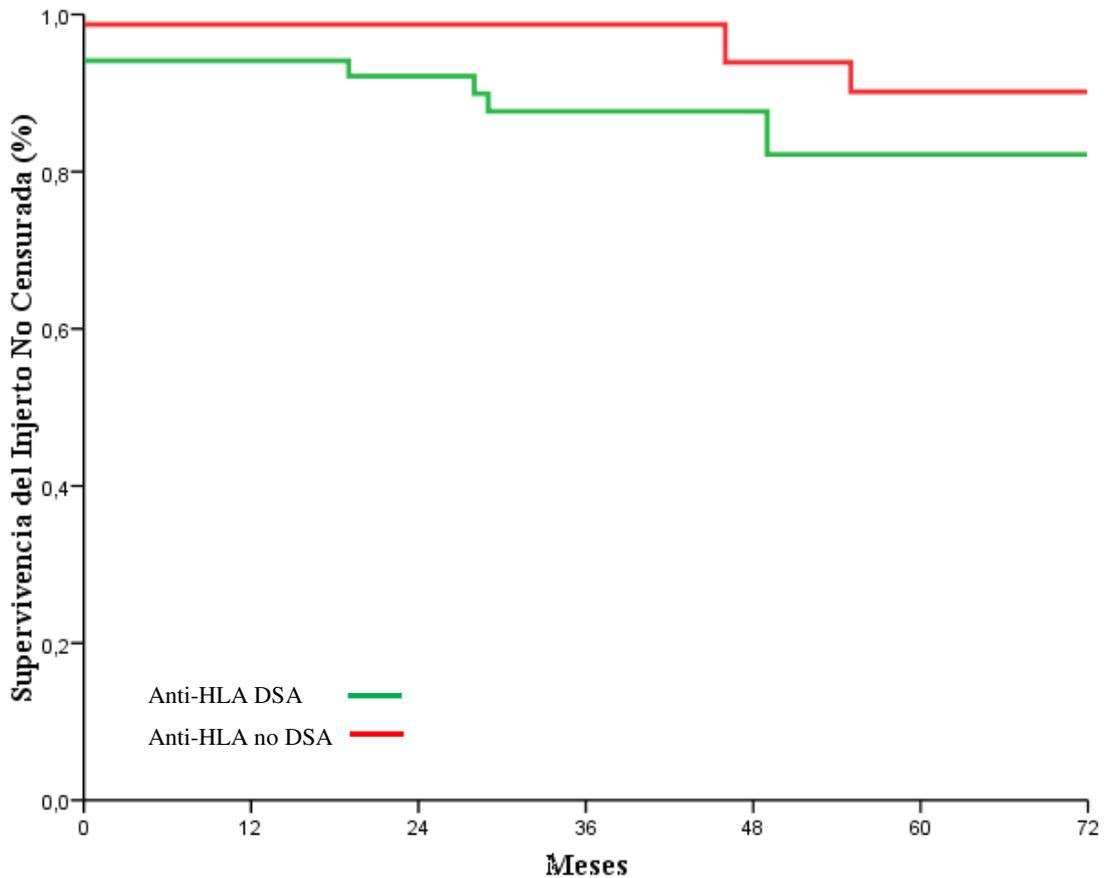
Nº en Riesgo						
DSA	48	44	31	17	10	2
No DSA	493	426	309	216	125	48

\*No DSA: en este grupo se incluyen aquellos pacientes que nunca presentaron anticuerpos anti-HLA o presentaron anticuerpos anti-HLA no DSA durante el postrasplante.

Figura 38. Supervivencia del injerto no censurada en función de la aparición de DSA (log-rank: 0,000;  $p=0,982$ ).

Tampoco hubo diferencias cuando se comparó la supervivencia del injerto en pacientes con anticuerpos anti-HLA no DSA con los que formaron DSA ( $p=0,069$ ), aunque en este caso

hubo una tendencia. En los primeros, la supervivencia del injerto fue del 98,7% al primer año, 98,7% al tercer año y 90,2% a los seis años; y en los que presentaron anticuerpos anti-HLA DSA del 94,1% al primer año, 87,7% al tercer año y 82,2% a los seis años (Fig. 39).



Nº en Riesgo						
Anti-HLA DSA	48	44	31	17	10	2
Anti-HLA no DSA	78	69	48	35	15	2

Figura 39. Supervivencia del injerto no censurada en pacientes con anticuerpos anti-HLA y con DSA (log-rank: 3,305; p=0,069).

Pero si hubo diferencias significativas cuando se compararon entre sí los pacientes con DSA que habían desarrollado rechazo humoral con los que no lo tuvieron ( $p < 0,001$ ). En este caso, la supervivencia del injerto para los pacientes que no tuvieron rechazo humoral fue del 100% a los seis años y en aquellos con rechazo humoral, del 85,7% al primer año, 68,5% al tercer año y 57,1% al sexto año (Fig. 40).

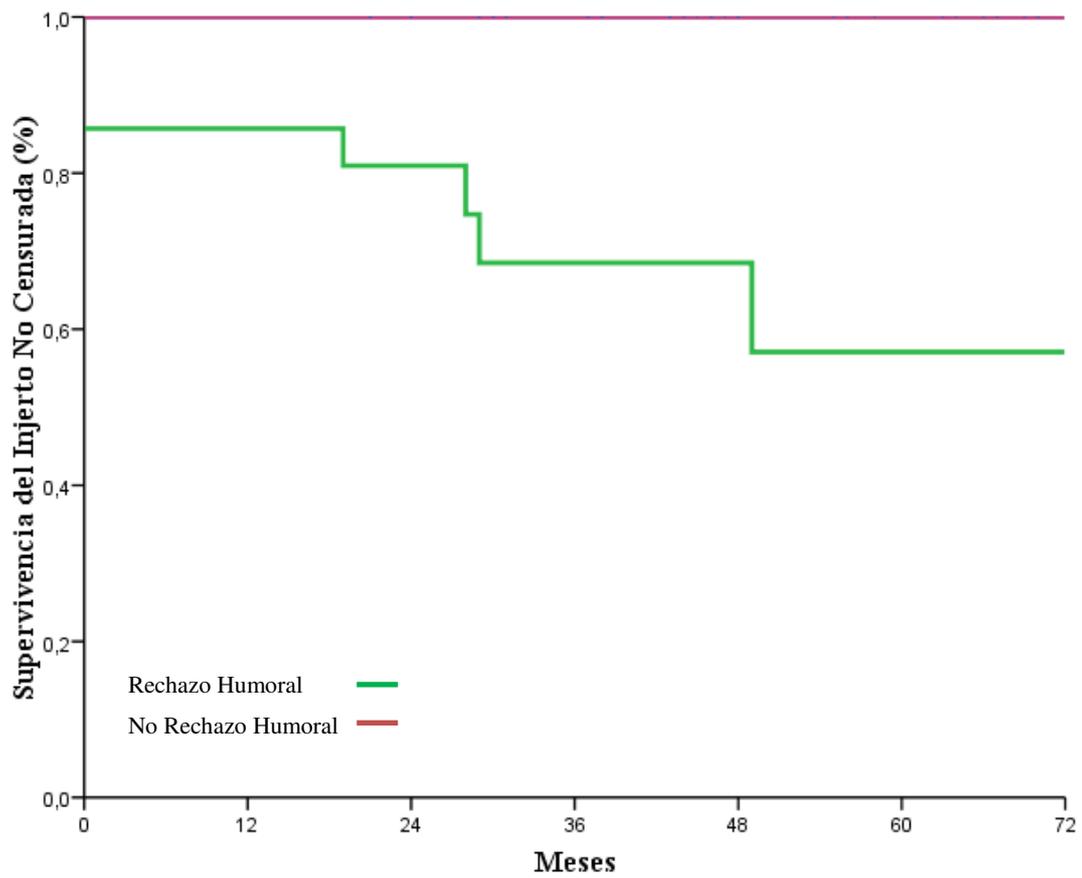
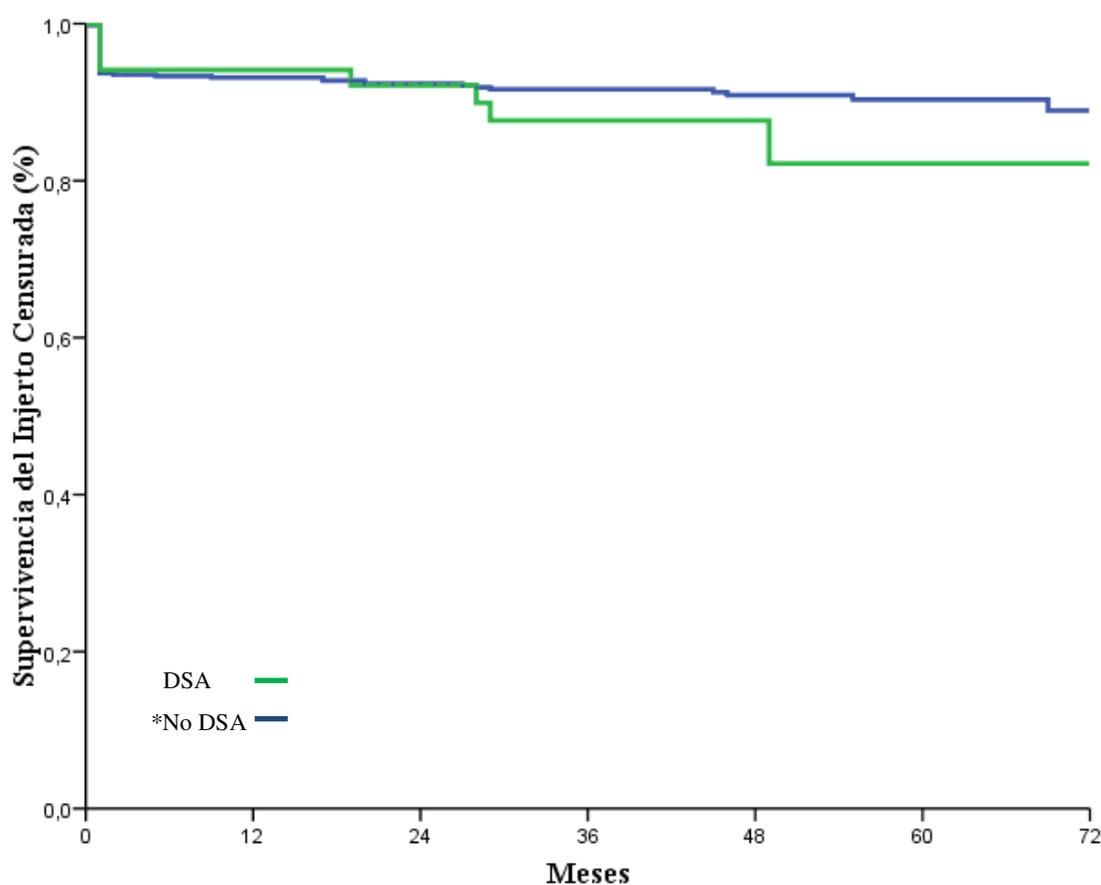


Figura 40. Supervivencia del injerto no censurada en pacientes que presentaron DSA en función del rechazo humoral (log-rank: 12,141;  $p < 0,001$ ).

## 10. SUPERVIVENCIA DEL INJERTO CENSURADA

No hubo diferencias significativas ( $p=0,274$ ) en la supervivencia del injerto en los pacientes que presentaron DSA y los que no (pacientes que no presentaron anticuerpos anti-HLA o presentaron anticuerpos anti-HLA no DSA durante el postrasplante). La supervivencia del injerto en los que no presentaron DSA fue del 93,1% al primer año, 91,7% al tercer año y 88,9% al sexto año postrasplante; y para los que si desarrollaron DSA del 94,1% al año, 87,7% al tercer año y 82,2% al sexto año (Fig. 41).

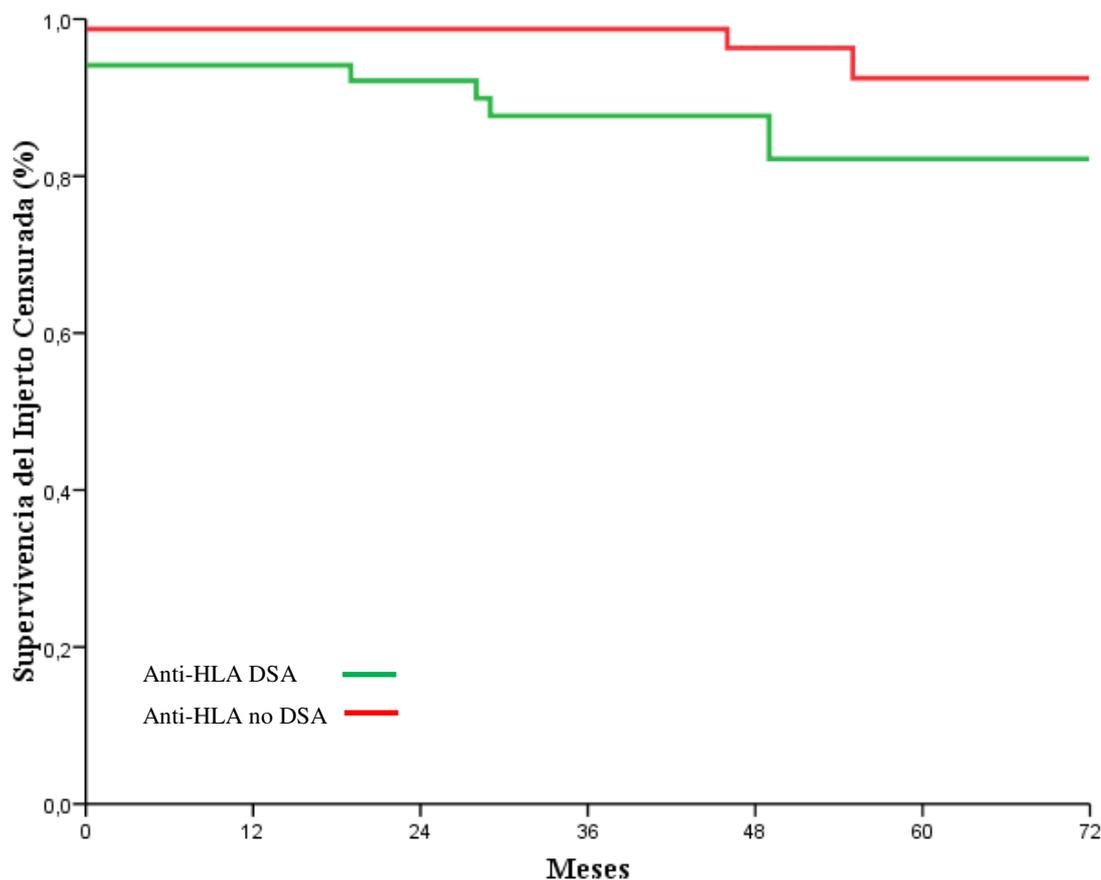


Nº en Riesgo						
DSA	48	44	31	17	10	2
No DSA	493	426	309	216	125	48

\*No DSA: en este grupo se incluyen aquellos pacientes que nunca presentaron anticuerpos anti-HLA o presentaron anticuerpos anti-HLA no DSA durante el postrasplante.

Figura 41. Supervivencia del injerto censurada en función de la aparición o no de DSA (log-rank: 1,194;  $p=0,274$ ).

Pero si hubo diferencia significativa en la supervivencia de injertos censurada entre pacientes con anticuerpos anti-HLA no DSA y los que formaron DSA ( $p=0,034$ ). En los primeros la supervivencia del injerto fue del 98,7% al primer año, 98,7% al tercer año y 92,5% a los seis años; y en aquellos con anticuerpos anti-HLA DSA del 94,1% al primer año, 87,7% al tercer año y 82,2% a los seis años (Fig. 42).



Nº en Riesgo						
Anti-HLA DSA	48	44	31	17	10	2
Anti-HLA no DSA	78	69	48	35	15	2

Figura 42. Supervivencia censurada del injerto entre pacientes que formaron con anticuerpos anti-HLA no DSA y con DSA (log-rank: 4,472;  $p=0,034$ ).

También, la hubo cuando se comparan la supervivencia del injerto entre los pacientes que formaron DSA y no desarrollan rechazo humoral con los que si hacen rechazo humoral ( $p<0,001$ ). La supervivencia de los que no presentaron rechazo fue del 100% a los seis años y la de los que si presentaron rechazo humoral del 85,7% al primer año, 68,5% al tercer año y 57,1% al sexto año (Fig. 43).

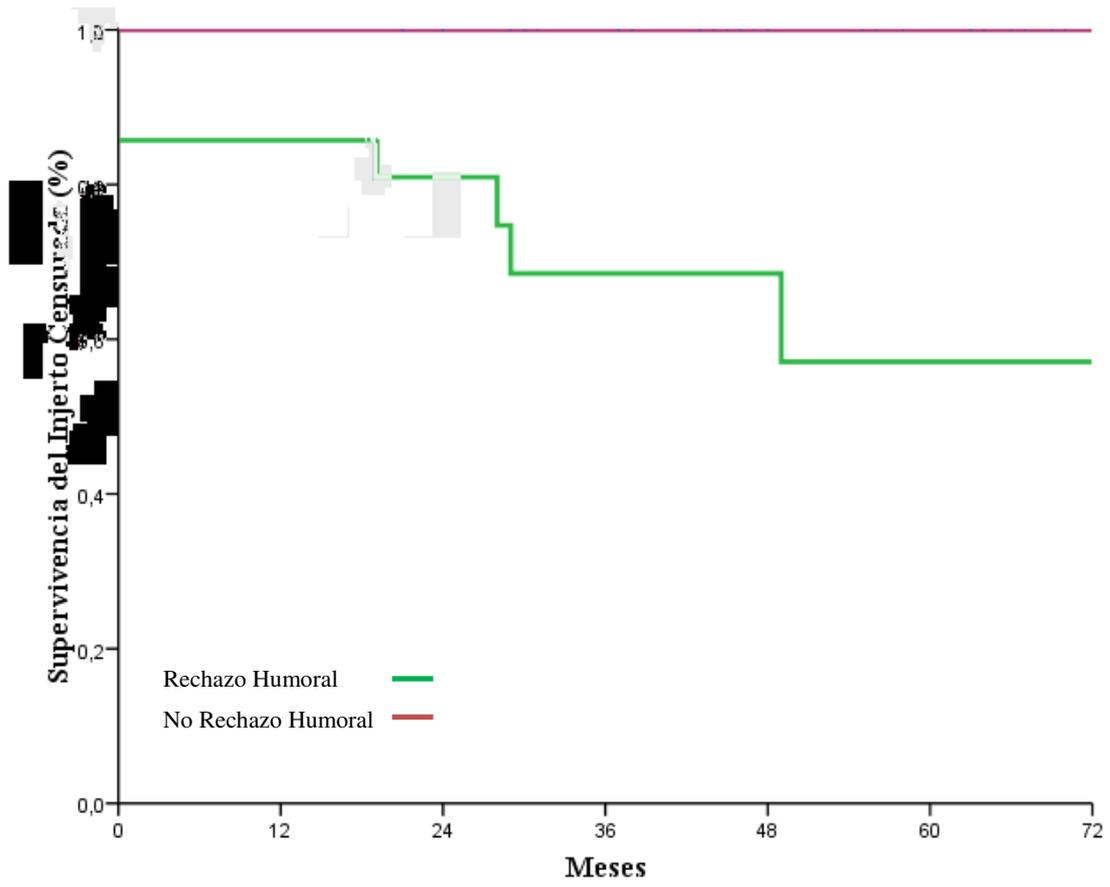


Figura 43. Supervivencia del injerto censurada en pacientes que presentaron DSA en función del rechazo humoral (log-rank: 12,141;  $p < 0,001$ ).

## 11. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES QUE DESARROLLARON DSA DURANTE EL SEGUIMIENTO EN FUNCIÓN DEL RECHAZO HUMORAL

De los 51 pacientes (8,6%) que formaron DSA, 21 tuvieron rechazo humoral. No hubo diferencias significativas en los datos demográficos y clínicos de donantes y receptores en pacientes que formaron DSA y presentaron o no rechazo humoral (Tablas 26 y 27).

**Tabla 26. Datos demográficos y clínicos de los donantes de pacientes que formaron DSA según tuvieran o no rechazo humoral.**

	No Rechazo Humoral (n=30)	Rechazo Humoral (n=21)	P
Edad del Donante (años)	51,0±13,8	46,9±15,8	0,343
Sexo (H) %	50,0	61,9	0,400
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26,8±4,7	26,9±4,0	0,630
Causa de Éxito (%)			
ACV	73,3	57,1	
TCE	16,7	19,0	0,468
Otras	6,7	9,5	
Vivo	3,3	14,3	
Grupo Sanguíneo (%):			
A	36,7	33,3	
B	56,7	52,4	0,666
0	6,7	14,3	
Serología Viral (%)			
CMV	70,0	47,6	0,118
VHC	-	-	
Cormobilidad (%)			
HTA	36,7	26,3	0,452
Diabetes	10,0	15,8	0,547
HTA + Diabetes	10,0	10,5	0,953

H: hombre. IMC: índice de masa corporal. ACV: accidente cerebro-vascular. TCE: traumatismo craneoencefálico. CMV: citomegalovirus. HTA: hipertensión arterial.

**Tabla 27. Datos demográficos y clínicos de pacientes que formaron DSA tuvieron o no rechazo humoral.**

	No Rechazo Humoral (n=30)	Rechazo Humoral (n=21)	p
Edad del Receptor (años)	47,10±13,17	46,38±14,47	0,962
Sexo (H) (%)	50,0	57,1	0,615
Raza (%)			
Caucásico	90,0	100,0	0,328
Negra	3,3	-	
Magrebí	6,7	-	
IMC(Kg/m <sup>2</sup> )	23,87±3,63	25,16±40,40	0,396
Enfermedad de Base (%)			
Glomerular	48,3	19,0	0,010
PQR	10,3	4,8	
Intersticial	3,4	23,8	
Diabetes	6,9	19,0	
Nefroangioesclerosis	-	9,5	
No Filiadas	17,2	4,8	
Otras	13,8	4,8	
Familiar	-	14,3	
TLE (meses)	47,10±41,50	69,14±68,58	0,427
Tipo de Diálisis (%)			
Hemodiálisis	93,3	85,7	0,622
HD-CAPD	-	-	
CAPD	3,3	9,5	
CAPD-HD	3,3	4,8	
Prediálisis	-	-	
Retrasplante (%)	53,3	42,9	0,461
FRI (%)	58,6	47,4	0,444
TIF (horas)	15,20±4,63	13,70±5,64	0,347
TSV (min)	37,21±14,47	35,29±7,39	0,655
Serología Viral (%)			
CMV	83,3	95,2	0,194
VHB	-	-	-
VHC	10,0	4,8	0,362
Cormobilidad (%)			
HTA	53,6	65,0	0,428
Diabetes	6,7	28,6	0,034
HTA+Diabetes	6,7	14,3	0,368
Dislipemia	38,5	50,0	0,463

H: hombre. IMC: índice de masa corporal. PQR: poliquistosis renal del adulto. TLE: tiempo en lista de espera. HD: hemodiálisis. CAPD: diálisis peritoneal ambulatoria continua. FRI: función retrasada del injerto. TIF: tiempo de isquemia fría. TSV: tiempo de sutura vascular. CMV: citomegalovirus. VHB: virus hepatitis B. VHC: virus hepatitis C. HTA: hipertensión arterial.

Tampoco hubo diferencias significativas en el tratamiento inmunosupresor en los pacientes que formaron DSA y presentaron o no rechazo humoral (Tabla 28).

**Tabla 28. Tratamiento inmunosupresor en pacientes que formaron DSA y tuvieron o no rechazo humoral.**

	No Rechazo Humoral (n=30)	Rechazo Humoral (n=21)	p
Tratamiento Inmunosupresor (%)			
TaC+MMF+P	96,6	100,0	0,390
CsA+MMF+P	-	-	
Otros	3,4	-	
Tratamiento de Inducción (%)			
Basiliximab	31,0	33,0	0,574
Timoglobulina	55,2	61,9	
No Inducción	13,8	4,8	
Retirada de Esteroides (%)	-	9,5	0,085
Conversión mTOR (%)			
• SRL+MMF+P	80,0	100,0	0,408
• EVE+MMF+P	-	-	
• TaC+SRL+P	-	-	
• TaC+EVE+P	20,0	-	
Reconversión Anticalcineurínicos (%)	40,0	33,3	0,850

TaC: tacrolimus. MMF: micofenolato mofetilo. P: prednisona. SRL: sirólimus. EVE: everolimus.

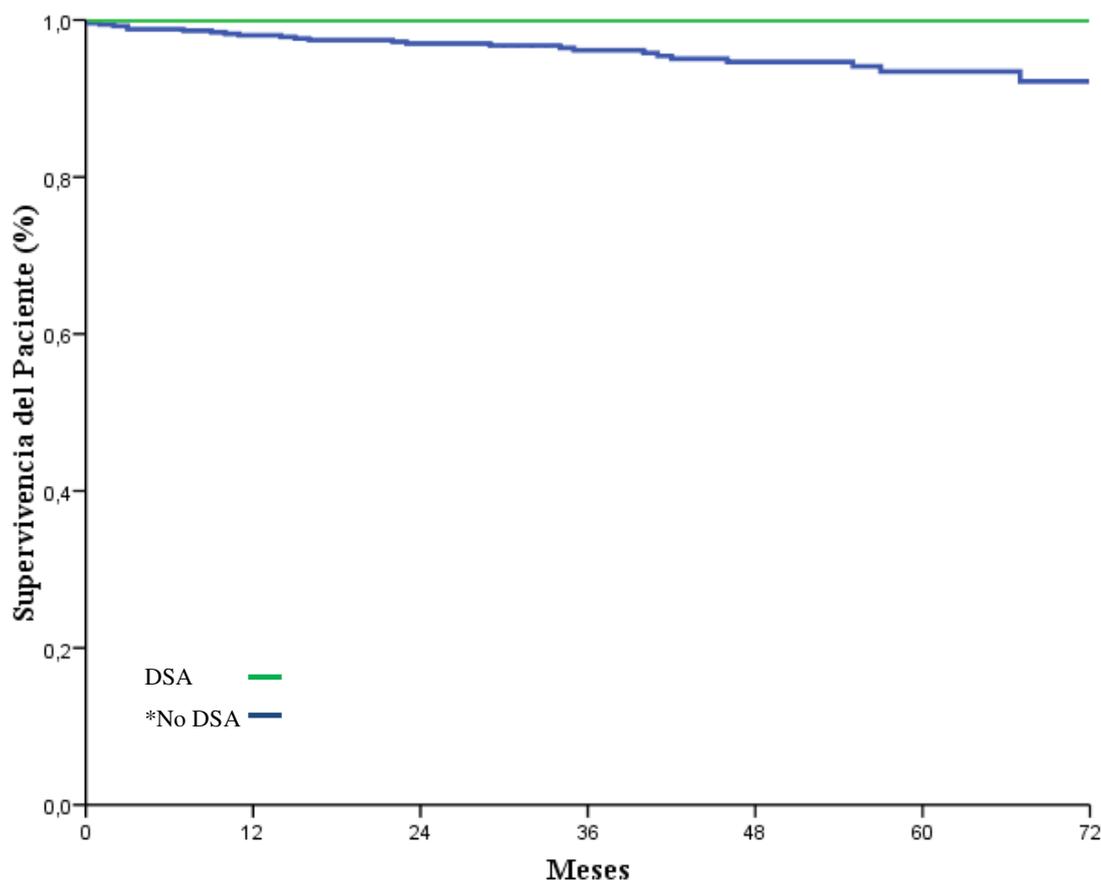
Tampoco la había en los datos inmunológicos entre ambos grupos, salvo una mayor incidencia de RA celular, un menor tiempo de aparición de DSA postrasplante y una mayor fijación de C1q en los que tuvieron rechazo humoral (Tabla 29).

**Tabla 29. Datos inmunológicos de pacientes que formaron DSA y tuvieron o no rechazo humoral.**

	No Rechazo Humoral (n=30)	Rechazo Humoral (n=21)	p
Último PRA Virtual (%)	23,3±27,7	34,1±35,2	0,457
Máximo PRA Virtual (%)	30,4±30,8	41,7±39,6	0,422
Anticuerpos Anti-HLA Pre-Tx (%)	70,0	76,2	0,626
Tiempo aparición DSA anti-HLA (meses)	27,9±19,3	12,4±14,1	0,005
DSA Anti HLA Clase I (%)	43,3	42,9	0,973
DSA Anti HLA Clase II (%)	70	71,4	0,912
Activación de C1q DSA anti HLA (%)	13,3	38,1	0,040
Último CDC (%)	10,3±20,2	14,4±24,8	0,938
Máximo CDC (%)	23,2±32,5	31,6±36,9	0,992
Rechazo Agudo Celular (%)	33,3	85,7	<0,001
Rechazo Agudo Celular Excluyendo Bordeline (%)	6,7	52,4	<0,001

## 12. SUPERVIVENCIA DEL PACIENTE

No se observaron diferencias significativas ( $p=0,122$ ) en la supervivencia del paciente entre los pacientes con y sin DSA. La supervivencia del paciente en el grupo DSA fue del 100% y en el que no presentaron DSA del 98,0% en el primer año, del 96,1% al tercer año y del 92,2% al sexto año del trasplante (Fig. 44).



Nº en Riesgo						
DSA	48	44	31	17	10	2
No DSA	493	426	309	216	125	48

\*No DSA: en este grupo se incluyen aquellos pacientes que nunca presentaron anticuerpos anti-HLA o presentaron anticuerpos anti-HLA no DSA durante el postrasplante.

Figura 44. Supervivencia del paciente en función de la aparición de DSA (log-rank: 2,394;  $p=0,122$ ).

La supervivencia de los pacientes que presentaron DSA en función del rechazo humoral o no, fueron del 100% en ambos grupos.

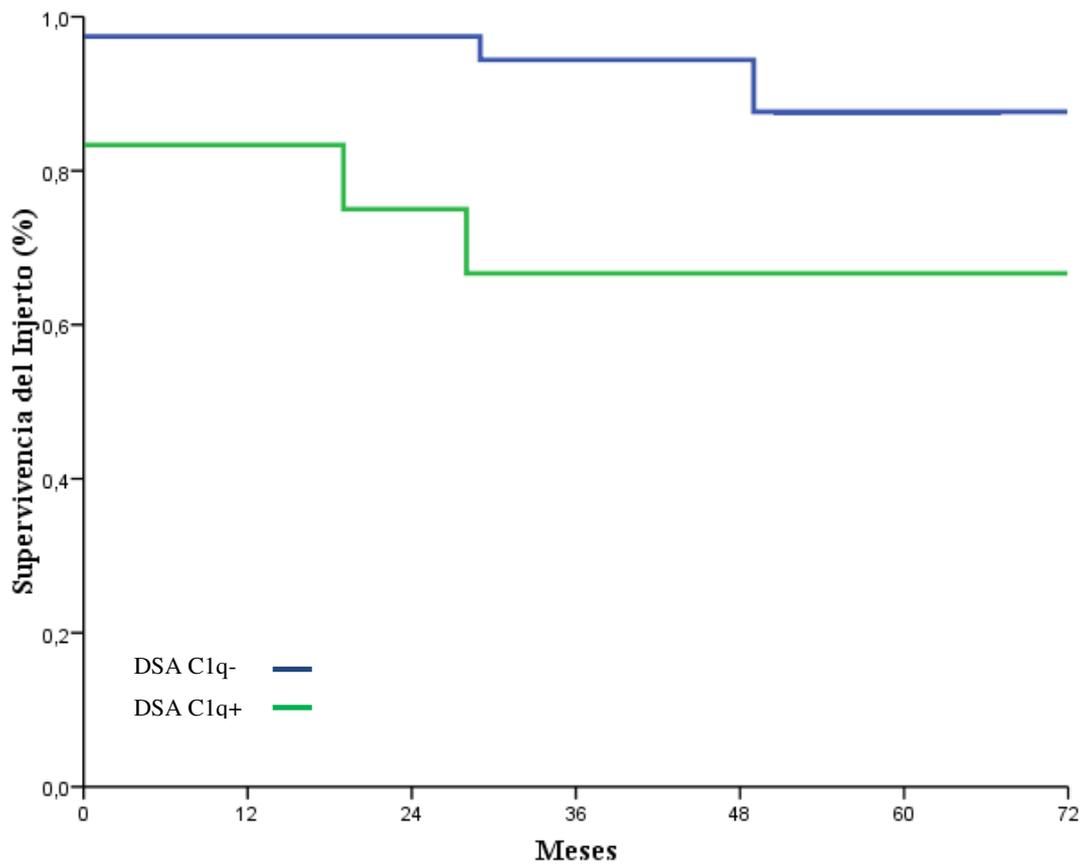
### 13. FIJACIÓN DE C1q

Los pacientes con DSA que fijan la fracción C1q del complemento tuvieron un mayor riesgo de rechazo humoral ( $p=0,040$ ) y de pérdida de injerto ( $p=0,024$ ) que los pacientes que no lo fijaron. En los que fijan la fracción C1q del complemento, el 66,7% tuvieron rechazo humoral, mientras los que no lo fijan el porcentaje desciende al 33,3%. La pérdida del injerto en los primeros fue del 33,3% y del 7,7% en los que no fijaron C1q (Tabla 30).

**Tabla 30. Efecto de los DSA sobre el C1q y el riesgo de rechazo humoral y de pérdida del injerto.**

	Activan C1q (n=12)	No Activa C1q (n=39)	p
Rechazo Humoral (%)	66,7 (8)	33,3 (13)	0,040
Pérdida de Injerto (%)	33,3 (4)	7,7 (3)	0,024

La supervivencia de injertos no censurada y censurada, entre pacientes con DSA que fijaron o no C1q mostró diferencias significativas ( $p=0,017$ ). La supervivencia del injerto en aquellos pacientes con DSA que no fijaron el C1q fue del 97,4% al año, 94,4% al tercer año y 87,6% al sexto año de evolución postrasplante. Mientras que, en aquellos que si fijaron la fracción C1q del complemento fue de 83,3% al año y del 66,7% a partir del tercer año postrasplante (Fig. 45).



Nº en Riesgo	
DSA C1q -	38      34      25      15      8      2
DSA C1q +	10      9      6      2      2      0

Figura 45. Supervivencia de injertos en pacientes que desarrollan DSA que no fijan o fijan la fracción C1q del sistema del complemento (log-rank: 5,746; p=0,017).

#### 14. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA APARICIÓN DE DSA

El análisis univariante realizado a través de la regresión logística, mostró como factores de riesgo de aparición de DSA: el retrasplante, FRI, TLE, RA celular, RA celular excluyendo borderline, anticuerpos pretrasplante, PRA $\geq$ 25% y creatinina sérica a los 12 meses (Tabla 31).

**Tabla 31. Análisis univariante (regresión logística) de factores de riesgo de la aparición de DSA.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad Donante	0,99	0,98	1,01	0,465
Edad Receptor	0,98	0,96	1,00	0,074
Sexo Donante	1,02	0,57	1,82	0,941
Sexo Receptor	0,62	0,38	1,12	0,105
Retrasplante	8,15	4,41	15,05	<0,001
TIF	1,01	0,95	1,07	0,747
FRI	2,50	1,38	4,55	0,003
TTO. de Inducción	2,25	0,87	5,79	0,095
TLE	1,02	1,01	1,02	<0,001
Rechazo Celular	5,78	3,19	10,47	<0,001
Rechazo Celular (excluyendo borderline)	4,28	2,11	8,68	<0,001
Anticuerpos Pretrasplante	16,64	8,58	32,27	<0,001
PRA $\geq$ 25%	10,85	5,71	20,63	<0,001
Creatinina 12 meses	1,71	1,04	2,83	0,035

TIF: tiempo de isquemia fría; FRI: función retrasada del injerto; TLE: tiempo en lista en espera; PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos.

En el modelo de análisis multivariantes de regresión logística, los factores asociados a la formación de DSA fueron el RA celular, FRI y la presencia de anticuerpos anti-HLA no donante específicos pretrasplante, aumentando el riesgo 5, 2 y 12 veces, respectivamente (Tabla 32).

**Tabla 32. Análisis multivariante (regresión logística) de factores de riesgos asociado a la formación de DSA.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Retrasplante	1,63	0,71	3,70	0,247
FRI	2,05	1,01	4,15	0,046
Anticuerpos Pretrasplante	12,34	5,34	28,50	<0,001
TTO. de Inducción	1,13	0,38	3,39	0,832
Rechazo Celular	5,80	2,82	11,90	<0,001

FRI: función retrasada del injerto.

No hubo interacción entre anticuerpos pretrasplante y la condición de retrasplante, aunque es posible que existiera colinealidad. Cuando estratificamos los pacientes con y sin retrasplante, se observó como factor de riesgo de la formación de DSA los anticuerpos pretrasplante. No sucedió lo mismo cuando estratificamos los pacientes con y sin anticuerpos pretrasplante, en dónde el retrasplante no fue un factor de riesgo asociado a la aparición de DSA. Por tanto, cuando no incluimos en el modelo los anticuerpos pretrasplante, los factores asociados fueron el retrasplante, la FRI y el RA celular, aumentando el riesgo 5, 2 y 5 veces respectivamente (Tabla 33).

**Tabla 33. Análisis multivariante (regresión logística) de factores de riesgos de la formación de DSA.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Retrasplante	5,42	2,62	11,22	<0,001
FRI	2,03	1,05	3,93	0,036
TLE	1,01	1,00	1,01	0,281
TTO. de Inducción	1,81	0,64	5,11	0,259
Rechazo Celular	5,68	2,92	11,03	<0,001

FRI: función retrasada del injerto; TLE: tiempo en lista en espera.

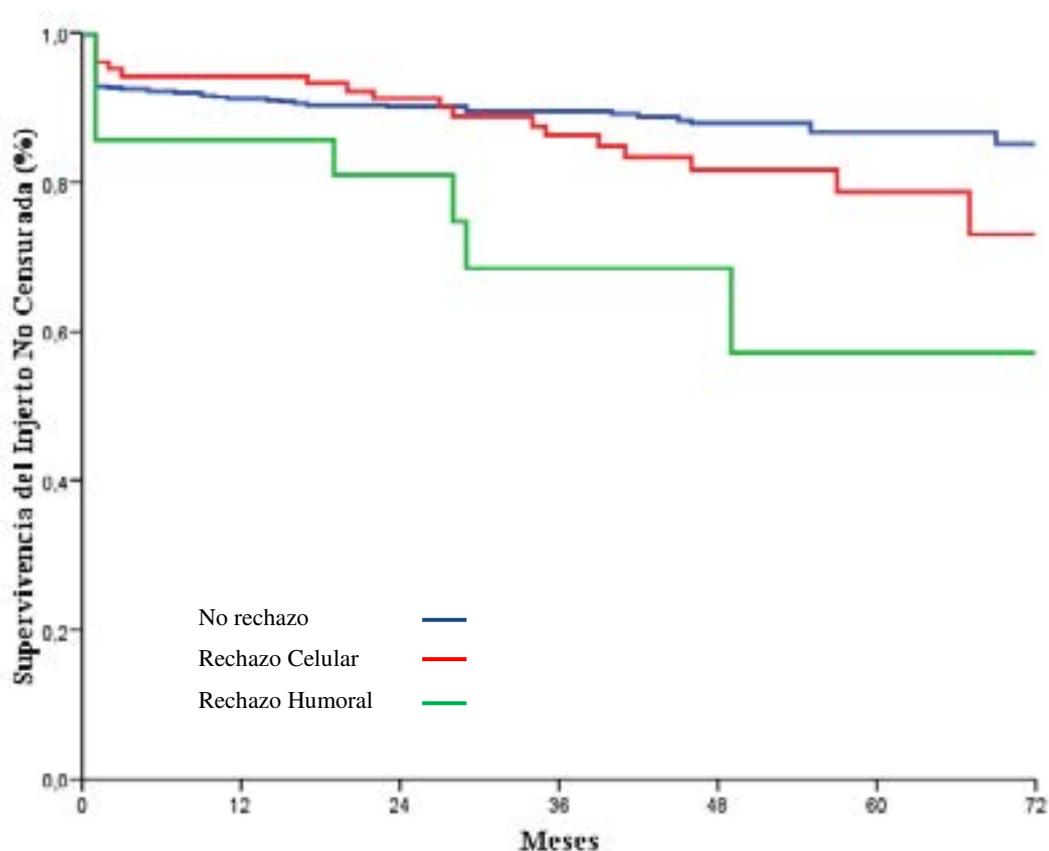
Los pacientes con retrasplante (n=82), con anticuerpos citotóxico pretrasplante (n=59) formaron un porcentaje significativamente mayor de DSA que aquellos sin anticuerpos citotóxicos pretrasplante (n=23), (37,3% vs 13%, p=0,032). Esto nos lleva a la conclusión de que el retrasplante fue un factor de riesgo de formación de DSA, cuando los pacientes fueron portadores de anticuerpos citotóxicos preformados.

Destacar que los pacientes que formaron DSA tuvieron FRI en un porcentaje significativamente mayor (54,2% vs 45,8%, p=0,002).

## 15. SUPERVIVENCIA DE INJERTOS Y PACIENTES EN ENFERMOS CON Y SIN RECHAZO (CELULAR O HUMORAL)

### a. Supervivencia del injerto no censurada.

Se observaron diferencias significativas ( $p=0,008$ ) entre los grupos. Los que no presentaron rechazo tuvieron una supervivencia del injerto no censurada del 91,2% al primer año, del 89,6% al tercer año y del 85,2% al sexto años postrasplante. El grupo de rechazo celular tuvo una supervivencia del 94,2% al primer año, 86,3% al tercer año y 73,1% al sexto año. En el grupo de rechazo humoral la supervivencia fue del 85,7% al primer año, 68,5% al tercer año y 57,1% al sexto año (Fig. 46).



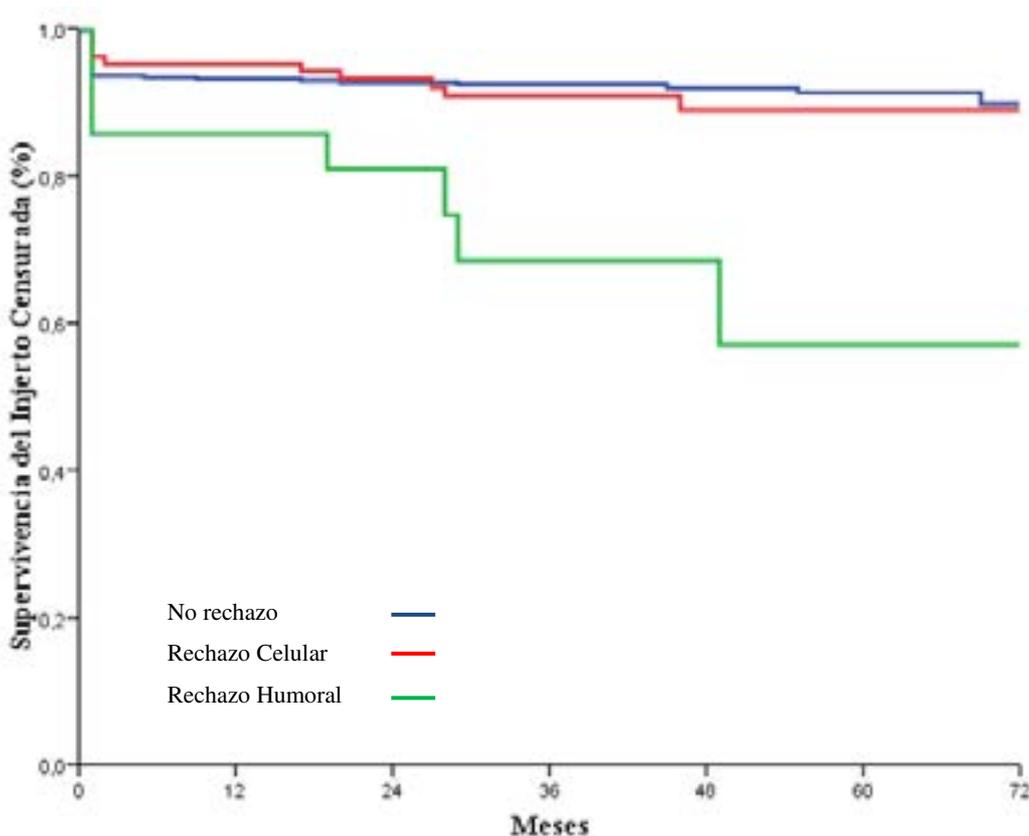
Nº en Riesgo							
No Rechazo	425	371	264	187	107	42	
Rechazo Celular	98	83	65	40	24	5	
Rechazo Humoral	18	15	10	6	3	1	

Figura 46. Supervivencia del injerto no censurada para el rechazo humoral, rechazo celular y no rechazo (log-rank: 9,596;  $p=0,008$ ).

La comparación por estratos mostró que las diferencias en la supervivencia del injerto no censurada estaban entre el grupo del rechazo humoral y el no rechazo ( $p=0,003$ ). Así mismo, hubo una tendencia a la diferencia entre el rechazo humoral y el celular ( $p=0,063$ ).

**b. Supervivencia del injerto censurada.**

La supervivencia del injerto censurada para los grupos rechazo humoral, rechazo celular y no rechazo, mostró diferencias significativas ( $p<0,001$ ). La supervivencia del injerto censurada para el grupo sin RA fue del 93,1% al primer año, 92,4% al tercer año y 89,7% al sexto año tras el trasplante. Para el grupo del rechazo celular fue del 95,2% al primer año, 90,8% al tercer año y 88,9% al sexto año. La supervivencia del injerto censurada para el grupo con rechazo humoral fue del 85,7% al primer año, 68,5% al tercer año y 57,1% al sexto año (Fig. 47).



Nº en Riesgo						
No Rechazo	425	371	264	187	107	42
Rechazo Celular	98	83	65	40	24	5
Rechazo Humoral	18	15	10	6	3	1

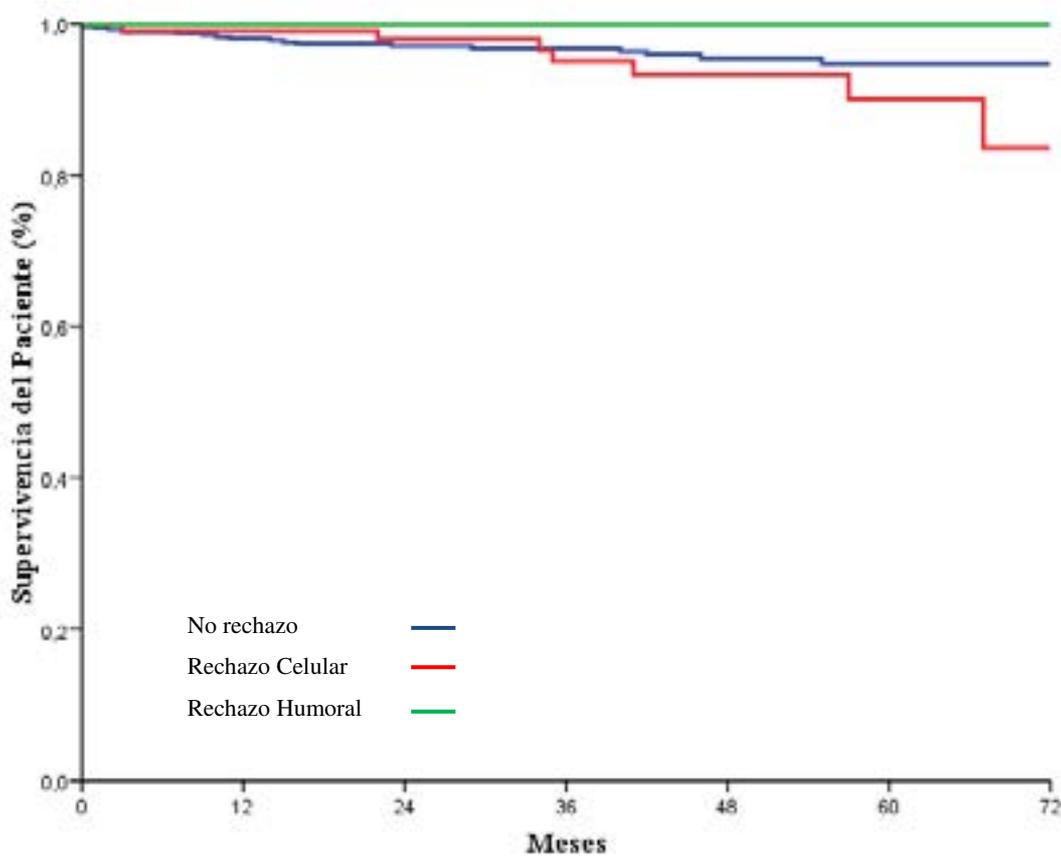
Figura 47. Supervivencia del injerto censurada para el rechazo humoral, rechazo celular y no rechazo (log-rank: 15,671;  $p<0,001$ ).



En la supervivencia del injerto censurada existieron diferencias entre el grupo del rechazo humoral y aquellos que no lo presentaron ( $p < 0,001$ ), y entre rechazo humoral y el celular ( $p = 0,003$ ).

**c. Supervivencia del paciente.**

La supervivencia del paciente no mostró diferencias significativas ( $p = 0,331$ ) entre los grupos de rechazo humoral o celular y no rechazo. La supervivencia del paciente en el grupo sin rechazo fue del 98,0% al primer año, 96,7% al tercer año y 94,7% al sexto año postrasplante. En los pacientes con rechazo celular del 99,0% al primer año, 95,0% al tercer año y 83,6% al sexto año y los que tienen rechazo humoral del 100,0% a los seis años (Fig. 48).



N° en Riesgo						
No Rechazo	425	371	264	187	107	42
Rechazo Celular	98	83	65	40	24	5
Rechazo Humoral	18	15	10	6	3	1

Figura 48. Supervivencia del paciente para el grupo rechazo humoral, rechazo celular y no rechazo (log-rank: 2,211;  $p = 0,331$ ).



#### d. Factores de riesgos asociados al rechazo humoral.

El análisis univariante de regresión logística, mostró cómo factores de riesgos de rechazo humoral: el retrasplante, el TLE, el rechazo celular, el RA celular excluyendo el borderline, los anticuerpos anti-HLA pretrasplante,  $PRA \geq 25\%$  y la creatinina sérica a los 12 meses (Tabla 34).

**Tabla 34. Análisis univariante (regresión logística) de factores de riesgo de rechazo humoral.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad donante	0,99	0,96	1,01	0,252
Edad receptor	0,98	0,95	1,01	0,209
Sexo donante	1,38	0,56	3,37	0,484
Sexo receptor	0,76	0,32	1,84	0,542
Retrasplante	5,11	2,08	12,54	<0,001
TIF	0,98	0,90	1,06	0,555
FRI	1,79	0,71	4,47	0,216
TTO. de Inducción	4,89	0,65	36,83	0,123
TLE	1,02	1,01	1,03	<0,001
Rechazo celular	26,89	7,78	92,96	<0,001
Rechazo celular (excluyendo borderline)	13,83	5,55	34,43	<0,001
Anticuerpos Pretrasplante	16,00	5,72	44,73	<0,001
$PRA \geq 25\%$	11,44	4,63	28,26	<0,001
Creatinina 12 meses	2,81	1,43	5,52	0,003

TIF: tiempo de isquemia fría; FRI: función retrasada del injerto; TLE: tiempo de lista en espera; PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos.

El análisis de regresión logística multivariante incluyendo los factores de riesgo dos a dos, mostró que los factores asociados al desarrollo de rechazo humoral fueron los anticuerpos pretrasplante, el RA celular, el RA celular excluyendo el borderline, el TLE y la creatinina sérica a los 12 meses (Tabla 35).

**Tabla 35. Análisis multivariante (regresión logística) de factores de riesgos asociados al rechazo humoral.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
<b>Modelo 1.</b>				
Anticuerpos Pretrasplante	13,14	4,46	38,72	<0,001
Rechazo Celular	22,67	6,35	80,98	<0,001
<b>Modelo 2.</b>				
Anticuerpos Pretrasplante	19,60	6,35	60,50	<0,001
Rechazo Celular (excluyendo Bordeline)	17,92	6,12	52,46	<0,001
<b>Modelo 3.</b>				
Anticuerpos Pretrasplante	15,46	4,91	48,63	<0,001
Retrasplante	1,07	0,38	3,00	0,893
<b>Modelo 4.</b>				
Anticuerpos Pretrasplante	11,84	4,03	34,83	<0,001
TLE	1,01	1,00	1,02	0,043
<b>Modelo 5.</b>				
Anticuerpos Pretrasplante	10,40	2,92	37,04	<0,001
PRA $\geq$ 25%	2,05	0,67	6,32	0,211
<b>Modelo 6.</b>				
Anticuerpos Pretrasplante	16,78	5,34	52,80	<0,001
Creatinina 12 meses	2,64	1,24	5,63	0,012

TLE: tiempo de lista en espera; PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos.

**e. Factores de riesgo asociados al rechazo humoral en pacientes con DSA.**

En el análisis univariante los factores de riesgo asociados al rechazo humoral en pacientes con DSA fueron: el RA celular y la fijación de C1q (Tabla 36).

**Tabla 36. Análisis univariante (regresión logística) de factores de riesgos de rechazo humoral en pacientes con DSA.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad Donante	0,98	0,43	1,02	0,325
Edad Receptor	0,99	0,96	1,04	0,851
Sexo Receptor	1,33	0,43	4,10	0,615
Rechazo Celular Agudo	12,00	2,85	50,59	0,001
Retrasplante	0,66	0,21	2,02	0,462
FRI	0,64	0,20	2,04	0,445
TIF	0,94	0,84	1,06	0,309
TLE	1,01	0,99	1,02	0,169
TTO. de Inducción	3,20	0,33	30,94	0,315
Anticuerpo Pretrasplante	1,37	0,38	4,89	0,626
PRA $\geq$ 25%	1,65	0,54	5,09	0,383
Fijación C1q	4,00	1,01	15,78	0,048
MFI Acumulada				
• MFI Tercil(1)	0,91	0,202	4,10	0,901
• MFI Tercil (2)	2,57	0,598	11,06	0,204
MFI Máximo				
• MFI Tercil (1)	1,56	0,362	6,69	0,553
• MFI Tercil (2)	1,56	0,362	6,69	0,553

TIF: tiempo de isquemia fría; FRI: función retrasada del injerto; TLE: tiempo de lista en espera; PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos; MFI: Intensidad de Fluorescencia Media.

En el multivariante los pacientes con RA celular que han formado DSA tienen 29 veces más riesgo de tener rechazo humoral, mientras que la fijación del C1q confiere 14 veces más (Tabla 37).

**Tabla 37. Análisis multivariante (regresión logística) de factores de riesgos de rechazo humoral en pacientes con DSA.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Rechazo Celular Agudo	29,82	3,49	255,04	0,002
Fijación C1q	14,66	1,48	145,66	0,022

**f. Factores de riesgos asociados a la pérdida de injerto en pacientes con DSA.**

De las variables incluidas en el análisis univariante, la fijación de C1q fue un factor de riesgo asociado a la pérdida de injerto en los pacientes que desarrollaron DSA (Tabla 38).

**Tabla 38. Análisis univariante (regresión logística) de factores de riesgos de pérdida del injerto en pacientes con DSA.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad Donante	1,01	0,96	1,07	0,679
Edad Receptor	1,03	0,75	1,10	0,266
Sexo Receptor	1,22	0,24	6,09	0,811
Rechazo Celular	2,28	0,40	13,05	0,353
Rechazo Celular excluido Bordeline	5,19	0,98	27,45	0,053
Retrasplante	0,37	0,06	2,09	0,257
FRI	0,53	0,08	3,49	0,507
TIF	0,95	0,82	1,09	0,439
TLE	1,00	0,99	1,02	0,918
Anticuerpos Pretrasplante	0,44	0,09	2,30	0,334
PRA $\geq$ 25%	0,44	0,77	2,50	0,353
Fijación C1q	6,00	1,12	32,25	0,037
MFI Acumulada				
• MFI Tercil(1)	2,00	0,16	24,66	0,589
• MFI Tercil (2)	4,67	0,46	47,63	0,194
MFI Máximo				
• MFI Tercil (1)	0,93	0,11	7,59	0,945
• MFI Tercil (2)	1,50	0,21	10,52	0,683

TIF: tiempo de isquemia fría; FRI: función retrasada del injerto; TLE: tiempo de lista en espera; PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos; MFI: Intensidad de Fluorescencia Media.

## COEFICIENTE DE VARIABILIDAD DE LOS INMUNOSUPRESORES

### 1. COEFICIENTE DE VARIABILIDAD DE NIVELES EN SANGRE DE TACROLIMUS EN LOS PACIENTES QUE PRESENTARON DSA

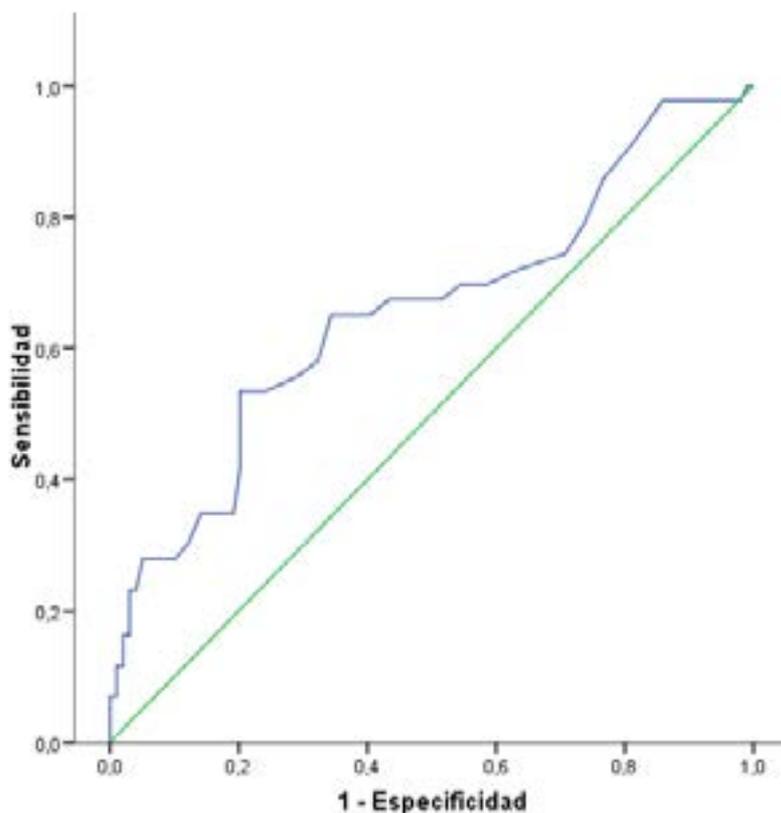
Entre ambos grupos de pacientes no hubo diferencias estadísticamente significativas en el sexo, edad del receptor y tiempo postrasplante (Tabla 39).

**Tabla 39. Características basales del grupo experimental y de control.**

	DSA n=51	Grupo Control n=99	P
Sexo Receptor (H) %	52,9	55,6	0,761
Edad Receptor (años)	46,8±13,6	46,7±7,0	0,954
Tiempo Postrasplante (meses)	41,5±19,0	46,5±17,5	0,107

Los pacientes con DSA tuvieron un coeficiente de variabilidad (CV) de niveles en sangre de TaC de 29,7±15,8% frente al grupo control que fue de 21,4±9,9% (p=0,002).

La curva ROC muestra un área bajo la curva del CV de los niveles en sangre de TaC fue del 0,66 (p=0,003).



Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
0,66	0,053	0,003	0,553	0,760

Figura 49. Curva ROC del CV de niveles en sangre de TaC frente a la aparición de DSA.

Al análisis del índice de Youden mostró que el punto de corte para el CV para predecir DSA fue del 27,5%. Por tanto, los pacientes fueron divididos en aquellos con  $CV < 27,5$  vs.  $CV \geq 27,5$ .

El análisis individual de los niveles en sangre de TaC empleados en el cálculo del CV tuvieron una curva ROC que se aproximó a la nulidad (0,5) (Tabla 40).

**Tabla 40. Área bajo la curva para los niveles individualizados de TaC en sangre.**

Variables	Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
				Límite superior	Límite inferior
Niveles de TaC 1	0,516	0,058	0,766	0,402	0,630
Niveles de TaC 2	0,543	0,056	0,418	0,434	0,652
Niveles de TaC 3	0,481	0,057	0,725	0,370	0,593
Niveles de TaC 4	0,493	0,053	0,894	0,388	0,598
Niveles de TaC 5	0,535	0,053	0,509	0,431	0,640

#### a. Análisis univariante

El análisis univariante mediante regresión logística, mostró que las variables de riesgo asociadas a la aparición de DSA fueron; el  $CV \geq 27,5$ , el rechazo celular, retrasplante, FRI, TLE, tratamiento de inducción, anticuerpos pretrasplante y el  $PRA \geq 25\%$  (Tabla 41).

**Tabla 41. Análisis univariante (regresión logística) de los factores de riesgo asociados a la aparición de DSA.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad Donante	1,02	0,99	1,04	0,157
Edad Receptor	1,00	0,97	1,04	0,944
Sexo Receptor	0,90	0,46	1,77	0,761
$CV \geq 27,5$	4,54	2,10	9,86	<0,001
Rechazo Celular	5,13	2,43	10,79	<0,001
Retrasplante	8,56	3,64	20,10	<0,001
FRI	2,85	1,40	5,83	0,004
TIF	1,01	0,94	1,08	0,850
TLE	1,01	1,00	1,02	0,013
TTO. de Inducción	3,08	1,10	8,63	0,032
Anticuerpos Pretrasplante	23,52	9,59	57,71	<0,001
$PRA \geq 25\%$	12,73	4,72	34,36	<0,001

TIF: tiempo de isquemia fría; FRI: función retrasada del injerto; TLE: tiempo de lista en espera; PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos.

### b. Análisis Multivariante.

El análisis multivariante, mediante regresión logística, de los factores de riesgos, mostró que el rechazo celular y los anticuerpos anti-HLA pretrasplante se asociaron significativamente a la aparición de DSA (Tabla 42).

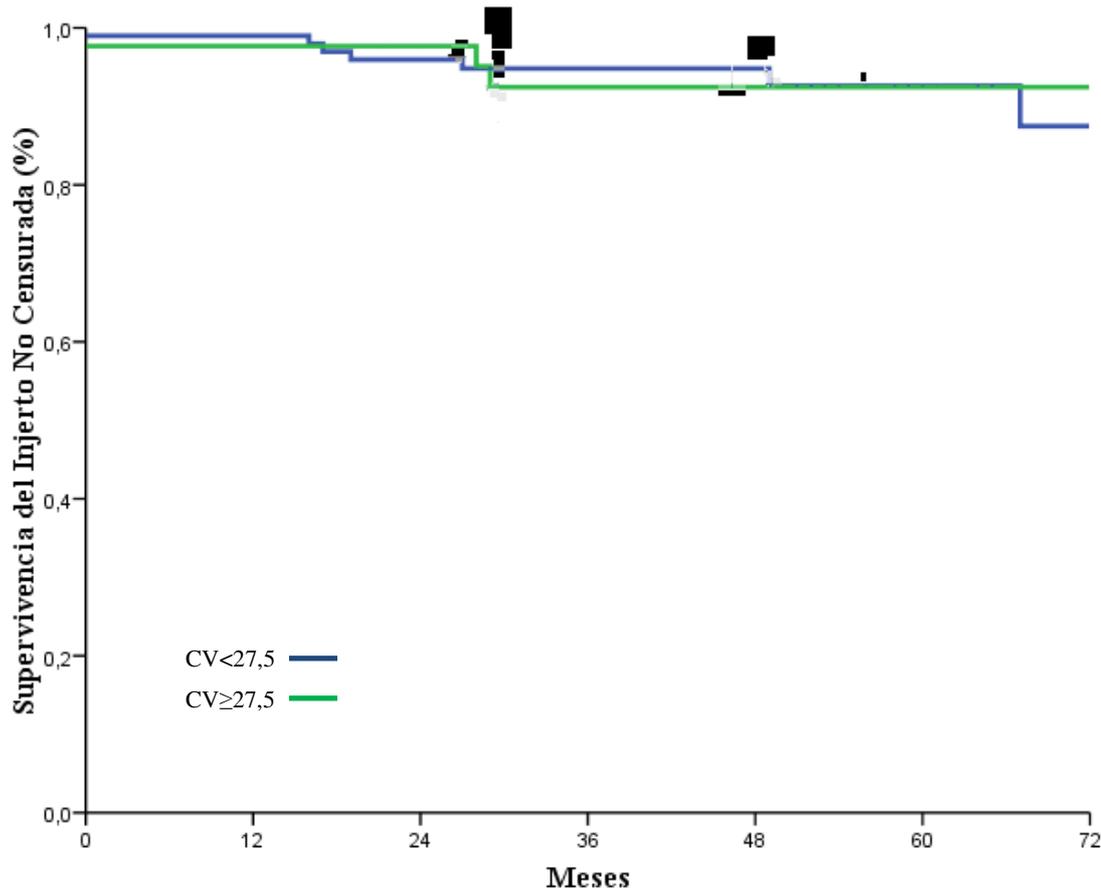
**Tabla 42. Análisis multivariante (regresión logística) de factores de riesgo asociados a la formación de DSA.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Rechazo Celular	4,83	1,80	12,98	0,002
Retrasplante	1,96	0,48	8,10	0,352
TLE	0,99	0,98	1,01	0,276
FRI	2,14	0,80	5,72	0,128
Anticuerpos Pretrasplante	16,13	4,82	54,01	<0,001

TLE: tiempo en lista de espera; FRI: función retrasada del injerto.

**c. Supervivencia del Injerto no censurada en función del coeficiente de variabilidad.**

No se observaron diferencias significativas en la supervivencia del injerto no censurada entre los pacientes que presentaron  $CV < 27,5$  vs  $\geq 27,5$  ( $p=0,965$ ). La supervivencia del injerto censurada en los pacientes que presentaron un  $CV < 27,5$  fue del 99,0% al año, del 94,8% al tercer año y del 87,5% al sexto año. Los pacientes con  $CV \geq 27,5$  la supervivencia del injerto fue del 97,7% al año y del 92,5% a partir del tercer año (Fig. 50).

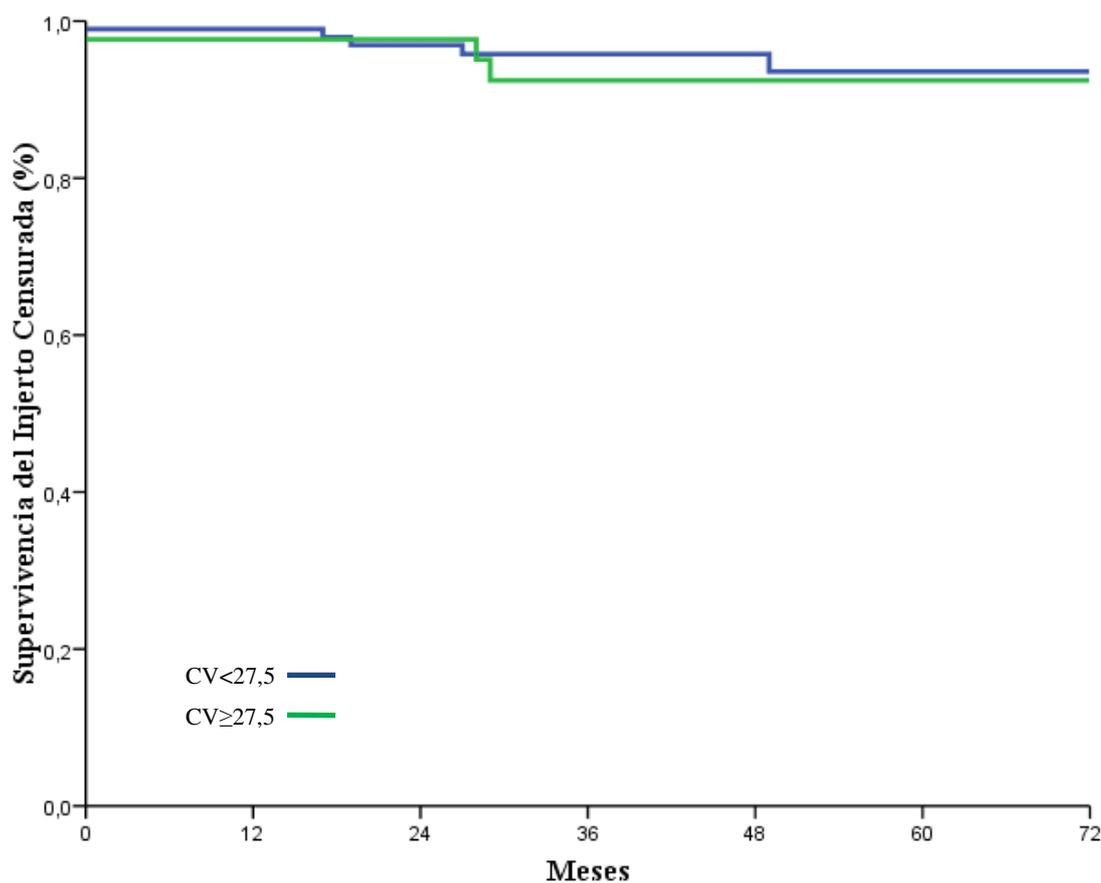


Nº en Riesgo						
CV < 27,5	98	92	65	45	24	10
CV ≥ 27,5	42	39	27	18	11	2

Figura 50. Supervivencia de injertos no censurada en pacientes que presentaron un  $CV < y \geq 27,5$  (log-rank: 0,002;  $p=0,965$ ).

**d. Supervivencia del Injerto censurada en función del coeficiente de variabilidad.**

No hubo diferencias significativas en la supervivencia del injerto censurada ( $p=0,677$ ). La supervivencia del injerto censurada en los pacientes que presentaron un  $CV < 27,5$  fue del 99,0% al año, del 95,8% al tercer año y del 93,6% al sexto año. Los pacientes con  $CV \geq 27,5$  la supervivencia del injerto fue del 97,7% al año y del 92,5% a partir del tercer año (Fig. 51).



Nº en Riesgo						
CV < 27,5	98	92	65	45	24	10
CV ≥ 27,5	42	39	27	18	11	2

Figura 51. Supervivencia de injertos censurada en pacientes que presentaron un  $CV < y \geq 27,5$  (log-rank: 0,174;  $p=0,677$ ).

**e. Supervivencia del Paciente en función del coeficiente de variabilidad.**

No hubo diferencias significativas en función del CV en la supervivencia del paciente ( $p=0,350$ ). La supervivencia de los pacientes en el grupo  $CV < 27,5$  fue del 93,5% al sexto año postrasplante (Fig. 52).

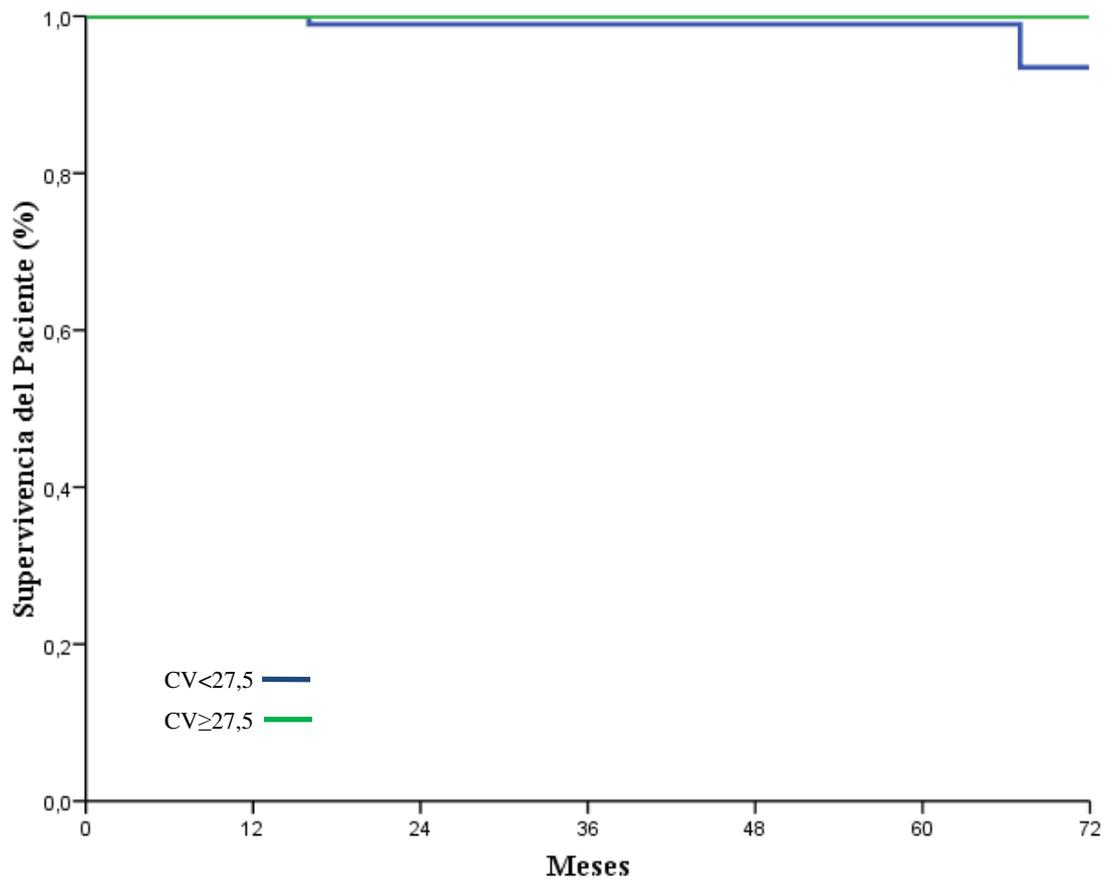


Figura 52. Supervivencia del paciente en función de un  $CV < 27,5$  y  $CV \geq 27,5$  (log-rank: 0,873;  $p=0,350$ ).

## 2. COEFICIENTE DE VARIABILIDAD DE NIVELES EN SANGRE DE TACROLIMUS EN LOS PACIENTES QUE PRESENTARON RECHAZO HUMORAL

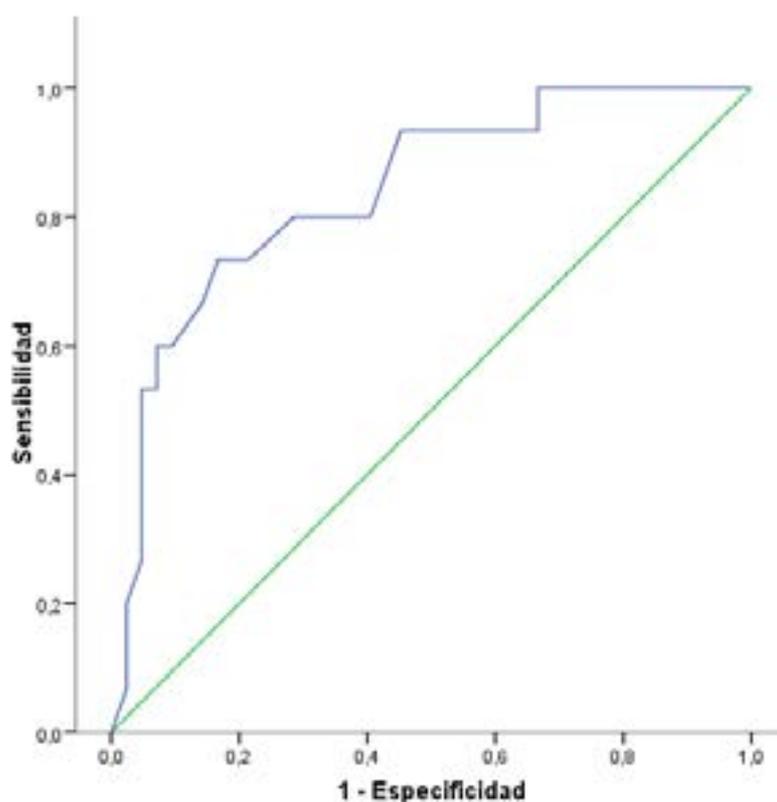
Entre ambos grupos de pacientes, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la edad, sexo y tiempo de seguimiento (Tabla 43).

**Tabla 43. Características basales de los grupos experimental y control.**

	Rechazo Humoral n=21	Grupo Control n=42	P
Sexo Receptor (H) %	57,1	59,5	0.856
Edad Receptor (años)	46,4±14,5	49,4±11,9	0.389
Tiempo Postrasplante (meses)	35,1±22,0	44,5±17,5	0.071

Los pacientes con rechazo humoral tuvieron un CV del 38,3±14,3% y el grupo control de 20,7±11,0% (p<0,001).

El área bajo de la curva del CV (%) de los niveles de TaC evaluando el área bajo la curva mediante la curva ROC, fue del 0,84 (p<0,001).



Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite superior	Límite inferior
0,84	0,059	<0,001	0,724	0,956

Figura 53. Curva ROC del CV de TaC frente al rechazo humoral.

El cálculo del índice de Youden, mostró que un CV de  $\geq 27,5\%$  fue el mejor predictor de rechazo humoral ( $p < 0,001$ ). Los pacientes por tanto, fueron divididos en aquellos con  $CV < 27,5$  vs  $CV \geq 27,5$  para su análisis.

El análisis individual de los niveles en sangre de TaC empleados en el cálculo del CV tienen una curva ROC que se aproxima a la nulidad (0,5) (Tabla 44).

**Tabla 44. Área bajo la curva para los niveles individualizados de TaC en sangre.**

Variables	Área	Error típ.(a)	Sig. asintótica(b)	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
				Límite superior	Límite inferior
Niveles TaC 1	0,475	0,096	0,789	0,287	0,664
Niveles TaC 2	0,460	0,102	0,663	0,260	0,659
Niveles TaC 3	0,557	0,104	0,539	0,353	0,761
Niveles TaC 4	0,561	0,102	0,507	0,361	0,762
Niveles TaC 5	0,494	0,110	0,945	0,278	0,710

**a. Análisis univariante**

El análisis univariante mediante regresión logística muestra que los factores de riesgo asociados a rechazo humoral fueron:  $CV \geq 27,5$ , rechazo celular, retrasplante, TLE, anticuerpos pretrasplante y  $PRA \geq 25\%$  (Tabla 45).

**Tabla 45. Análisis univariante (regresión logística) de factores de riesgo asociados al rechazo humoral.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
Edad Donante	0,99	0,95	1,02	0,432
Edad Receptor	0,98	0,94	1,02	0,383
Sexo Receptor	0,91	0,31	2,62	0,856
$CV \geq 27,5$	13,75	3,38	55,92	$< 0,001$
Rechazo Celular	36,00	8,06	160,85	$< 0,001$
Retrasplante	3,75	1,15	12,27	0,029
FRI	2,54	0,82	7,88	0,107
TIF	0,99	0,89	1,09	0,802
TLE	1,02	1,00	1,03	0,019
TTO. de Inducción	8,00	0,96	66,45	0,054
Anticuerpos Pretrasplante	16,00	4,40	58,19	$< 0,001$
$PRA \geq 25\%$	8,14	2,29	28,90	0,001

CV: coeficiente de variabilidad. TIF: tiempo de isquemia fría; FRI: función retrasada del injerto; TLE: tiempo de lista en espera; DSA: Anticuerpos donante específicos; PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos.

**b. Análisis multivariante.**

El análisis de regresión logística multivariante incluyendo los factores de riesgo dos a dos, mostró que los factores asociados al desarrollo de rechazo humoral fueron: el  $CV \geq 27,5\%$ , la aparición de RA celular, la presencia de anticuerpos pretrasplante, un  $PRA \geq 25\%$ , el retrasplante y el TLE (Tabla 46).

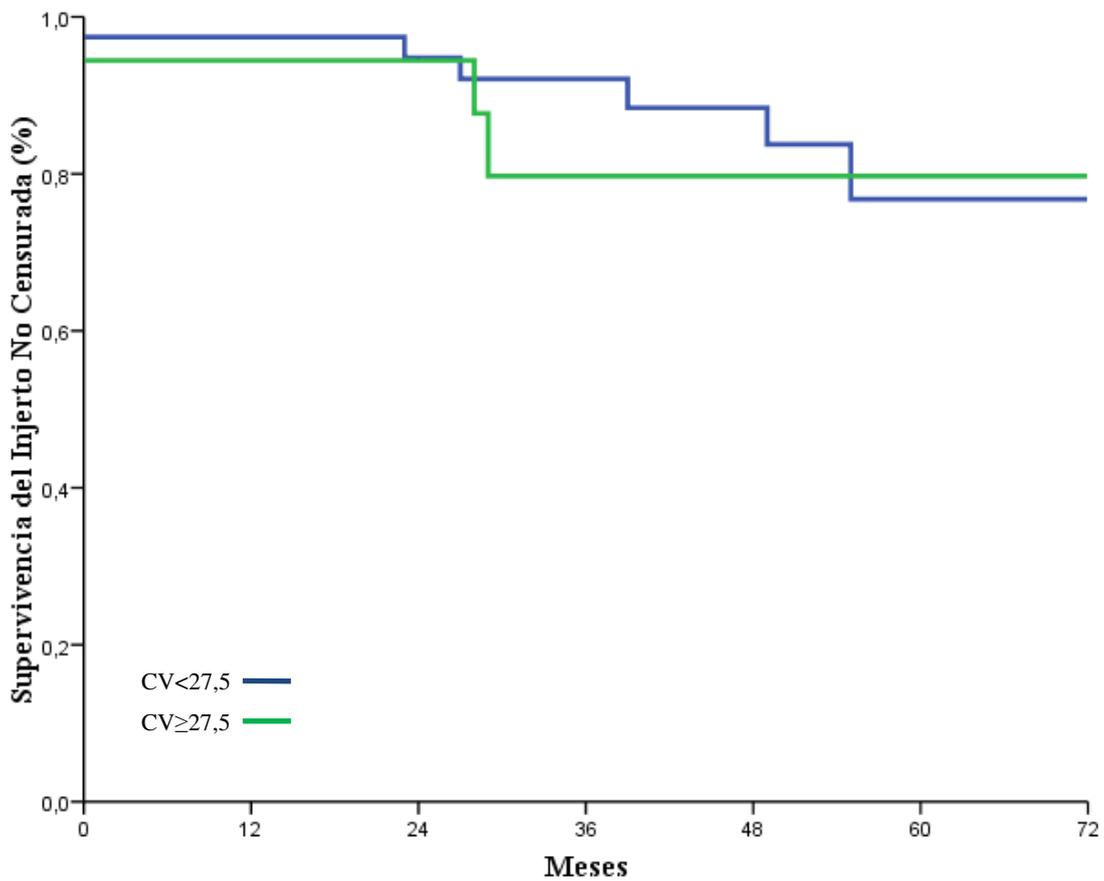
**Tabla 46. Análisis multivariante (regresión logística) de los factores de riesgo asociados al rechazo humoral.**

Variables	OR	I.C. 95%		P
		Inferior	Superior	
<b>Modelo 1.</b>				
CV $\geq$ 27,5	12,40	2,10	73,76	0,006
Rechazo Celular	21,94	3,66	131,59	0,001
<b>Modelo 2.</b>				
CV $\geq$ 27,5	11,61	1,88	71,61	0,008
Anticuerpos Pretrasplante	28,44	4,20	192,68	0,001
<b>Modelo 3.</b>				
CV $\geq$ 27,5	11,47	2,42	54,31	0,002
PRA $\geq$ 25%	8,91	1,76	45,16	0,008
<b>Modelo 4.</b>				
CV $\geq$ 27,5	18,02	3,29	98,83	0,001
Retrasplante	10,47	1,85	59,29	0,008
<b>Modelo 5</b>				
CV $\geq$ 27,5	13,37	2,79	64,05	0,001
TLE	1,02	1,00	1,04	0,023

CV: coeficiente de variabilidad. PRA: panel de reactividad de anticuerpos citotóxicos; TLE: tiempo en lista de espera.

**c. Supervivencia del injerto no censurada en función del coeficiente de variabilidad.**

No hubo diferencias significativas entre el grupo que presentó un  $CV < 27,5$  vs  $\geq 27,5$  ( $p=0,666$ ). La supervivencia de los pacientes que presentaron un  $CV \geq 27,5$  fue del 94,4% al año y del 79,7% a partir del tercer año. Aquellos pacientes que presentaron un  $CV < 27,5$ , presentaron una supervivencia del injerto del 97,4% al año, del 92,1% al tercer año y del 76,8% al sexto año (Fig. 54)

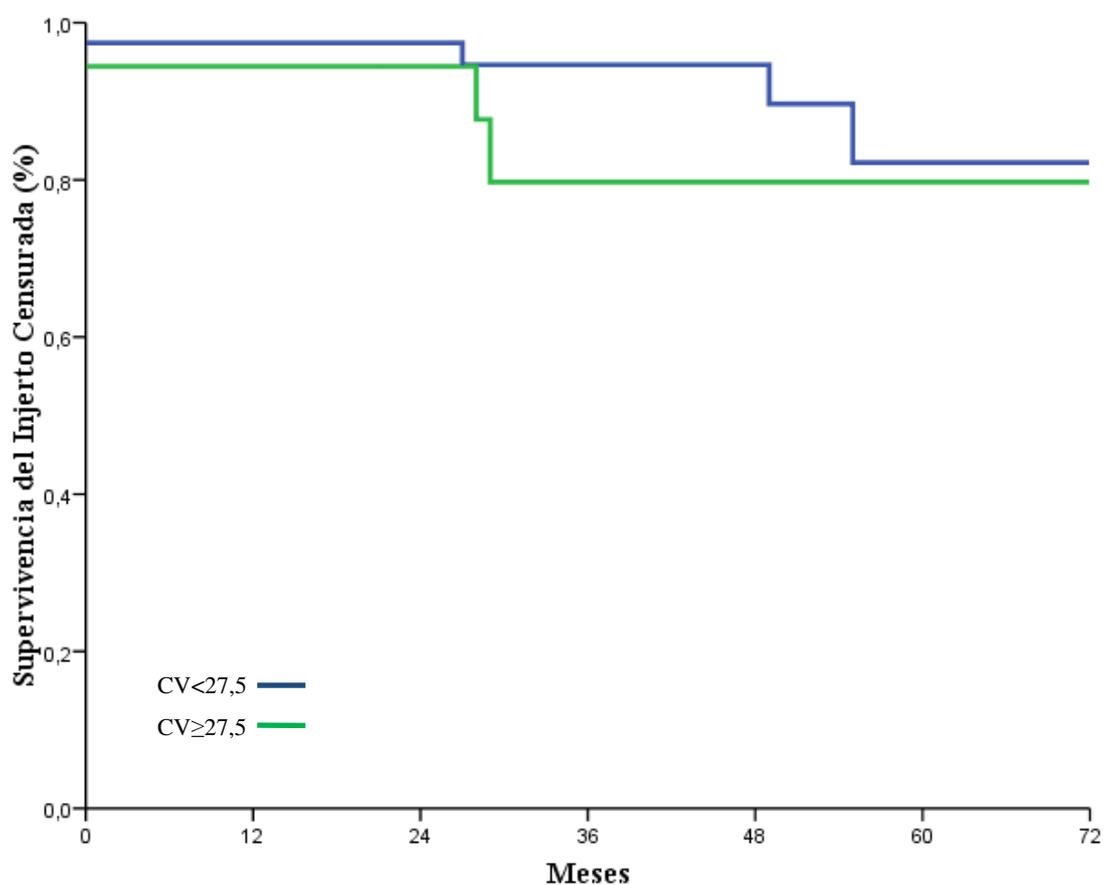


N° en Riesgo						
CV < 27,5	38	35	26	19	11	4
CV ≥ 27,5	17	16	7	4	2	1

Figura 54. Supervivencia de injertos en pacientes que presentaron un  $CV < y \geq 27,5$  (log-rank: 0,186  $p=0,666$ ).

**d. Supervivencia del injerto censurada en función del coeficiente de variabilidad.**

No hubo diferencias significativas entre el grupo que presentó un  $CV < 27,5$  vs  $\geq 27,5$  ( $p=0,363$ ). La supervivencia de los pacientes que presentaron un  $CV \geq 27,5$  fue del 94,4% al año y del 79,7% a partir del tercer año. Aquellos pacientes que presentaron un  $CV < 27,5$ , presentaron una supervivencia del injerto del 97,4% al año, del 94,7% al tercer año y del 82,2% al sexto año (Fig. 55).



Nº en Riesgo						
CV < 27,5	38	35	26	19	11	4
CV ≥ 27,5	17	16	7	4	2	1

Figura 55. Supervivencia de injertos en pacientes que presentaron un  $CV < y \geq 27,5$  (log-rank: 0,827;  $p=0,363$ ).

**e. Supervivencia del paciente en función del coeficiente de variabilidad.**

No hubo diferencias significativas en función del CV en la supervivencia del paciente ( $p=0,511$ ). Únicamente falleció un paciente en el grupo de  $CV < 27,5$ .

## FUNCIÓN RENAL

El análisis de medidas repetidas muestra un descenso significativo de la creatinina sérica ( $p=0,003$ ) desde el momento del trasplante hasta el final del seguimiento, así como un aumento del filtrado glomerular ( $p=0,003$ ) (Fig. 56).

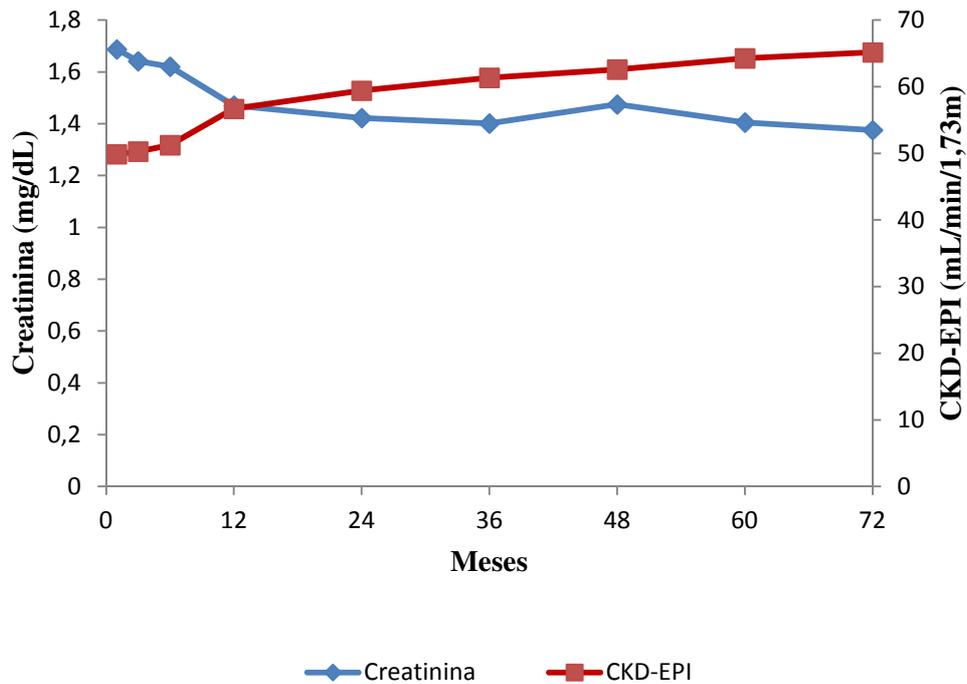


Figura 56. Evolución de la creatinina sérica (mg/dL) y del filtrado glomerular (mL/min/1,73m<sup>2</sup>) en los pacientes trasplantados.

### **a. Función renal en pacientes sin rechazo del injerto y en aquellos con rechazo humoral o celular.**

Hubo diferencias significativas en la creatinina sérica y en el filtrado glomerular en la mayoría de los tiempos analizados. Como era de esperar, los pacientes sin rechazo tienen la mejor función renal, mientras que la función renal más deteriorada se observó en los enfermos con rechazo humoral (Tabla 47).

A título de ejemplo, la función renal fue significativamente mejor a los 12 y 24 meses en los pacientes que nunca sufrieron un rechazo frente a los que lo tuvieron.

**Tabla 47. Evolución de la función renal en los pacientes con rechazo humoral, rechazo celular y no rechazo.**

FUNCIÓN RENAL									
CKD-EPI (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )									
Tiempo (meses)	1	3	6	12	24	36	48	60	72
No Rechazo	50,8±19,9	51,4±18,7	52,3±19,6	58,1±20,4	61,1±21,4	64,0±21,6	66,3±23,9	66,9±24,0	67,7±24,8
Rechazo Celular	46,7±21,2	45,9±21,0	47,4±22,6	51,7±22,8	53,1±22,7	53,7±24,8	50,0±27,4	55,7±31,7	52,6±19,6
Rechazo Humoral	45,0±20,1	46,4±19,1	46,1±23,0	47,8±22,0	48,5±20,3	34,6±17,6	38,5±20,9	42,1±16,0	46,0±33,1
P	0,117	0,026	0,52	0,005	0,001	<0,001	<0,001	0,047	0,206
Creatinina Sérica (mg/dL)									
No Rechazo	1,6±0,6	1,6±0,5	1,6±0,5	1,4±0,4	1,4±0,5	1,3±0,4	1,3±0,6	1,3±0,5	1,3±0,5
Rechazo Celular	1,9±0,9	1,9±0,9	1,9±0,8	1,7±0,7	1,7±0,8	1,7±0,7	2,1±1,6	1,8±0,9	1,6±0,5
Rechazo Humoral	2,1±1,7	1,8±0,7	1,9±0,8	1,8±0,9	1,7±0,7	2,6±1,3	2,5±1,4	2,0±0,9	2,1±1,6
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	0,066

**b. Función renal en pacientes que presentaron DSA.**

El análisis comparativo de la creatinina sérica y el GFR de estos grupos solo mostró diferencias aisladas a los 36 y 48 meses (Tabla 48).

**Tabla 48. Evolución de la función renal en los pacientes que formaron DSA.**

FUNCIÓN RENAL									
CKD-EPI (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )									
Tiempo (meses)	1	3	6	12	24	36	48	60	72
<b>No DSA</b>	50,4±20,1	50,4±19,2	51,7±20,2	57,0±20,9	60,1±22,1	62,7±22,6	64,2±25,3	65,5±25,9	66,3±24,9
<b>DSA</b>	44,8±20,9	48,7±20,3	46,9±22,1	52,9±23,4	52,9±19,8	47,3±22,9	43,0±20,2	49,0±21,3	51,0±22,4
P	0,071	0,571	0,127	0,206	0,036	<0,001	<0,001	0,053	0,239
Creatinina Sérica (mg/dL)									
<b>No DSA</b>	1,6±0,7	1,6±0,6	1,6±0,7	1,5±0,5	1,4±0,6	1,4±0,5	1,4±0,9	1,4±0,6	1,3±0,5
<b>DSA</b>	2,0±1,3	1,7±0,7	1,8±0,8	1,6±0,7	1,6±0,6	1,9±1,0	2,1±1,1	1,8±0,9	1,8±1,0
P	0,093	0,289	0,060	0,110	0,073	0,006	0,024	0,195	0,437

**c. Función renal en el grupo de pacientes que presentó DSA y Rechazo humoral.**

Los valores de creatinina sérica fueron mayores y el GFR menor en los pacientes con rechazo humoral, aunque solo fue significativo de forma aislada en el mes 36. No obstante, hay que citar que en el grupo con DSA sin rechazo humoral ningún paciente perdió el injerto y en cambio de los 21 con rechazo humoral, 7 (33,33%;  $p=0,001$ ) lo perdieron (Tabla 49).

**Tabla 49. Evolución de la función renal en los pacientes que presentaron DSA y rechazo humoral.**

FUNCIÓN RENAL									
CKD-EPI (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )									
Tiempo (meses)	1	3	6	12	24	36	48	60	72
<b>No Rechazo Humoral</b>	44,7±21,7	50,3±21,3	47,5±22,0	56,1±24,0	55,3±19,5	53,6±23,0	44,8±20,5	52,0±23,7	55,9±17,6
<b>Rechazo Humoral</b>	45,0±20,1	46,4±19,1	46,1±23,0	47,8±22,0	48,5±20,3	34,6±17,6	38,5±20,9	42,1±16,0	46,0±33,1
P	0,584	0,620	0,686	0,277	0,184	0,031	0,588	0,425	0,745
Creatinina Sérica (mg/dL)									
<b>No Rechazo Humoral</b>	1,9±0,9	1,7±0,8	1,8±0,8	1,5±0,5	1,5±0,5	1,6±0,7	1,9±1,0	1,7±1,1	1,5±0,4
<b>Rechazo Humoral</b>	2,1±1,7	1,8±0,7	1,9±0,8	1,9±0,9	1,7±0,7	2,6±1,3	2,5±1,4	2,0±0,9	2,1±1,6
P	0,887	0,398	0,741	0,139	0,319	0,019	0,301	0,425	0,638



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## V. DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Este estudio analiza de forma retrospectiva los factores de riesgo de formación de DSA y no DSA anti-HLA y su impacto en los resultados del TR, en una cohorte de 591 receptores de un TR de donante cadáver, vivo y de R-P realizados en un solo centro, dónde la información se recogió prospectivamente en una base de datos diseñada para tal fin que fue actualizada anualmente.

El estudio se llevó a cabo en una población de determinadas características demográficas y clínicas de donantes y receptores, y unos resultados generales de supervivencia del injerto renal no censurada de 91,8% al año, 88,2% a los tres años y 81,9% a los seis años. Al individualizarlos por grupos de TR, la supervivencia del injerto en donante cadáver fue del 90,8% al año, 87,3% a los tres años y 80,0% a los seis años, datos similares a otras series europeas<sup>122</sup>. En un contexto, en el que el 70,1% de los casos de donante cadáver tuvieron como causa de muerte un ACV y una tasa de comorbilidad por hipertensión arterial del 36,1%, de diabetes mellitus del 15,2%, de ambos procesos del 10,4% y el 45,2% (227 casos de los 502 receptores de un TR de cadáver) eran donantes con criterios expandidos cuyos injertos fueron seleccionados por biopsia renal.

La supervivencia del injerto en los casos de donante vivo fueron algo mejores a otras series publicadas<sup>123,124</sup> y en el caso del R-P, fue similar a lo reportado en otras series<sup>125-127</sup>.

Así mismo, los factores de riesgo de pérdida del injerto fueron similares a lo reportado por otros autores; tales como la edad del donante, los RAs celular y humoral y la creatinina sérica a los 12 meses. Un dato importante en nuestra serie, fue que el rechazo humoral era la variable de mayor impacto negativo en la supervivencia del injerto, que aumentaba el riesgo de pérdida del injerto 8 veces. Este dato concuerda con otras series publicadas<sup>69,73,74</sup>.

La supervivencia global de los pacientes fue del 92,8% a los seis años a pesar de las características de los donantes y receptores en nuestra población. Al individualizarlos por tipo de trasplante, la supervivencia de los pacientes que recibieron un trasplante de cadáver fue más

baja que en las otras modalidades de trasplante (Vivo y R-P) aunque no existieron diferencias significativas.

Para terminar de definir las características de nuestra cohorte, se determinaron los factores de riesgo de muerte del paciente con TR, observándose como factores de riesgo en el análisis multivariante la edad del receptor y el TLE. Estos factores de riesgo aparecen en otras series<sup>128</sup>.

Para conocer el impacto de la respuesta humoral sobre los resultados del TR, nosotros dividimos el análisis en:

### **1. Formación de anticuerpos anti-HLA de novo en el postrasplante.**

De los 591 enfermos estudiados con TR de donante cadáver, vivo y de R-P, 51 (8,6%) formaron DSA anti-HLA de novo. Un porcentaje en el rango bajo de lo publicado hasta la fecha, que oscila entre el 44,8% y el 8,2%<sup>71,72,75-79</sup>. Diferencias que se han atribuido a factores como incumplimiento del tratamiento inmunosupresor<sup>68</sup>, soporte social del costo de la medicación y asistencia ambulatoria especializada<sup>129</sup>, raza<sup>130</sup>, inmunosupresión usada<sup>131</sup> y metodología de screening de anticuerpos<sup>132</sup>. Aunque no son descartables otros factores de riesgo que se analizan posteriormente.

En esta serie, como en otras publicadas<sup>71,75-77,79</sup>, el mayor porcentaje de formación de DSA se produce en el primer año postrasplante y a partir de esta fecha continúan formándose anticuerpos, pero en porcentaje decreciente. Concretamente, el tiempo de formación de DSA fue del 25,5% a los tres meses, 41,2% al año, 17,7% a los dos años, 17,6% a los tres años, 13,7% a los cuatro años, 7,8% a los cinco años y 2,0% a los seis años. En concreto, en esta cohorte el 8,6% de los enfermos forman DSA de novo. Esta incidencia de DSA se ha valorado como sorprendente, ya que la inmunosupresión usada es preferentemente activa contra los linfocitos T; y por ello, se podría deducir que la respuesta humoral debería tener un mayor protagonismo en TR. De hecho, con la técnica de ELISPOT, usando como diana fibroblastos cultivados del donante, se ha demostrado que pacientes sin DSA en el suero antes y después del

trasplante, exhibieron a las ocho semanas postrasplante un aumento del número de células secretoras de DSA dirigidas contra antígenos HLA de clase I del donante. Lo que apoya que la respuesta humoral alogénica es más frecuente de lo deducido por las técnicas habitualmente usadas para detectar anticuerpos en sangre<sup>39</sup>. Hay, por tanto, una limitación en las técnicas usadas en la práctica clínica para medir o cuantificar la respuesta humoral alogénica<sup>132</sup>. Esta afirmación, no sorprende porque históricamente también ocurrió algo similar cuando se pasó de la detección de anticuerpos por la técnica basada en células<sup>25</sup> a la de ensayos de fase sólida<sup>28</sup>, de mayor eficacia. Prueba de las dificultades es que se necesitaron 32 años de investigación para lograr esta última técnica de mayor eficacia, pero aún deficiente en la detección de anticuerpos.

Además, añadir que la disparidad entre los casos de TR con injertos que presentan lesiones histológicas de daño endotelial compatibles con un rechazo humoral, en los que no se detectan anticuerpos anti-HLA puede estar, como dice Terasaki, en la formación de anticuerpos frente a polimorfismos no HLA; como ocurre por ejemplo, en los casos de anticuerpos frente al receptor tipo 1 de la angiotensina 2<sup>91</sup>, pero hasta la fecha no se dispone de una amplia gama de kits que permitan aclarar este vacío del puzzle de la respuesta humoral alogénica.

## **2. Naturaleza de los DSA y evolución de los anticuerpos anti-HLA.**

En nuestra serie los DSA formados son de clases I y II, pero los más frecuentes son de clase II con el 70,6% de los casos, entre los que destacan como más frecuentes los anticuerpos contra los antígenos DQ2 y DR13, bien solos o asociados a otros DSA; mientras que los de clase I representan el 43,1% y el más frecuente fue el anti-A1. En el locus B, hay una mayor dispersión. No hubo diferencias en el tiempo medio de aparición de los DSA ni en la proporción de anticuerpos formados de clase I y de clase II entre los diferentes tipos de trasplante.

Estos datos corroboran lo publicado hasta la fecha que destacan como más frecuentes los DSA de clase II y en especial los anti-DQ<sup>84,107,133</sup>; aunque no todos los autores están de acuerdo con esta afirmación y consideran que no hay diferencias en la prevalencia de DSA de clase II DP, DR y DQ<sup>108,109</sup>. Pero sí dejar constancia de que hay mayoría de autores que opinan

que los DSA de clase II y sobre todo DQ son los más frecuentes, como ocurre en este estudio. En este caso, señalar que para la selección del receptor según la compatibilidad HLA, en nuestro centro, no se tiene en cuenta el DQ.

Destacar que la GT se ha asociado con anticuerpos de clase II<sup>72,110</sup> y en especial de tipo DQ. En esta serie, los dos pacientes que fueron diagnosticados de GT, presentaban anticuerpos de clase II (DQ2 y DR13), que no fijaban C1q.

#### **a. Evolución de los anticuerpos anti-HLA.**

Según el % de PRA virtual, el análisis de medidas repetidas, en nuestra población durante los tres primeros años de evolución postrasplante se confirmó la formación y acúmulo progresivo y significativo de anticuerpos anti-HLA en el grupo que formaron DSA de novo. También, en los pacientes con anticuerpos anti-HLA preformados, tras el TR se produce un incremento significativo y progresivo de formación de anticuerpos anti-HLA. Hasta dónde nosotros sabemos, este dato no ha sido encontrado en ninguna de las publicaciones revisadas.

#### **b. Anticuerpos anti-HLA preformados no DSA.**

De los 591 pacientes, 111(18,8%) tenían anticuerpos anti-HLA preformados. Las diferencias con pacientes sin anticuerpos anti-HLA preformados fueron el predominio del sexo femenino y mayor porcentaje de retrasplantados, TLE y proporción de serología viral positiva para CMV y VHC. Todas ellas, variables ligadas al estímulo y actividad del SI. Además, estos receptores tienen una mayor incidencia de FRI y prevalencia de RA celular y humoral y de formación de DSA de novo.

El porcentaje de pacientes con anticuerpos anti-HLA preformados es inferior a otras series publicadas, como la de USA<sup>134</sup> del 32% y de Francia<sup>135</sup> del 25%; pero aún así, el número de pacientes sensibilizados pretrasplante sigue siendo alto, pese al uso de eritropoyetina recombinante que ha reducido significativamente las transfusiones sanguíneas<sup>136,137</sup>. Su presencia es un factor de riesgo, de formación de DSA y de rechazo humoral, como está descrito en diferentes publicaciones<sup>71,138</sup>.

### c. Supervivencia del injerto en pacientes con anticuerpos anti-HLA DSA.

Hubo diferencias significativas en la supervivencia del injerto cuando se comparan entre sí los pacientes con DSA con y sin rechazo humoral. Concretamente, del 85,7% al primer año, 68,5% al tercer año y 57,1% al sexto año frente al 100% a los seis años (log-rank  $p < 0,001$ ). Esto confirma el riesgo de pérdida del injerto en pacientes con DSA anti-HLA de novo en TR, pero no todos los DSA tienen el mismo pronóstico. Un análisis completo de los DSA anti-HLA de novo, debe incluir especificidad HLA o no HLA, intensidad de fluorescencia media, fijación de C1q, serotipos de IgG, niveles de TaC, dosis de MMF y fenotipo de daño tisular mediante biopsia de protocolo interpretada según los criterios establecidos por la clasificación de Banff.

Respecto a anticuerpos frente a polimorfismos no HLA, solo se dispone de kits para el receptor tipo 1 de la angiotensina <sup>291</sup> y para la  $\beta$ -glicoproteína <sup>139</sup>. No obstante, los anticuerpos anti-HLA son los más frecuentes y en los que se centra este análisis. En general, muchos estudios se han dirigido a las técnicas de detección de anticuerpos, aunque este sea un tema de difícil solución; al menos hasta recientemente. En concreto, los estudios se han dirigido a conseguir una técnica que pueda diferenciar que anticuerpos provocan daño tisular. Se ha usado la MFI como medida de potencia del anticuerpo <sup>135</sup>, dado que ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) carecen de especificidad y sensibilidad para definir la capacidad deletérea de los anticuerpos. Pero en esta búsqueda, se ha observado que el método basado en la fijación de C1q por el anticuerpo es el que mejor se correlaciona con la presencia de rechazo humoral <sup>140</sup>. Dato confirmado en un estudio multicéntrico en el que pacientes que forman DSA anti-HLA fijadores de C1q tienen una supervivencia del injerto a los 5 años del 54%, frente al 93% de los que forman DSA que no lo fijan ( $p < 0,001$ ) y la presencia de DSA fijadores de C1q es un factor de riesgo de pérdida del injerto (HR 4,78 I.C. 95% 2,69-8,49;  $p < 0,001$ ) <sup>135</sup>. Igual que ocurre en esta serie en la que los pacientes que forman DSA anti-HLA que fijan C1q tienen una supervivencia del injerto significativamente menor a los seis años de evolución.

Para concretar este apartado, decir que la técnica de CDC detecta solo el 19% de anticuerpos que fijan el complemento y la intensidad de fluorescencia media es independiente de si el anticuerpo fija o no C1q.

Otro aspecto importante que añadir al estudio de DSA anti-HLA de novo es el subgrupo del serotipo IgG. Datos publicados recientemente muestran que los anticuerpos tienen diferente patogenicidad según el subtipo de IgG<sup>89</sup>. Las subclases IgG3 e IgG4, se asocian con daño mediado por anticuerpos y con un definido fenotipo de daño tisular. Los IgG3 son los de mayor riesgo de pérdida del injerto por RA humoral independientemente de su capacidad para fijar o no C1q. Son los pacientes que tienen más inflamación microvascular y depósitos de C4d. Esto, para algunos autores, apoya que este subtipo de IgG se asocia con mayor capacidad para unirse a los receptores Fc de monocitos, macrófagos y células NK que son las principales células efectoras implicadas en el rechazo humoral<sup>141</sup>. En cambio si son IgG4, el daño cursa de forma silente y se asocia más a GT y no suelen fijar C1q; en contra de lo que venía afirmándose hasta la fecha, que los anticuerpos IgG4 no causaban daño tisular.

Los DSA de subclase IgG1 son los predominantes y se asocia variablemente con otras subclases de IgG (IgG2, 3 y 4), como previamente se había destacado en otras publicaciones<sup>142,143</sup>.

La GT es una de las mayores causas de disfunción crónica del injerto sin respuesta al tratamiento; y por tanto, de mal pronóstico como confirman diferentes publicaciones. A los 10 años pacientes con GT tienen una supervivencia del injerto del 33% frente al 63% de aquellos sin GT<sup>114</sup>. Se ha dicho que entre el 4 y el 20% de los enfermos con TR desarrollan una GT entre 1 y 5 años, pero otras publicaciones muestran cifras inferiores<sup>144-147</sup>. En esta serie solo 2 pacientes (0,33%) presentaron histológicamente una GT que reuniera los criterios de rechazo humoral crónico establecidos en la clasificación de Banff (ANEXO B).

Aunque la histología de la GT está bien definida y demostrado que existe relación con los anticuerpos anti-HLA, su fisiopatología no lo está. Se sabe por la microscopía electrónica

que se inicia por daño endotelial, pero no se conoce con detalle el mecanismo fisiopatológico de actuación de los anticuerpos. Aunque se han descrito DSA de clase I<sup>68</sup>, los más frecuentes son los de clase II, como ocurre en los pacientes de este estudio. No obstante, señalar que debido al bajo número de pacientes con GT, es difícil llevar a cabo un estudio clarificador de esta entidad. Pero si hay evidencia de que previamente a su desarrollo, estos enfermos muestran en la biopsia mayor incidencia de glomerulitis que de capilaritis. Como así ocurre en los 2 casos de GT de esta serie.

Respecto a la capacidad de los anticuerpos de producir daño tisular según la MFI, insistir que los datos actuales no avalan el método porque no siempre predicen la capacidad de daño tisular del anticuerpo<sup>148</sup>. En otras palabras, si la potencia del anticuerpo es una medida de la cinética de la unión o disociación antígeno-anticuerpo, esta información no se obtiene por la MFI<sup>149</sup>.

### **3. Factores de riesgo asociados a la aparición de DSA de novo.**

Los factores de riesgo para el desarrollo de DSA de novo no están descritos en la bibliografía de manera homogénea<sup>71,72,80,84,85,138</sup>. En nuestra población, el análisis multivariante mostró como factores de riesgo asociados a la formación de DSA; el RA celular, la FRI y la presencia de anticuerpos anti-HLA preformados no DSA. En esta serie hubo posiblemente una colinealidad entre el trasplante y los anticuerpos anti-HLA preformado, debido seguramente a que los anticuerpos citotóxicos preformados engloban a la condición de trasplante. Estas variables están, relacionadas con la actividad de la respuesta inmune.

Loupy et al<sup>138</sup>, señalaba como factores de riesgo asociados a la aparición de DSA el trasplante y la presencia de anticuerpos anti-HLA previo al trasplante. Everly et al<sup>71</sup>, añaden otros factores de riesgo como la edad (receptores de 18-35 años), incompatibilidades DR y DQ, y el haber recibido un trasplante de donante cadáver. Otros autores señalan otros factores como la no-adherencia al tratamiento<sup>68,72</sup>, inmunosupresión insuficiente<sup>80</sup> y el rechazo mediado por células T<sup>72,80,84,85</sup>.

No tenemos una clara explicación por qué la FRI es un factor de riesgo de formación de DSA. Es posible, que en pacientes con FRI exista una mayor exposición de antígenos del injerto que predisponen a la generación de anticuerpos anti-HLA. De hecho, los pacientes con DSA desarrollaron FRI en un porcentaje significativamente mayor que aquellos que no lo tuvieron (54,2% vs 45,8%,  $p=0,002$ ). Futuros estudios prospectivos pueden aclarar este aspecto.

#### **4. Incidencia del Rechazo humoral.**

La incidencia de rechazo humoral fue del 3,6%, todos ellos diagnosticados por biopsia renal siguiendo los criterios establecidos en la clasificación de Banff 2013 (Anexo B). De ellos, 19 (90,5%) fueron agudos y 2 (9,5 %) crónicos.

Los pacientes con DSA que fijaron la fracción C1q del complemento tienen mayor riesgo de rechazo humoral y de pérdida del injerto que los que no lo fijaron. Concretamente, el 66,7% de los que lo fijan tuvieron rechazo humoral, mientras los que no lo hacen la cifra desciende al 33% ( $p=0,040$ ) y la pérdida del injerto en los primeros fue del 33,3% y en lo segundo del 7,7%. Estos datos son semejantes a lo descrito por el grupo de Loupy et al<sup>138</sup>. En dicho estudio demostraron que la fijación de C1q a los anticuerpos anti-HLA específicos del donante permaneció fuertemente asociado con el riesgo de pérdida del injerto, independientemente de la MFI de los anticuerpos.

Esto tiene un impacto negativo en la supervivencia. En efecto, la supervivencia de injertos no censurada y censurada, entre pacientes con DSA que fijan o no C1q muestra diferencias significativas ( $p=0,017$ ). Los que no fijan C1q tienen una supervivencia de 97,4% al año, 94,4% al tercer año y 87,6% al sexto año; mientras que en aquellos que fijan la fracción C1q del complemento del 83,3% al año y del 66,7% a partir del tercer año post trasplante.

Estos datos, indican que en esta serie un factor distintivo de agresión al injerto es que los DSA activen el complemento. Dato superponible a lo publicado en una cohorte de 1016 pacientes de un estudio multicéntrico, que muestra que pacientes con DSA de novo que fijan la fracción C1q del complemento tienen mayor riesgo de rechazo humoral (48% vs 16%,  $p<0,001$ ), un fenotipo de mayor extensión de la inflamación vascular ( $p<0,001$ ), de depósitos

de C4d en los capilares peritubulares ( $p < 0,001$ ), de inflamación intersticial y tubulitis ( $p < 0,001$ ) y de riesgo de pérdida del injerto (4,78, IC 95% 2,69-8,49;  $p < 0,001$ ) cuando la regresión de Cox se ajusta para variables clínicas, funcionales, histológicas e inmunológicas; y además, una menor supervivencia del injerto a los cinco años (54 vs 93%;  $p < 0,001$ )<sup>138</sup>.

Otros estudios apoyan como método de distinción de anticuerpos el ensayo basado en la plataforma que determina si fijan la fracción C1q del complemento, que son los que tienen una correlación con la disfunción del injerto<sup>150</sup>.

La activación de la vía clásica del complemento se inicia tras la unión de su fragmento C1q al dominio CH2 de la región Fc de anticuerpos de isotipo IgG. Clásicamente se admitía que los subgrupos de IgG 3 y 1 (en este orden de intensidad) fijan el complemento, IgG2 lo hace débilmente y no tiene reactividad IgG4<sup>50</sup>. La diferencia viene determinada por el polimorfismo del dominio CH2. Estudios de ingeniería genética de proteínas IgG2b de ratones, han demostrado que los aminoácidos glicina en la posición 318 y lisina en la 320 y 322 localizados en un segmento  $\beta$  del dominio CH2 del anticuerpo, son los constituyentes esenciales para unirse al motivo de unión de C1q<sup>51</sup>. Pero solo la unión no es suficiente para que se active el complemento, ya que todos los subgrupos de IgG poseen los aminoácidos citados en las posiciones señaladas. Es la presencia de lisina en la posición 276, muy próxima al motivo de unión de C1q lo que confiere a IgG3 su capacidad para iniciar la activación del complemento y prolina en la posición 291 en la IgG1. En cambio, IgG4 es incapaz de activar el complemento, pese a unirse a C1q, por la presencia de un residuo de serina en posición 331. Lo que confirma que solo la unión de C1q al dominio CH2 de la región Fc de la inmunoglobulina, no es suficiente para activar el complemento, sino que la presencia de determinados aminoácidos en posiciones concretas del dominio CH2 de la región Fc determinan si el subtipo de IgG lo activa o no<sup>52</sup>.

En modelos experimentales se ha demostrado que la activación incontrolada del complemento aumenta la reactividad de los linfocitos T a través de señales coestimuladoras

sobre las CPAs y los linfocitos T del reconocimiento antigénico del aloinjerto<sup>54,55</sup>. Las fracciones C3a y C5a estimulan la diferenciación de células Th0 en Th1 y la señalización C3aR y C5aR inhibe el desarrollo de células T reguladoras<sup>56</sup>.

Las células del aloinjerto que están opsonizadas por fracciones del complemento tienen una mayor interacción con los linfocitos T, lo que sugiere que la adhesión celular mediada por el complemento puede ser un factor importante de daño tisular mediado por células T<sup>57</sup>.

Los anticuerpos IgG tienen una vida media más larga que otras proteínas debido a que el receptor neonatal de Fc, se une a la IgG después de ser endocitado por la célula y en vez de ser degradado se recicla a la superficie de la célula<sup>53</sup>. Ratones con un déficit del receptor neonatal de Fc tienen una disminución de los niveles circulantes de IgG y una vida media de la inmunoglobulina reducida. En este dato se basa la eficacia de la administración de inmunoglobulinas como tratamiento del rechazo humoral, ya que se unen a los receptores neonatales y los saturan con lo que se inhibe la interacción de los anticuerpos IgG endógenos con el receptor neonatal Fc, lo que favorece su desaparición<sup>53</sup>.

Hasta ahora, se ha postulado que los DSA de serotipo IgG son los de verdadero riesgo de pérdida del injerto<sup>151</sup> y que los anticuerpos IgM no tienen efecto negativo en trasplante de órganos<sup>152</sup>, aunque se sabe que estos anticuerpos son más eficientes en provocar aglutinación, regular el desarrollo de células B, facilitar el aclaramiento de células apoptóticas, modular la respuesta inflamatoria y que son los primeros que se forman en la respuesta humoral. Pero no está claro que en el cambio de inmunoglobulina que influencia tienen en la formación de cada uno de los distintos subgrupos de IgG. En un estudio que incluye 189 receptores de un TR primario, 100 (56%) desarrollan respuesta aloinmune. De los 47 pacientes que forman anticuerpos IgG, en 42 se detectan también de IgM que persiste en 33 de ellos. De estos, 25 son del subgrupo IgG3, que son los de mayor riesgo de fracaso del injerto ( $p=0,02$ )<sup>121</sup>. O sea, el grupo formado por la persistencia de IgM asociada a la formación de IgG3 son los DSA de mayor riesgo de pérdida del injerto. Otra luz, para demostrar que debe existir una determinada

vía para regular la conversión a los diferentes subgrupos de IgG en el cambio de inmunoglobulina de la alorespuesta inmune.

Desafortunadamente, nosotros no tenemos datos de las especificidades de la IgG. Otros estudios son necesarios para aclarar estos aspectos.

Insistir que en esta serie, la supervivencia de injertos no censurada y censurada, entre pacientes con DSA que fijan o no C1q muestra diferencias significativas ( $p=0,017$ ). Dato a favor de que la técnica de fijación del C1q permite diferenciar, al menos, DSA de diferente capacidad de agresión tisular.

## **5. Factores de riesgo de rechazo humoral.**

En nuestro estudio, los factores de riesgo asociados al rechazo humoral fueron el RA celular, el RA celular excluyendo el borderline, el TLE y la creatinina sérica a los 12 meses. Destacar que en todos los modelos de regresión logística, el RA celular fue un factor de riesgo de rechazo humoral. Una señal de la actividad y coordinación de ambas respuestas del SI. En esta línea, ciertos autores observan que episodios tempranos de RA celular, a menudo, preceden el desarrollo de DSA y rechazo humoral<sup>153</sup>.

También, mención especial merece la evolución del coeficiente de variabilidad de niveles en sangre de TaC; tanto en la formación de DSA, como en el desarrollo de rechazo humoral y que se describe con detalle en un apartado posterior.

En este apartado hay que distinguir, que la formación de DSA, no supone la inevitable presencia de un rechazo humoral. De hecho, el mayor porcentaje de pacientes que formaron DSA (58,8%) no tuvieron rechazo humoral y mantuvieron una función renal estable. Lo que indica que no todos los DSA anti-HLA de novo son iguales y que las técnicas de detección de anticuerpos debe, incluir al menos una, que permita diferenciar a los de mayor potencial deletéreo.

## 6. DSA que fijan C1q.

En nuestra serie la fijación de C1q fue un factor de riesgo asociado a la pérdida del injerto y a la aparición del rechazo humoral. De hecho, el análisis multivariante mostró que los pacientes con DSA que presentaron RA celular y fijaron el C1q tenían 29 y 14 veces más riesgo de rechazo humoral, respectivamente.

En este sentido, un estudio recientemente publicado de seguimiento de formación de DSA durante 5 años en 346 pacientes, concluye que la fijación de C1q se asocia con una pérdida rápida del injerto por rechazo humoral. Así mismo, la persistencia a largo plazo de DSA puede conducir a una mayor pérdida de injertos que en los que no forman DSA. La MFI mayores de 6237 a los 2 años y de 10,000 a los 5 años predicen la fijación de C1q<sup>154</sup>.

Otros autores señalan una relación entre la MFI y el efecto deletéreo de los DSA y establecen que niveles mayores de 3000 tienen más riesgo de rechazo humoral<sup>79</sup>. En nuestra serie el MFI acumulada y máxima no es un factor de riesgo predictivo del rechazo humoral ni de pérdida del injerto. La disparidad de los resultados puede estar motivado por las limitaciones de la técnica. La detección de anticuerpos anti-HLA por Luminex es un ensayo semicuantitativo, dónde se relaciona la cantidad de anticuerpo con la intensidad de fluorescencia, y que se puede informar por medio del valor numérico MFI. El punto más conflictivo de los ensayos con Luminex es fijar el umbral de positividad de los anticuerpos (normalmente un umbral de MFI). Además, la existencia de dos fabricantes que comercializan reactivos para detección de anticuerpos con resultados de MFI que no son equivalentes, hace que esta cuestión sea aún más compleja, puesto que los valores de MFI difieren entre los distintos laboratorios. Así, en el informe del Taller Ibérico de Histocompatibilidad del año 2012 en el que participaron 32 laboratorios de toda España<sup>155</sup>, se trató la cuestión de la estandarización de resultados de anticuerpos anti-HLA mediante ensayo en fase sólida. El umbral o punto de corte de MFI que utilizaban los distintos laboratorios estaba en un intervalo de MFI entre 500-3.000. Siendo mayoritarios los laboratorios que empleaban un punto de corte entre 1.500-2.000. Dependiendo del riesgo de rechazo que se desee asumir al realizar el

trasplante, cada centro puede establecer su propio umbral<sup>156</sup>. Varios estudios han descrito diferentes grados de correlación de la MFI y la evolución del injerto, hay autores que aceptan que a mayor MFI el riesgo de RA mediado por anticuerpos es mayor<sup>157,158</sup>. Un dato que no se puede corroborar en este estudio.

Otra posibilidad que ofrece el ensayo Luminex es la de detectar los anticuerpos que fijan la fracción C1q de complemento, que se ha descrito que tienen una mayor correlación con el rechazo humoral. Como ocurre en esta serie. Únicamente algunos tipos de Ig son capaces de unir complemento, fundamentalmente la IgM, la IgG1 y la IgG3. Aunque el grupo que describió el ensayo C1q afirmaba que no había relación entre la capacidad de fijar C1q y la MFI<sup>140</sup>, como ocurre en esta cohorte. Otros grupos sí que han descrito una mayor capacidad de unir complemento entre los anticuerpos detectados con mayor MFI<sup>159,160</sup>. Tradicionalmente se ha considerado que los anticuerpos anti-HLA de tipo IgM son irrelevantes para la supervivencia del injerto. Aunque estudios recientes muestran resultados contradictorios, y apuntan que podrían tener un efecto sinérgico al de la IgG3. Lo que permitiría identificar a los pacientes en mayor riesgo de rechazo humoral para poder modificar sus pautas de inmunosupresión<sup>148</sup>. No es descartable que otras inmunoglobulinas que no fijan complemento, también participen activamente en el rechazo del injerto, como es el caso de la IgG4<sup>89,161</sup>.

La supervivencia de injertos no censurada y censurada, en pacientes que formaron DSA que fijan C1q fue significativamente menor que la de aquellos con DSA que no lo fijan. Estos tienen una supervivencia del 97,4% al año, 94,4% al tercer año y 87,6% al sexto año; mientras que en los que lo fijan tienen una supervivencia del 83,3% al año y del 66,7% a partir del tercer año. Datos, según lo descrito recientemente indican que estos DSA serían de naturaleza IgG3 y con resultados de supervivencia del injerto muy similares a los del grupo Loupy et al<sup>138</sup>.

En resumen, los DSA anti-HLA de novo que se relacionan con RA humoral y con mayor riesgo de pérdida del injerto son los del subgrupo de inmunoglobulina IgG3 que fijan la fracción C1q del complemento. Cuando no reúnen estos requisitos, y hay rechazo humoral su

respuesta al tratamiento es elevada. En cambio, es significativamente de peor pronóstico en cuanto a la supervivencia del injerto si fijan C1q.

#### **7. Coeficiente de variabilidad de niveles en sangre de tacrolimus como factores de riesgo de formación de DSA y de rechazo humoral.**

Se ha analizado el impacto de la variabilidad de niveles en sangre de TaC y de las dosis de MMF en la formación de DSA. Los dos inmunosupresores básicos usados en esta serie. Los pacientes que forman DSA tienen un mayor CV de niveles en sangre de TaC de  $29,7 \pm 15,8$  frente al grupo control de  $21,4 \pm 9,9$  ( $p=0,002$ ). Esto es, los enfermos con mayor CV de niveles en sangre de TaC, tienen más riesgo de formación de DSA. Además, el análisis del índice de Youden muestra que el punto de corte para el CV, a partir del cual se forman DSA es el 27,5%.

En cambio, el análisis individual de los niveles en sangre de TaC no mostró una capacidad predictiva para la formación de DSA

Los pacientes que presentaron un rechazo humoral mostraron un CV significativamente superior al grupo control ( $38,3 \pm 14,3$  vs  $20,7 \pm 11,0$ ;  $p < 0,001$ ). Nosotros utilizamos un punto de corte de CV en 27,5% acorde al índice de Youden, que representó el mejor valor para predecir el rechazo humoral.

Cuando incluimos en el modelo multivariante el  $CV \geq 27,5\%$ , observamos que fue un factor de riesgo de rechazo humoral. Al realizar modelos de análisis multivariante, introduciendo junto al  $CV \geq 27,5\%$  el resto de las variables dos a dos, los factores de riesgo asociados al rechazo humoral fueron RA celular, la presencia de anticuerpos pretrasplante, un PRA pretrasplante  $\geq 25\%$ , el retrasplante y el TLE.

Quizás la identificación del polimorfismo CYP3A5\*1/\*3 pudiera detectar diferencias en la biodisponibilidad de TaC<sup>162</sup>.

El dato del CV como factor de riesgo de formación de DSA y de rechazo humoral, añade una nueva información que necesita un análisis sobre su posible efecto en la diferencia de incidencia de formación de DSA y de resultados en TR en diversos países. Las series publicadas

en USA y en Canada<sup>68</sup> muestran un porcentaje mayor de formación de DSA postrasplante que en esta serie y señalan que la formación de DSA y el incumplimiento del tratamiento inmunosupresor son la causa mayor de pérdida del injerto a largo plazo. Es evidente que hay claras diferencias entre estos países y con esta serie; y en general, en los resultados de TR, como lo demostró un estudio comparativo en la población caucásica entre USA y España sobre resultados a largo plazo en TR<sup>129</sup>. Para explicar estas diferencias, se puede valorar el acceso a la atención sanitaria<sup>163</sup> y al soporte de la inmunosupresión<sup>164</sup> a partir de los 3 años, entre ambos países; en USA a partir de esta fecha el tratamiento corre a cargo del paciente, mientras que en España no hay límite de apoyo social. La pregunta es ¿estas dos variables están influyendo en la diferencia de resultados?; y en concreto, ¿es posible que la variabilidad de niveles de TaC por un control ambulatorio dilatado sea otro factor más de la diferencia de formación de DSA entre ambos países? Esta pregunta no es un objetivo de este estudio, pero sí insistir que en ambos países los resultados de TR son diferentes, como lo es la incidencia de DSA anti-HLA de novo y su efecto en TR.

Como resumen y conclusión de este apartado, decir que el CV de niveles de TaC en sangre debería de incorporarse como método rutinario en el control ambulatorio de pacientes con TR

## **8. Función renal.**

El análisis de medidas repetidas muestra que se produce un descenso progresivo y significativo de la creatinina sérica ( $p=0,003$ ) desde el momento del trasplante hasta el final del seguimiento y un aumento del GFR ( $p=0,003$ ).

Como era de esperar, los pacientes con RA celular o humoral tuvieron una creatinina sérica significativamente mayor y un GFR menor que aquellos que no lo tuvieron.

Los pacientes que formaron DSA frente a los que no, aunque la creatinina sérica fue superior y el GFR inferior en los tiempos analizados, sólo hubo diferencias significativas en los meses 36 y 48, y en el GFR en los tiempos 24, 36 y 48 meses.

## **9. Supervivencia del injerto y del paciente con rechazo humoral.**

En nuestra cohorte, hubo diferencias significativas en la supervivencia del injerto entre los grupos con rechazo humoral y RA celular frente al no rechazo. La supervivencia del injerto en el grupo que presentó rechazo humoral fue del 57,1% al sexto año.

Las supervivencias de nuestra serie fueron semejantes a los obtenidos en otros estudios<sup>165</sup>, en dónde la supervivencia del injerto a 5 años en el grupo sin RA fue del 97,0% y en el grupo con rechazo celular inmediato 89,0% y rechazo celular tardío del 85,0%. En otro estudio<sup>166</sup>, la supervivencia del injerto censurada en el grupo de rechazo humoral con desarrollo de microangiopatía trómbotica fue del 48,3% a los cinco años postrasplante. Esto confirma una vez más el impacto negativo de la disfunción inmunológica sobre la supervivencia del injerto.

En cuanto a la supervivencia de pacientes no hubo diferencias significativas en los casos de rechazo humoral, RA celular y no rechazo, al menos, durante nuestro periodo de estudio.

## **10. Limitaciones del estudio.**

- a. Un estudio de formación de DSA en pacientes con TR y de su efecto en la función y supervivencia del injerto y del paciente, debe incluir especificidad HLA o no HLA, MFI, fijación de C1q, serotipos de IgG, fenotipo de daño tisular y análisis de los inmunosupresores mediante el CV de niveles de TaC en sangre. En este caso, no se han cumplido algunos de estos requisitos. No determinamos el:
  - Serotipo de IgG como causa de rechazo humoral o crónico y su impacto en el daño tisular. Un proyecto a realizar, esperamos en un plazo no lejano, porque la única dificultad que hay es la económica debido al precio de los Kits.
  - El estudio del fenotipo de daño tisular requiere un proyecto con biopsias renales de protocolo de una frecuencia, no asumibles en el hospital por la demanda asistencial que crearía un volumen tan importante de pacientes con TR.

- Los anticuerpos anti-HLA DP en el donante, por lo que se desconoce si los pacientes trasplantados desarrollaron anticuerpos anti-HLA DP contra el donante.
- b. Se trató de un estudio retrospectivo en el que participó un único centro, el Hospital Regional Universitario de Málaga y los resultados pueden no ser extrapolables a otras poblaciones.
- c. No se analizó la proteinuria, que es un factor de riesgo de primera magnitud de la supervivencia del injerto y del paciente, debido a que el análisis se centró en la aparición de los anticuerpos anti-HLA y en los factores de riesgos inmunológicos asociados.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## VI. CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

1. La incidencia en la formación de anticuerpos anti-HLA donante específicos en los pacientes con trasplante renal es del 8,6% durante nuestro periodo de seguimiento, cuando el punto de corte de la intensidad de fluorescencia media es superior a 1500.
2. En nuestra cohorte, hay un predominio de anticuerpos anti-HLA donante específicos de clase II, especialmente DQ y la aparición de estos anticuerpos se produce fundamentalmente durante el primer año postrasplante (41,2%), observándose una expansión generalizada de los anticuerpos anti-HLA acorde al % PRA virtual.
3. Los factores de riesgos inmunológicos asociados a la formación de anticuerpos anti-HLA donante específicos son la función retrasada del injerto, los anticuerpos preformados y el rechazo agudo celular.
4. La incidencia del rechazo humoral en la población de estudio es del 3,6% (n=21). El rechazo humoral es un factor de riesgo de primera magnitud para la supervivencia del injerto censurada para la muerte del paciente.
5. Los factores de riesgo asociados al rechazo humoral son: los anticuerpos anti-HLA preformados, el rechazo agudo celular, el retrasplante, el tiempo en lista de espera, el panel reactivo de anticuerpos  $\geq 25\%$  y la creatinina sérica a los 12 meses. En los pacientes que desarrollan anticuerpos anti-HLA donante específicos, los factores de riesgo asociados al rechazo humoral son el rechazo agudo celular y la fijación de fracción C1q del complemento.
6. En los pacientes que forman anticuerpos anti-HLA donante específicos, la fracción C1q del complemento es un factor de riesgo asociado al rechazo humoral y a la pérdida de injerto. En esta cohorte la intensidad de fluorescencia media no se asocia a la aparición de rechazo humoral ni a la pérdida del injerto.
7. Un coeficiente de variación del 27,5% de los niveles de tacrolimus predice con adecuada sensibilidad y especificidad (índice de Youden) el riesgo de aparición de anticuerpos anti-HLA donante específicos y de rechazo humoral.

8. Los pacientes con rechazo humoral tienen una peor función renal, medida por la creatinina sérica y el filtrado glomerular (CKD-EPI), a lo largo del estudio en comparación con aquellos que presentan rechazo agudo celular o no tienen rechazo.
9. El rechazo humoral agudo y crónico no tienen impacto negativo en la supervivencia del paciente.

A la luz de estas conclusiones obtenidas, proponemos las siguientes recomendaciones para el manejo de los pacientes con TR en nuestra unidad:

- 1) Dado el impacto del CV de niveles de TaC en sangre, sería prudente su valoración periódica y posiblemente, la determinación del polimorfismo CYP3A5 \*1/\*3.
- 2) Incluir en el tipaje HLA de donantes y receptores los antígenos de clase II DP.
- 3) Establecer un protocolo de seguimiento prospectivo de formación de DSA clase I (A y B) y clase II (DR, DQ y DP).
- 4) Incluir en el sistema de elección del receptor, como uno de los factores de mayor puntuación, la identidad DR y DQ.
- 5) En pacientes que forman DSA es recomendable analizar si fijan C1q y llevar a cabo de forma rutinaria biopsias renales.

## VII. ANEXOS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## ANEXO A: PROTOCOLO DE INMUNOSUPRESIÓN EN TRASPLANTE RENAL

### HOSPITAL REGIONAL UNIVERSITARIO DE MÁLAGA.

**1. PRIMER TRASPLANTE RENAL (Ó RETRASPLANTE PERO BAJO RIESGO INMUNOLÓGICO), PACIENTES NO HIPERINMUNIZADOS. DONANTE NO EXPANDIDO.**

**1º CON FUNCIÓN RENAL INMEDIATA**

**A. Tacrolimus de liberación prolongada (ADVAGRAF®).**

ADVAGRAF® cápsulas de 5 mg

ADVAGRAF® cápsulas de 1 mg

ADVAGRAF® cápsulas 0.5 mg

**Dosis preoperatoria:** 0.2 mg/kg.

**Dosis posoperatoria:** 0.2 mg /kg/24 horas.

Se iniciará el tratamiento cuando el paciente tolere vía oral (como máximo 24 h después de la reperusión).

Se administrará una hora antes del desayuno.

Si el paciente no puede tomar la medicación por vía oral, se administra por sonda nasogástrica.

Para ello se sigue el siguiente procedimiento: se abren las cápsulas, se vacía su contenido en una jeringa con 50 ml de agua, se mezcla hasta producir una suspensión y a continuación se administra por la sonda nasogástrica. Después se administran otros 50 ml de agua para cerciorarse de que la suspensión pase al estómago. A continuación pinzar la sonda nasogástrica durante una hora y si se considera no necesaria, quitarla.

Pacientes en los que no sean posibles ambas vías de administración se dará (**PROGRAF**) por vía intravenosa a la dosis de 1/5 de 0.2 mg /Kg diluido en 500 ml de suero salino o glucosado al 5% en infusión continua durante 24 horas. Esta vía de administración se utilizará solo en casos excepcionales.

Hay que tener en cuenta que Tacrolimus no debe manejarse con jeringas o sueros de PVC.

### **Niveles en sangre recomendados:**

- **Día 1 al 90:** 8-12 ng/ml. (en los primeros 14 días mantener alrededor de 12 ng/ml).
- **A partir del día 91:** 5-10 ng/ml.
- En **pacientes estables**, y que no hayan tenido episodios de rechazo postrasplante: mantener niveles en el rango bajo, entre 5 y 7 ng/ml.

### **B. Esteroides:**

**Dosis preoperatoria:** 6-Metil Prednisolona 500 mg IV.

**Dosis primer día:** 6-Metil Prednisolona 125 mg IV.

#### **Dosis a partir del día 2 postrasplante:**

- **Peso inferior a 45 kg:** Prednisona oral 20 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir la dosis hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.
- **Peso entre 45-65 Kg:** Prednisona oral 25 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.
- **Peso superior a 65 Kg:** Prednisona oral 30 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 3 meses.

En pacientes con buena función renal, sin proteinuria, sin episodio de rechazo agudo, y con anticuerpos citotóxicos pre y postrasplante negativos, valorar iniciar la supresión de prednisona a partir del 3er mes de evolución (la supresión se realizará lentamente, al menos durante un periodo de un mes).

### **C. Micofenolato Mofetil (CELLCEPT®)**

CELLCEPT® comprimidos de 500 mg

CELLCEPT® comprimidos de 250 mg

**Dosis preoperatoria:** 1 gramo vía oral antes de ir al quirófano.

**Dosis posoperatoria:** 2000 mg/día (1.000 mg una hora antes del desayuno y 1.000 mg una hora antes de la cena). No mezclarlos con preparados de hierro oral.

Hasta que el enfermo tolere por vía oral, se administra por vía IV a la misma dosis, diluido en 250 ml de suero glucosado al 5% a pasar en 2-3 horas.

La dosis se controla mediante niveles en sangre que deben mantenerse entre 2-4 mcg/ml.

A partir del día 15º de evolución, y si el paciente ha alcanzado niveles adecuados de Tacrolimus disminuir progresivamente la dosis hasta alcanzar 500 mg/12 horas. Siempre una hora antes o dos horas después de tomar cualquier alimento.

En caso de intolerancia digestiva o cualquier otra condición médica que impida el uso de Micofenolato Mofetil se utilizará Acido Micofenólico (**Myfortic®**), teniendo en cuenta la equivalencia de dosis:

- **Myfortic®** 360 mg equivale a **Cellcept®** 500 mg
- **Myfortic®** 180 mg equivale a **Cellcept®** 250 mg

## **2º CON FUNCIÓN RENAL RETRASADA**

Si tras la cirugía no hay diuresis inmediata y la sospecha es de Necrosis Tubular Aguda, modificar la inmunosupresión:

### **A. Tacrolimus de liberación prolongada (ADVAGRAF®).**

**Dosis posoperatoria:** 0.12 mg/Kg de peso cada 24 horas, una hora antes del desayuno para mantener niveles entre 5 y 8 ng/ml

Una vez superada la fase de retraso de función renal volver a los niveles recomendados en el apartado anterior:

#### **Niveles en sangre recomendados:**

- **Desde que se recupere función renal hasta el día 90:** 8-12 ng/ml.
- **A partir del día 91:** 5-10 ng/ml.
- En **pacientes estables**, y que no hayan tenido episodios de rechazo postrasplante: mantener niveles en el rango bajo, entre 5 y 7 ng/ml.

**B. Simulect® (Basiliximab):** 1 vial de 20 mg IV, diluido en 50 ml de suero fisiológico, a pasar en 20-30 minutos. (Cuando se confirme la situación función retrasada, en las primeras 24 horas del postoperatorio).

Segunda dosis de 20 mg: 4 días después.

### **C. Esteroides**

Misma pauta que el apartado anterior.

### **D. Micofenolato Mofetil (CELLCEPT®)**

Misma pauta que el apartado anterior.

Si persiste el retraso de la función renal realizar biopsia de forma precoz como máximo entre el 5-7º día postrasplante.

## **2. PACIENTES DE ALTO RIESGO INMUNOLOGICO, definidos por:**

- **Hiperinmunizados (PRA > 50 % en los 6 últimos meses)** (en caso de no disponer de anticuerpos en los últimos 6 meses, se utilizarán las últimas determinaciones).
- **Ó retrasplante, con pérdida del injerto previo por causa inmunológica en los 6 primeros meses.**
- **Ó pruebas cruzadas previas positivas (más de 2 en los últimos 12 meses).**

### **A. Inducción con Timoglobulina:**

**Dosis preoperatoria:** 1.5 mg/kg de peso diluidos en 500 ml de suero fisiológico. La infusión se iniciará al comienzo de la intervención quirúrgica y se programará para que dure 10-12 horas (administrar a través de vía central ó fístula A-V).

**Posoperatorio:** continuar con 1.5 mg/kg/día hasta completar 7 dosis. (Ver pauta de administración de Timoglobulina en página 171).

Administrar la mitad de la dosis en casos de cifras de Leucocitos  $< 3.000/mm^3$  y plaquetas  $< 80.000/mm^3$ . Suspender cuando la cifra de leucocitos sea  $< 1.500/mm^3$  o de plaquetas  $< 40.000/mm^3$ .

En los casos en que la dosis diaria se disminuya por algún efecto secundario, intentar prolongar los días de administración hasta completar 10 mg/kg de peso.

#### **B. Tacrolimus de liberación prolongada (ADVAGRAF®).**

ADVAGRAF® cápsulas de 5 mg

ADVAGRAF® cápsulas de 1 mg

ADVAGRAF® cápsulas 0.5 mg

**Dosis preoperatoria:** 0.12 mg/kg de peso.

**Posoperatorio:** 0.12 mg/kg/24 horas. Empezar cuando el paciente tenga tolerancia oral (como máximo 24 horas después de la reperusión).

Se administrará diariamente una hora antes del desayuno.

Mientras que el paciente este recibiendo Timoglobulina mantener niveles entre 7 y 10 ng/ml. Un día antes de terminar la administración de Timoglobulina aumentar dosis a 0.25 mg/kg/día para intentar alcanzar los niveles descritos más abajo.

Si el paciente no puede tomar la medicación por vía oral, se administrará por sonda nasogástrica. Para ello se sigue el siguiente procedimiento: se abren las cápsulas, se vacía su contenido en una jeringa con 50 ml de agua. Se mezcla hasta producir una suspensión y a continuación se administra por sonda nasogástrica. Después se administran otros 50 ml de agua para cerciorarse de que la suspensión pase al estómago. A continuación pinzar la sonda nasogástrica durante una hora y si se considera no necesaria, quitarla.

Pacientes en los que no sean posibles ambas vías de administración se dará (PROGRAF) por vía intravenosa a la dosis de 1/5 de 0.15 mg /Kg diluido en 500 ml de suero salino o glucosado al 5% en infusión continua durante 24 horas. Esta vía de administración se utilizará solo en casos excepcionales.

Hay que tener en cuenta que Tacrolimus no debe manejarse con jeringas o sueros de PVC.

**Niveles en sangre recomendados:**

- **Días 7 al 90** ..... 10 - 15 ng/ml.
- **A partir del día 91** ..... 5 - 10 ng/ml.

**C. Esteroides:**

**Dosis preoperatoria:** 6-Metil Prednisolona 500 mg IV.

**Dosis 1er día:** 6-Metil Prednisolona 125 mg IV.

**Dosis a partir del 2º día postrasplante:**

- **Peso inferior a 45 Kg:** Prednisona oral 20 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 3 meses.
- **Peso entre 45-65 Kg:** Prednisona oral 25 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 3 meses.
- **Peso superior a 65 Kg:** Prednisona oral 30 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 4 meses.

**D. Micofenolato Mofetil (CELLCEPT®)**

CELLCEPT® comprimidos de 500 mg

CELLCEPT® comprimidos de 250 mg

**Dosis preoperatoria:** 1 gramo vía oral antes de ir a quirófano

**Dosis posoperatoria:** 500 mg una hora antes del desayuno y de la cena, mientras que esté recibiendo tratamiento con Timoglobulina. Un día antes de terminar la administración de Timoglobulina aumentar la dosis a 1.000 mg una hora antes del desayuno y de la cena (ajustar según cifras de leucocitos y plaquetas).

Hasta que el paciente tolere la vía oral, se administrará por vía IV a la misma dosis, diluidos en 250 ml de suero glucosado al 5% a pasar en 3 horas.

A partir del 1er mes reducción progresiva de la dosis hasta alcanzar 500 mg cada 12 horas.

Niveles en sangre recomendados de 2-4 mcg/ml.

En caso de intolerancia digestiva o cualquier otra condición médica que impida el uso de Micofenolato Mofetil se utilizará Acido micofenólico (**Myfortic®**), teniendo en cuenta la equivalencia de dosis:

- **Myfortic®** 360 mg equivale a **Cellcept®** 500 mg
- **Myfortic®** 180 mg equivale a **Cellcept®** 250 mg

### **E. Inmunoglobulina Humana**

Su administración **está indicada** en:

1. Casos de hiperinmunizados severos, título de anticuerpos citotóxicos igual o superior al 75% (en los 6 últimos meses).
2. Casos menos severos pero en los que no se pueda administrar la dosis completa de Timoglobulina (Leucopenia, virus B ó C por el riesgo de reactivación de los mismos).

**Dosis:** se administraran 4 dosis de 2 g/kg de peso con un intervalo de 3 semanas;

- La primera dividida en 5 dosis de 0.4 g/kg cada 24 horas, empezando en el posoperatorio inmediato.
- Las 3 restantes dosis de 2 g/kg en 24 horas.

Hay que tener en cuenta los pacientes que hayan recibido Inmunoglobulina humana pretrasplante como protocolo de desensibilización. En esos casos completar solo la dosis que no hubiera recibido pretrasplante. Según el tiempo transcurrido de la misma valorar si repetir.

### **PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINA HUMANA**

Las presentaciones comerciales más frecuentes son:

**Kiovig®** (100 mg/ml)

Presentaciones: 1 g - 10 ml

2.5 g - 25 ml

5 g - 50 ml

10 g - 100 ml

20 g - 200 ml

Pauta de administración. Se puede emplear sin diluir, y se puede administrar por vía periférica.

- Inicialmente 0.5 ml/kg en 30 minutos.
- Si buena tolerancia aumentar gradualmente hasta un máximo de 6 ml/kg/hora.

### **Flebogamma® (50 mg/ml)**

Presentaciones: 0.5 g - 10 ml

2.5 g - 50 ml

5 g - 100 ml

10 g - 200 ml

Pauta de administración. Se puede emplear sin diluir, y se puede administrar por vía periférica.

- Inicialmente 0.6 a 1.2 ml/kg/hora durante 30 minutos.
- Si buena tolerancia aumentar gradualmente hasta un máximo de 2.4 ml/kg/hora.

### **POSIBLES EFECTOS ADVERSOS DE IG INTRAVENOSA.**

La incidencia de efectos adversos relacionados con la administración de IG IV varía entre 12-23

% según las series:

- Las reacciones **más comunes** incluyen cefalea, fiebre, fatiga, escalofríos, mialgias, hipotensión, sudoración, congestión nasal, disnea, dolor abdominal y náuseas.

Ocurren con más frecuencia con infusiones rápidas (>0.8 ml/kg/min) y son mediadas por un aumento de las citocinas y sustancias vasodilatadoras. Estos síntomas suelen ser autolimitados y habitualmente responden a la disminución del ritmo de perfusión o a la interrupción de la misma, o bien con la administración de AINE (Ibuprofeno).

- **Más severas y generalmente tardías** son la cefalea severa y meningitis aséptica. Estos efectos adversos son infrecuentes pero más comunes en pacientes con historia de cefaleas migrañosas. Habitualmente responden a analgésicos (Ibuprofeno).
- Reacciones cutáneas como urticaria, prurito y petequias aparecen **raramente**.
- Puede ocurrir una **reacción transfusional anafiláctica severa en pacientes con un déficit completo de IgA** que desarrollan anticuerpos anti IgA (isotipo IgG y quizás IgE) ya que el preparado contiene pequeñas trazas de esta inmunoglobulina. Esta reacción es extremadamente rara, se estima una frecuencia de 1 cada 20.000-47.000 administraciones. El tratamiento de esta complicación se realiza con: difenhidramina, epinefrina, corticoides. (Hay que tener en cuenta que el déficit de IgA se asocia a algunas enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico y ciertas enfermedades glomerulares).

**El tratamiento de los efectos adversos incluye, según los casos:**

- Disminución del ritmo o interrupción de la perfusión.
- Difenhidramina (Benadryl®), ibuprofeno y/o esteroides.
- Sueroterapia.
- Epinefrina.
- Diazepam para los espasmos musculares.
- Considerar determinación de anticuerpos anti-IgA.
- Más recientemente se ha asociado a estos tratamientos **eventos trombóticos severos** (IAM, TVP, trombosis de vena central de la retina, vasculitis, embolismo pulmonar). La rápida infusión de IG IV ha sido identificada como posible factor de riesgo para el desarrollo de trombosis. Se recomienda que en aquellos pacientes con factores de riesgo como enfermedad coronaria, diabetes mellitus..., la concentración no sea mayor del 5 %. La perfusión debería iniciarse no más rápido de 0.5 ml/kg/h y aumentar progresivamente si es bien tolerado hasta un máximo de 4 ml/kg/h. Es importante

reseñar que esta complicación no aparece con todos los productos y parece que está en relación con el contenido en sodio y la osmolaridad (se ha descrito con Gammagard® y Polygam®).

Aconsejable por tanto, administración de dosis profiláctica de **heparina de bajo peso molecular** (salvo en los casos en que exista alguna contraindicación médica para ello).

En estos pacientes de alto riesgo inmunológico, si presentan oliguria postrasplante, **biopsiar precozmente, máximo 4º día**, para identificar posibles rechazos humorales.

### **3. DONANTES CON CRITERIOS EXPANDIDOS:**

- (Ver página 174).
- **RECEPTORES DE BAJO RIESGO INMUNOLOGICO (> 50 años, 1er trasplante renal ó retrasplante pero que no perdiera el primer injerto por causa inmunológica en los primeros 6 meses) y con PRA < 25 %).**

#### **A. Inducción con monoclonales anti CD 25: Basiliximab (Simulect®).**

**Basiliximab (Simulect®):** 1 vial de 20 mg IV antes de bajar a quirófano y el 4º día de evolución, diluido en 50 ml de suero fisiológico, a pasar en 20-30 minutos.

#### **B. Esteroides:**

**Dosis preoperatoria:** 6-Metil Prednisolona 500 mg IV.

**Dosis 1er día:** 6-Metil Prednisolona 125 mg IV.

#### **Dosis a partir del 2º día postrasplante:**

- **Peso inferior a 45 Kg:** Prednisona oral 20 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir la dosis hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.
- **Peso entre 45-65 Kg:** Prednisona oral 25 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.

- **Peso superior a 65 Kg:** Prednisona oral 30 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.

En pacientes con buena función renal, sin proteinuria, sin episodio de rechazo agudo, y con anticuerpos citotóxicos pre y postrasplante negativos, valorar iniciar la supresión de prednisona a partir del 3er mes de evolución (la supresión se realizará lentamente, al menos durante un periodo de un mes).

### **C. Tacrolimus de liberación prolongada (ADVAGRAF®):**

ADVAGRAF® cápsulas de 5 mg

ADVAGRAF® cápsulas de 1 mg

ADVAGRAF® cápsulas 0.5 mg

Se iniciará el tratamiento cuando se compruebe mejoría de la función renal por el descenso de las cifras de creatinina en sangre, y en todo caso como máximo el tercer día postrasplante.

**Dosis de inicio:** 0.1 mg/kg/día.

**Mantener niveles en sangre** entre 5-8 ng/ml.

### **D. Micofenolato Mofetil (CELLCEPT®):**

CELLCEPT® comprimidos de 500 mg

CELLCEPT® comprimidos de 250 mg

**Dosis preoperatoria:** 1 gramo vía oral antes de ir a quirófano

**Dosis posoperatoria:** 1.000 mg una hora antes del desayuno y de la cena. Hasta que el paciente tolere la vía oral, se administrará por vía IV a la misma dosis, diluidos en 250 ml de suero glucosado 5% a pasar en 3 horas.

A partir del 1er mes reducción progresiva de la dosis hasta alcanzar 500 mg cada 12 horas.

Niveles en sangre recomendados de 2-4 mcg/ml.

En caso de intolerancia digestiva o cualquier otra condición médica que impida el uso de Micofenolato Mofetil se utilizará Acido Micofenólico (**Myfortic®**), teniendo en cuenta la equivalencia de dosis:

- **Myfortic®** 360 mg equivale a **Cellcept®** 500 mg
- **Myfortic®** 180 mg equivale a **Cellcept®** 250 mg

#### **4. CASOS EN LOS QUE SE PREVEA NECROSIS TUBULAR AGUDA (CARACTERÍSTICAS DEL DONANTE), CON RECEPTORES JÓVENES.**

Se incluyen:

- Donantes con deterioro agudo de la función renal por inestabilidad hemodinámica u otras causas que puedan determinar necrosis tubular aguda.

Si la función renal no se normaliza previa a la extracción, se procederá a valorar la viabilidad del injerto mediante biopsia antes de su implante.

- Tiempo de isquemia fría prolongada (> 24 horas).

##### **A. Inducción con Timoglobulina:**

**Dosis preoperatorio:** 1.5 mg/kg de peso diluidos en 500 ml de suero fisiológico. La infusión se iniciará al comienzo de la intervención quirúrgica y se programará para que dure 10-12 horas (administrar a través de vía central ó fístula A-V).

**Posoperatorio:** continuar con 1 mg/kg/día entre 5 y 7 dosis, según evolución. (Ver pauta de administración de Timoglobulina en página 171).

Administrar la mitad de la dosis en casos de cifras de Leucocitos < 3.000/mm<sup>3</sup> y plaquetas < 80.000/mm<sup>3</sup>. Suspender cuando la cifra de leucocitos sea < 1.500/mm<sup>3</sup> o de plaquetas < 40.000/mm<sup>3</sup>.

##### **B. Esteroides:**

**Dosis preoperatoria:** 6-Metil Prednisolona 500 mg IV.

**Dosis 1er día:** 6-Metil Prednisolona 125 mg IV.

### **Dosis a partir del día 2 postrasplante:**

- **Peso inferior a 45 Kg:** Prednisona oral 20 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir la dosis hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.
- **Peso entre 45-65 Kg:** Prednisona oral 25 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.
- **Peso superior a 65 Kg:** Prednisona oral 30 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 3 meses.

En pacientes con buena función renal, sin proteinuria, sin episodio de rechazo agudo, y con anticuerpos citotóxicos pre y postrasplante negativos, valorar iniciar la supresión de prednisona a partir del 3er mes de evolución (la supresión se realizará lentamente, al menos durante un periodo de un mes).

### **C. Tacrolimus de liberación retardada (ADVAGRAF®):**

ADVAGRAF® cápsulas de 5 mg

ADVAGRAF® cápsulas de 1 mg

ADVAGRAF® cápsulas 0,5 mg

Se iniciará el tratamiento cuando se compruebe mejoría de la función renal por el descenso de las cifras de creatinina en sangre (entre el 3er y 5º día). Nunca después del 5º día.

**Dosis de inicio:** 0.12 mg/kg/día.

#### **Niveles en sangre recomendados:**

Mientras que se recupera la función renal mantener niveles entre 5 y 8 ng/ml.

Una vez que superada la fase de retraso de función renal:

- **Hasta el día 90** ..... 8 -12 ng/ml.
- **A partir del día 91** ..... 5 -10 ng/ml.
- En **pacientes estables** y que no hayan tenido episodios de rechazo agudo, mantener niveles en el rango bajo, entre 5 y 7 ng/ml.

#### **D. Micofenolato Mofetil (CELLCEPT®):**

CELLCEPT® comprimidos de 500 mg

CELLCEPT® comprimidos de 250 mg

**Dosis preoperatoria:** 1 gramo vía oral antes de ir a quirófano.

**Dosis posoperatoria:** 500 mg una hora antes del desayuno y de la cena, mientras que esté recibiendo tratamiento con Timoglobulina. Un día antes de terminar la administración de Timoglobulina aumentar la dosis a 1.000 mg una hora antes del desayuno y de la cena (ajustar según cifras de leucocitos y plaquetas). A partir del día 15 y cuando el paciente tenga niveles adecuados de Tacrolimus, reducción progresiva de la dosis hasta alcanzar 500 mg cada 12 horas.

Hasta que el paciente tolere la vía oral, se administrará por vía IV a la misma dosis diluidos en 250 ml de suero glucosado al 5% a pasar en 3 horas.

Niveles en sangre recomendados de 2-4 mcg/ml.

En caso de intolerancia digestiva o cualquier otra condición médica que impida el uso de Micofenolato Mofetil se utilizará Acido Micofenólico (**Myfortic®**), teniendo en cuenta la equivalencia de dosis:

- **Myfortic®** 360 mg equivale a **Cellcept®** 500 mg
- **Myfortic®** 180 mg equivale a **Cellcept®** 250 mg

Si no se recupera la función renal, biopsiar precozmente (aproximadamente el 4º día), por el riesgo de asociación de NTA y rechazo agudo.

#### **5. RIÑONES EXTRAÍDOS EN ASISTOLIA**

Esta situación tiene algunas consideraciones especiales:

- Es esperable una necrosis tubular aguda prolongada, por lo que se debe retrasar la introducción de anticalcineurínicos y mantener niveles bajos.
- Por otro lado el daño producido por la isquemia favorece la presentación de rechazo agudo.

### **A. Inducción con Timoglobulina:**

**Dosis preoperatoria:** 1.5 mg/kg de peso diluidos en 500 ml de suero fisiológico a iniciar al comienzo de la intervención quirúrgica y programado para que la infusión dure 10-12 horas (administrar a través de vía central o fístula A-V).

**Posoperatorio:** continuar con 1 mg/kg/día entre 5 y 7 dosis, según evolución. (Ver pauta de administración de Timoglobulina en página 171).

### **B. Esteroides:**

**Dosis preoperatoria:** 6-Metil Prednisolona 500 mg IV.

**Dosis 1er día:** 6-Metil Prednisolona 125 mg IV.

#### **Dosis a partir del día 2 postrasplante:**

- **Peso inferior a 45 Kg:** Prednisona oral 20 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir la dosis hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.
- **Peso entre 45-65 Kg:** Prednisona oral 25 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.
- **Peso superior a 65 Kg:** Prednisona oral 30 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 3 meses.

En pacientes con buena función renal, sin proteinuria, sin episodio de rechazo agudo, y con anticuerpos citotóxicos pre y postrasplante negativos, valorar iniciar la supresión de prednisona a partir del 3er mes de evolución (la supresión se realizará lentamente, al menos durante un periodo de un mes).

### **C. Tacrolimus de liberación retardada (ADVAGRAF®):**

ADVAGRAF® cápsulas de 5 mg

ADVAGRAF® cápsulas de 1 mg

ADVAGRAF® cápsulas 0,5 mg

Se iniciará el tratamiento cuando se compruebe mejoría de la función renal por el descenso de las cifras de creatinina en sangre (entre el 3er y 5º día). Nunca después del 5º día.

**Dosis de inicio:** 0.12 mg/kg/día.

**Niveles en sangre recomendados:**

Mientras que se recupera la función renal mantener niveles entre 5 y 8 ng/ml.

Una vez que superada la fase de retraso de función renal :

- **Hasta el día 90** ..... 8 -12 ng/ml.
- **A partir del día 91** ..... 5 -10 ng/ml.
- En **pacientes estables** y que no hayan tenido episodios de rechazo agudo, mantener niveles en el rango bajo, entre 5 y 7 ng/ml.

#### **D. Micofenolato Mofetil (CELLCEPT®):**

CELLCEPT® comprimidos de 500 mg

CELLCEPT® comprimidos de 250 mg

**Dosis preoperatoria:** 1 gramo vía oral antes de ir a quirófano

**Dosis posoperatoria:** 500 mg una hora antes del desayuno y de la cena, mientras que esté recibiendo tratamiento con Timoglobulina. Un día antes de terminar la administración de Timoglobulina aumentar la dosis a 1.000 mg una hora antes del desayuno y de la cena (ajustar según cifras de leucocitos y plaquetas). A partir del día 15 y cuando el paciente tenga niveles adecuados de Tacrolimus, reducción progresiva de la dosis hasta alcanzar 500 mg cada 12 horas.

Hasta que el paciente tolere la vía oral, se administrará por vía IV a la misma dosis diluidos en 250 ml de suero glucosado al 5% a pasar en 3 horas

Niveles en sangre recomendados de 2-4 mcg/ml.

En caso de intolerancia digestiva o cualquier otra condición médica que impida el uso de Micofenolato Mofetil se utilizará Acido Micofenólico (**Myfortic®**), teniendo en cuenta la equivalencia de dosis:

- **Myfortic®** 360 mg equivale a **Cellcept®** 500 mg
- **Myfortic®** 180 mg equivale a **Cellcept®** 250 mg

Si no se recupera la función renal, biopsiar precozmente, por el riesgo de asociación de NTA y rechazo agudo.

## **6. RECEPTORES CON SÍNDROME HEMOLÍTICO UREMICO COMO ENFERMEDAD DE BASE, O QUE LO DESARROLLARON EN TRASPLANTE PREVIO:**

- Todos los pacientes deberían tener un estudio para valorar si existe una mutación genética de las de alto riesgo de recidiva. Estos estudios en la actualidad se realizan de forma centralizada en el Hospital Universitario La Paz de Madrid, Unidad de Investigación (Dra Pilar Sánchez-Corral Gómez). La petición hay que solicitarla a través del Laboratorio de Genética del Hospital Materno Infantil de Málaga.
- Se realizan:

### **ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS**

#### **Perfil de complemento**

Niveles de C3

Niveles de C4

#### **Estudio de la vía alterna del Complemento**

Ensayo de regulación de la vía alternativa

Concentración plasmática de factor H

Autoanticuerpos anti factor H en plasma

Caracterización estructural del factor H en plasma

Concentración plasmática de factor I

Expresión de MCP (*Membrana Cofactor Protein*) en Pbls (*leucocitos de sangre periférica*)

#### **ESTUDIOS GENÉTICOS (Polimorfismos y mutaciones)**

Gen de factor H

Gen de MCP

Gen de factor I

- Según los resultados de dicho estudio las recomendaciones actuales son

I. Recomendación de Trasplante Renal Aislado

II. Recomendaciones para trasplante combinado Hígado-Riñón

III. Casos en los que en la actualidad no hay recomendaciones claras sobre si realizar trasplante renal aislado o trasplante combinado hígado-riñón

### **Recomendaciones perioperatorias y pauta de Inmunosupresión**

#### **Recomendaciones de PLASMAFERESIS**

Las plasmaféresis están recomendadas:

- Cuatro a 6 horas antes de la cirugía (un mínimo de 1.5 volumen plasmático), reposición con plasma fresco. Repetir en caso de que se retrase la cirugía.
- Posoperatoriamente, dentro de las 24 horas después de la intervención quirúrgica.
- Si se presentan complicaciones posoperatorias (reintervención quirúrgica, retraso de la función del injerto, rechazo) o recurrencia del Síndrome Hemolítico Urémico. En este caso, pauta intensiva de plasmaféresis, se recomienda : recambio de 1 volumen plasmático por sesión, 1 sesión diaria durante 5 días consecutivos, después 5 por semana durante 2 semanas y 3 sesiones por semana durante 2 semanas más.

#### **Recomendaciones de INMUNOSUPRESION:**

La Declaración del consenso no hace recomendaciones específicas sobre los protocolos de inmunosupresión. En particular: el Síndrome Hemolítico Urémico no se considera “per se” una contraindicación para el tratamiento con anticalcineurínicos. La inmunosupresión inicial con inhibidores de la señal de proliferación (Sirolimus o Everolimus) no es muy alentadora, por ausencia de ventajas clínicas demostradas y sin embargo los problemas que pueden existir en cuanto a retraso de la cicatrización, fístulas urinarias, linfocelos y función retrasada del injerto.

Belatacept es un fármaco inmunosupresor, cuyo mecanismo de acción es el bloqueo selectivo de la coestimulación, mediante la unión con CD 80 y CD 86 de la célula presentadora de antígeno. Hasta el momento actual, no se han descrito con su uso aparición de microangiopatía trombótica postrasplante<sup>3</sup>. Puede estar por tanto indicado, en aquellos casos de microangiopatía trombótica pretrasplante en los que el estudio genético anteriormente descrito sea negativo. Recientemente (2011) comercializado en Europa, ha de solicitarse como medicamento extranjero a través del Servicio de Farmacia del Hospital.

Como premisa previa es necesario conocer el estado serológico del virus de Epstein- Barr del receptor, puesto que Belatacept está **contraindicado en los receptores con serología del virus de Epstein-Barr (anticuerpos EB IgG) negativa, o desconocida.**

**Dada la complejidad de estos síndromes, todo paciente que este incluido en lista de espera deberá de tener en su historia claramente especificado el tipo de trasplante y el protocolo de inmunosupresión a seguir.**

En caso de decidir tratamiento con **BELATACEPT (NULOJIX®)**, la pauta a seguir sería:

#### **A. Inducción con Timoglobulina:**

**Dosis preoperatorio:** 1.5 mg/Kg de peso diluidos en 500 ml de suero fisiológico La infusión se iniciará al comienzo de la intervención quirúrgica y se programará para que dure 10-12 horas (administrar a través de vía central ó fístula A-V).

**Post-operatorio:** continuar con 1 mg/Kg/día, hasta completar 7 dosis. (Ver pauta de administración de Timoglobulina en página 171).

#### **B. Esteroides:**

**Dosis Preoperatoria:** 6-Metil Prednisolona 500 mg IV.

**Dosis del 1er día:** 6-Metil Prednisolona 125 mg IV.

**Dosis a partir del 2º día postrasplante:**

- **Peso inferior a 45 Kg:** Prednisona oral 20 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir la dosis hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.
- **Peso entre 45-65 Kg:** Prednisona oral 25 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 3 meses.
- **Peso superior a 65 Kg:** Prednisona oral 30 mg/día. A partir del día 14 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 3 meses.

### **C. Micofenolato Mofetil:**

**Dosis Preoperatoria:** 1 gramo vía oral antes de ir a quirófano

**Dosis post-operatoria:** 500 mg una hora antes del desayuno y de la cena, mientras que este en tratamiento con Timoglobulina. Un día antes del cese de la misma aumentar a 1.000 mg una hora antes del desayuno y de la cena. Hasta que el paciente tolere la vía oral, se administrará por vía IV a la misma dosis, diluidos en 250 ml de suero glucosado 5% a pasar en 2-3 horas.

En general se mantiene la dosis de 2.000 mg al día mientras que el paciente esté en tratamiento con belatacept, salvo efectos secundarios.

Niveles en sangre recomendados de 2-4 mcg/ml.

En caso de intolerancia digestiva o cualquier otra condición médica que impida el uso de Micofenolato Mofetil se utilizará Acido Micofenólico (**Myfortic®**), teniendo en cuenta la equivalencia de dosis:

- **Myfortic®** 360 mg equivale a **Cellcept®** 500 mg
- **Myfortic®** 180 mg equivale a **Cellcept®** 250 mg

### **D. BELATACEPT (NULOJIX®):**

- Viales de 250 mg.
- Lo preparan en la Farmacia del Hospital (diluidos en 50-100 ml de suero fisiológico).
- Administración en infusión constante, durante 30 minutos.
- Puede administrarse por vía periférica.

- No es necesaria premedicación.

**Pauta de administración:**

- Cuatro dosis de **10 mg/kg**: 8º día postrasplante, semanas 3, 5 y 9 postrasplante.
- Continuar con **5 mg/kg** cada 4 semanas, de forma indefinida.

Vigilancia del virus de Epstein Barr, mediante determinación frecuentemente de la PCR en sangre.

**E. Plasmaféresis:**

Realizar 2 sesiones de plasmaféresis (pretrasplante y en las primeras 24 horas tras la cirugía) según las recomendaciones del apartado anterior (páginas 156 y 172).

**Profilaxis con antiagregantes plaquetarios.**

- En el postoperatorio inmediato **heparina de bajo peso molecular** a dosis profiláctica
- Para continuar con **ácido acetil salicílico** 100-150 mg/día durante al menos 3 meses (preferible de forma indefinida).

En estos pacientes, si disfunción renal (y si no hay contraindicación médica) hacer biopsia precozmente.

**7. PACIENTES CON TUMORES PREVIOS AL TRASPLANTE.**

Los pacientes recibirán la inmunosupresión estándar según al grupo a que pertenezcan, evitando, si es posible, la administración de anticuerpos poli ó monoclonales.

A partir de los 2-3 meses postrasplante retirada progresiva del anticalcineurínico y sustitución por inhibidor de m-TOR (Sirolimus o Everolimus).

## 8. RECEPTORES CON HBV y HCV.

### Donantes renales con serología positiva para virus de la Hepatitis B:

- Los injertos de **donantes con Ag HBs positivo** podrán ser valorados para su implante en receptores Ag HBs positivo.
- Previamente, deberá realizarse determinación para el **virus delta** que debe ser negativa. En caso de positividad, se desestimaré el donante para trasplante.

Los pacientes virus B deberán recibir tratamiento con **Lamivudina** desde el postoperatorio inmediato, ajustando la dosis a la función renal según el siguiente esquema:

<b>Aclaramiento de creatinina (ml/min)</b>	<b>Dosis diaria</b>
> 50 ml/min	100 mg
30-50 ml/min	50 mg
15-30 ml/min	25 mg
5 – 15 ml/min	15 mg
< 5 ml/min	10 mg

Los pacientes recibirán la inmunosupresión estándar según al grupo a que pertenezcan, evitando, si es posible, la administración de anticuerpos poli ó monoclonales.

En la fase de seguimiento se recomienda:

- Retirada de esteroides a partir del tercer mes, si el paciente alcanza una buena función renal y no ha presentado episodio de rechazo agudo.
- Inmunosupresión menos agresiva.

### **Donantes renales con serología positiva para virus de la Hepatitis C (VHC):**

- Los injertos renales de donantes con serología positiva para VHC, podrán ser valorados para su implante en receptores con anticuerpos antiVHC positivos, PCR positiva para VHC y genotipo 1b del VHC.
- Los receptores que reciban estos injertos deberán recibir consentimiento escrito específico para esta condición (cuando se incluyan en lista de espera), además del habitual consentimiento informado para el trasplante.

Según las guías KDIGO 2008 4, el protocolo de inmunosupresión más adecuado para los pacientes HVC no ha sido determinado y todos los agentes inmunosupresores disponibles en la actualidad pueden ser usados.

Por tanto, los pacientes recibirán la inmunosupresión estándar según al grupo a que pertenezcan, evitando, si es posible, la administración de anticuerpos poli ó monoclonales.

Algunas recomendaciones:

- a.** Utilizar en general inmunosupresión menos agresiva.
- b.** Retirada de **esteroides** a partir del tercer mes, si el paciente alcanza una buena función renal y no ha presentado episodio de rechazo agudo. (Pacientes hiperinmunizados y/o retrasplante, valoración individual).
- c.** Estudios en pacientes HCV no trasplantados, sugieren que la terapia con **micofenolato** pueden tener un efecto inhibitorio sobre la replicación viral, y aunque esto no ha sido demostrado en receptores de trasplante, los estudios tanto en trasplante hepático como en trasplante renal sugieren una evolución favorable de los pacientes VHC cuando se asocia ácido micofenólico al tratamiento.
- d.** Si el paciente desarrolla diabetes postrasplante valorar la posibilidad de cambiar **Tacrolimus** por **Ciclosporina**. Si el paciente no tiene factores de riesgo inmunológico, dar inmunosupresión con Ciclosporina, Micofenolato y esteroides (pauta a continuación).
- e.** Existe poca información en la actualidad del uso de **Sirolimus** en estos pacientes.

## INMUNOSUPRESIÓN CON CICLOSPORINA PARA PACIENTES VIRUS C + Y BAJO RIESGO INMUNOLÓGICO

### A. Ciclosporina (SANDIMMUN):

SANDIMMUN cápsulas 100 mg

SANDIMMUN cápsulas de 50 mg

SANDIMMUN cápsulas de 25 mg

**Dosis preoperatoria:** 5 mg/kg, vía oral.

**Dosis postrasplante:** 5 mg/kg cada 12 horas. Si el paciente no tolera la vía oral, se administrará por vía venosa 1/3 de esta dosis en 250 ml de solución de glucosa al 5% a pasar en 6-8 horas cada 12 horas.

Niveles en sangre recomendados:

- Hasta el mes 3 ----- 150-250 ng/ml.
- A partir del 3 mes ----- 100-200 ng/ml.
- A partir del año ----- 50-150 ng/ml.

### B. Esteroides:

**Dosis Preoperatoria:** 6-Metil Prednisolona 500 mg IV.

**Dosis primer día:** 6-Metil Prednisolona 125 mg IV.

**Dosis a partir del día 2 postrasplante:**

- **Peso inferior a 45 Kg:** Prednisona oral 20 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir la dosis hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.
- **Peso entre 45-65 Kg:** Prednisona oral 25 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.
- **Peso superior a 65 Kg:** Prednisona oral 30 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 3 meses.

En pacientes con buena función renal, sin proteinuria, sin episodio de rechazo agudo, y con anticuerpos citotóxicos pre y postrasplante negativos, valorar iniciar la supresión de prednisona

a partir del 3er mes de evolución (la supresión se realizará lentamente, al menos durante un periodo de un mes).

### **C. Micofenolato Mofetil (CELLCEPT®):**

CELLCEPT® comprimidos de 500 mg

CELLCEPT® comprimidos de 250 mg

**Dosis Preoperatoria:** 1 gramo vía oral antes de ir al quirófano.

**Dosis post-operatoria:** 2.000 mg/día (1.000 mg una hora antes del desayuno y 1.000 mg una hora antes de la cena). No mezclarlos con preparados de hierro oral.

Hasta que el enfermo tolere por vía oral, se administra por vía IV a la misma dosis, diluido en 250 ml de suero glucosado al 5% a pasar en 2-3 horas.

Niveles en sangre recomendados: entre 2-4 mcg/ml.

En general, la dosis de mantenimiento de MMF cuando se utiliza en combinación con Ciclosporina es de 1.000 mg cada 12 horas. Valorar de forma individual según el riesgo inmunológico la posibilidad de disminuir la dosis hasta 500 mg/12 horas.

En caso de intolerancia digestiva o cualquier otra condición médica que impida el uso de Micofenolato Mofetil se utilizará Acido micofenólico (**Myfortic®**), teniendo en cuenta la equivalencia de dosis:

- **Myfortic®** 360 mg equivale a **Cellcept®** 500 mg
- **Myfortic®** 180 mg equivale a **Cellcept®** 250 mg

Si tras la cirugía no hay diuresis inmediata y la sospecha es de Necrosis Tubular Aguda, modificar la inmunosupresión:

### **A. Ciclosporina:**

**Dosis Post-operatoria:** 2 mg/kg de peso cada 12 horas, una hora antes del desayuno y de la cena, para mantener niveles entre 50 y 100 ng/ml.

Una vez superada la fase de retraso de función renal volver a los niveles recomendados en el apartado anterior:

### **Niveles en sangre recomendados:**

- **Desde que se recupere función renal hasta el día 90:** 150-250 ng/ml.
- **A partir del día 91:** 100 - 150 ng/ml.
- **A partir del año:** entre 50 - 150 ng/ml.

**B. Simulect® (Basiliximab):** 1 vial de 20 mg IV, diluido en 50 ml de suero fisiológico, a pasar en 20-30 minutos. (Cuando se confirme la situación función retrasada, en las primeras 24 horas del postoperatorio).

- Segunda dosis de 20 mg: 4 días después.

### **C. Esteroides:**

Misma pauta que el apartado anterior.

### **D. Micofenolato Mofetil (CELLCEPT®):**

Misma pauta que el apartado anterior.

Si persiste el retraso de la función renal realizar biopsia de forma precoz como máximo entre el 5-7º día postrasplante.

## **9. TRASPLANTE RENAL DE DONANTE VIVO.**

Una de las ventajas del trasplante renal de donante vivo es poder administrar los inmunosupresores desde días antes de la intervención quirúrgica, previniendo así mejor el rechazo agudo.

La terapia será individualizada según las características de donante y receptor.

## **PRIMER TRASPLANTE RENAL, BAJO RIESGO INMUNOLOGICO, DONANTE ESTANDAR**

### **A. Tacrolimus de liberación prolongada (ADVAGRAF®):**

**Dosis:** 0.1 mg/kg/24 horas, iniciando el tratamiento 3-4 días antes del trasplante. El día de la intervención se determinará en la mañana los niveles en sangre, para modificar si es preciso la dosis, según los mismos.

#### **Niveles en sangre recomendados:**

- **Día 1 al 90:** 8-12 ng/ml (en los primeros 14 días mantener alrededor de 12 ng/ml).
- **A partir del día 91:** 5-10 ng/ml.
- En **pacientes estables**, y que no hayan tenido episodios de rechazo postrasplante: mantener niveles en el rango bajo, entre 5 y 7 ng/ml.

### **B. Micofenolato Mofetil (CELLCEPT®):**

**Dosis:** 500 mg vía oral cada 12 horas desde 3-4 días antes del trasplante.

**A partir de la intervención quirúrgica:** 2.000 mg/día (1.000 mg una hora antes del desayuno y 1.000 mg una hora antes de la cena). Hasta que el enfermo tolere por vía oral, se administra por vía IV a la misma dosis, diluido en 250 ml de suero glucosado al 5% a pasar en 2-3 horas.

A partir del día 15º de evolución, y si el paciente ha alcanzado niveles adecuados de tacrolimus disminuir progresivamente la dosis hasta alcanzar 500 mg/12 horas. Siempre una hora antes o dos horas después de tomar cualquier alimento.

### **C. Esteroides:**

**Dosis preoperatoria:** 6-Metil Prednisolona 500 mg IV.

**Dosis primer día:** 6-Metil Prednisolona 125 mg IV.

#### **Dosis a partir del día 2 postrasplante:**

- **Peso inferior a 45 kg:** Prednisona oral 20 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir la dosis hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses.

- **Peso entre 45-65 Kg:** Prednisona oral 25 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 2 meses
- **Peso superior a 65 Kg:** Prednisona oral 30 mg/día. A partir del día 15 de evolución comenzar a reducir hasta alcanzar 5 mg/día a los 3 meses.

En pacientes con buena función renal, sin proteinuria, sin episodio de rechazo agudo, y con anticuerpos citotóxicos pre y postrasplante negativos, valorar iniciar la supresión de prednisona a partir del 3er mes de evolución (la supresión se realizará lentamente, al menos durante un periodo de un mes).

**D. Simulect® (Basiliximab):** 1 vial de 20 mg IV, diluido en 50 ml de suero fisiológico, a pasar en 20-30 minutos, antes de bajar al quirófano.

- Segunda dosis de 20 mg: 4 días después.

Algunas situaciones clínicas especiales.

#### I. RECEPTOR DE ALTO RESGO INMUNOLÓGICO: HIPERINMUNIZADO, SEGUNDO TRASPLANTE....

- Inducción con **Timoglobulina**. Misma pauta que pacientes hiperinmunizados, apartado 2 (página 142) de este protocolo.
- **Tacrolimus** y **micofenolato** desde 3-4 días pretrasplante como en el apartado anterior. A partir del trasplante misma pauta que pacientes hiperinmuizados, apartado 2 (página 142) de este protocolo.
- **Esteroides:** Dosis preoperatoria: 500 mg IV pretrasplante, seguir misma pauta que pacientes hiperinmuizados, apartado 2 (página 142) de este protocolo.

## II. DONANTE Y RECEPTOR HLA IDÉNTICOS

- En estos casos no es necesario la inducción con anticuerpos monoclonales (anti CD25, basiliximab) o policlonales (timoglobulina) salvo en caso de elevado riesgo inmunológico o donante con criterios expandidos.
- Se utilizará terapia estándar con tacrolimus, micofenolato (ambos desde varios días antes del trasplante) y esteroides.
- En los casos de buena evolución clínica se podrán suspender los esteroides precozmente.
- Mantener niveles de tacrolimus en el rango bajo (4-7 ng/ml) y a partir de los 6 meses postrasplante valorar suspenderlo manteniendo al paciente solo con micofenolato.

**IMPORTANTE:** en todos los casos (salvo contraindicación expresa), administrar una dosis de **heparina de bajo peso molecular** la noche antes del trasplante.

### PAUTAS DE PROFILAXIS

#### ANTIBIÓTICOS PRE-CIRUGÍA

**Cefotaxima** 1 g antes de ir a quirófano. Si el paciente no presenta NTA (confirmado con descenso de creatinina sérica) se le administran, a partir de las 24 horas, 1 g cada 12 horas hasta completar dos dosis.

Pacientes alérgicos a cefalosporinas recibirán **Ciprofloxacino** 200 mg IV.

#### PNEUMOCISTIS CARINII

**Trimetoprin - Sufametoxazol** (Septrin® 80/400 mg) 1 comprimido diario durante 6 meses a todos los pacientes, salvo alérgicos a sulfamidas.

#### CITOMEGALOVIRUS

Pauta de profilaxis a seguir:

**A.** Donante positivo y receptor negativo:

**Ganciclovir** IV los primeros días postrasplante y seguir con **Valganciclovir** oral durante al menos 6 meses.

Determinación de PCR de CMV en sangre periódicamente sobre todo cuando se suspenda la profilaxis.

**B.** Donante positivo o negativo y receptor positivo:

**Valganciclovir** oral durante 3 meses.

Determinación de PCR CMV en sangre periódicamente, fundamentalmente cuando se suspenda la profilaxis.

**C.** Donante y receptor negativos:

No se hace profilaxis. 37

Seguimiento periódico, determinación de PCR CMV en sangre y si fuera positiva tratamiento con **Valganciclovir/Ganciclovir** hasta que se negativice.

**Ganciclovir:** se diluye en 100 ml de suero fisiológico y se administra en 60 minutos. La solución debe usarse dentro de las 24 horas de su preparación.

Ajuste de dosis de **Ganciclovir** según la función renal:

Filtrado Glomerular > 50 ml/min ..... 5 mg/kg/12 horas.

25 – 49 ml/min ..... 2.5 mg/kg/12 horas.

10- 25 ml/min ..... 2.5 mg/kg/24 horas.

< 10 ml/min ..... 1.25 mg/kg/24 horas.

Los pacientes en diálisis recibirán 1.25 mg/kg/24 horas. El día que se dialicen, la dosis se administrará después de la sesión de hemodiálisis.

**Valganciclovir** (Valcyte®) comprimidos de 450 mg.

Ajuste de dosis de <b>Valganciclovir</b> según la función renal: <b>Filtrado glomerular (ml/min)</b>	<b>Dosis de Inducción</b>	<b>Dosis de Mantenimiento</b>
≥ 60 ml/min	900 mg 2 veces al día	900 mg/día , una vez al día
40-59 ml/min	450 mg , 2 veces al día	450 mg/día
25-39 ml/min	450 mg una vez al día	450 mg/días alternos
10-24 ml/min	450 mg cada 2 días	450 mg dos veces a la semana

## RECHAZO AGUDO

Siempre que se sospeche episodio de rechazo hay que solicitar **anticuerpos citotóxicos**.

A. Primer episodio: realizar siempre biopsia del injerto, salvo que exista algún impedimento o contraindicación médica.

1. Rechazo agudo leve (Grado I de Banff): **esteroides**. Tres dosis de 500 mg IV de 6-Metil-Prednisolona.
2. Rechazo agudo moderado (Grado II de Banff): iniciar tratamiento conjuntamente con **esteroides** (500 mg/día, 3 días) y **timoglobulina**.

B. Segundo o posteriores episodios de rechazo agudo. Siempre se hace biopsia renal. Se seguirá la pauta anterior.

## RECHAZO AGUDO CORTICO-RESISTENTE

Normalmente se esperará 24-48 horas para ver si hay respuesta a los esteroides, y si no la hubiera, iniciar tratamiento con **Timoglobulina**: 1.5 mg/kg/día durante 7-10 días.

## RECHAZO AGUDO HUMORAL CON DEPÓSITOS DE C4d.

1. **Plasmaféresis** a días alternos según respuesta (como mínimo tres). Realizar determinaciones periódicas de anticuerpos citotóxicos (preplasmaféresis) e intentar mantener las sesiones de plasmaféresis hasta la desaparición o disminución de los anticuerpos circulantes.

Extracción generalmente de dos litros de plasma; reposición con suero fisiológico y albúmina (no plasma) (ver pauta en página 172).

2. **Inmunoglobulina inespecífica** 0.2–0.4 g/kg a días alternos (máximo 2 g/kg como dosis acumulada). (Ver pauta de administración en página 145).

3. **Timoglobulina 1 mg/kg** a días alternos (las dos primeras diarias) durante 7-10 días (según respuesta). (Ver pauta de administración en página 171). Siempre después de la plamaféresis.

4. **Tacrolimus** para mantener niveles entre 6-8 ng/ml. Una vez que se suspenda la timoglobulina ajustar dosis para mantener niveles entre 10-12 ng/ml.

5. **Micofenolato Mofetil** durante el tratamiento con timoglobulina 500 mg/12 horas y después aumentar a 1.000 mg/12 horas.

6. **Esteroides** como en los protocolos anteriores.

7. **Rituximab:** En los casos de no respuesta al tratamiento con plasmaféresis + Inmunoglobulina, administrar Rituximab a dosis de 375 mg/m<sup>2</sup>/semana hasta un máximo de 4, aunque la tendencia actual es administrar solo 2 dosis, una cuando se considere no respuesta a las plasmaféresis + inmunoglobulina y la 2ª y última al finalizar el tratamiento con plasmaféresis. (Ver pauta de administración en página 172).

Administrar profilaxis anti CMV y anti pneumocistis carinii.

#### **Pauta de Administración de TIMOGLOBULINA**

1. Antes de administrar la 1ª dosis, el paciente deberá estar en su peso seco (forzar la diuresis con furosemida, o realizar diálisis y/o ultrafiltración si es necesario).

2. La temperatura debe ser inferior a 38 °C. Administrar previamente paracetamol si es necesario.

3. Pre-medicación antes de la 1ª y 2ª dosis: Solumoderin® 125 mg IV una hora antes y Polaramine ® 1 vial (5 mg) IV 15 minutos antes.

4. Diluir la dosis calculada en 500 ml de suero fisiológico y administrar en 12 horas a través de vía central o fístula A-V.

- Si buena tolerancia a partir del 3º-4º día se puede administrar un poco más rápido, pero siempre como mínimo en 6 horas.
- Se puede disminuir también el volumen de suero fisiológico (pacientes con sobrecarga de volumen, oliguria) a 250 ml (mínimo 50 ml de fisiológico por cada vial de TMG (25 mg)).

5. No se requiere premedicación para el resto del ciclo. Administrar paracetamol o Nolotil®, si fiebre o cefalea.

6. Durante el ciclo de tratamiento con timoglobulina, reducir la inmunosupresión que tomara previamente el paciente:

Micofenolato: intentar mantener 500 mg/12 h. (Vigilar cifras de Leucocitos y plaquetas).

Prednisona: mantener misma dosis.

Anticalcineurínico o inhibidor de m-TOR disminuir la dosis para intentar mantener los niveles que se han descrito en cada apartado. Dos días antes de terminar el ciclo, aumentar dosis, para que se alcancen niveles terapéuticos adecuados.

7. Siempre que se use Timoglobulina hay que hacer **profilaxis anti CMV** (salvo en el caso de receptor y donante negativos) y **pneumocitis carinii**.

#### **Pauta de Administración de RITUXIMAB (MABTHERA®)**

- Premedicación 30-60 minutos antes con 125 mg de 6-Metil-Prednisolona.
- Diluir la dosis calculada, en suero fisiológico, generalmente 500 ml (concentración recomendada entre 1-4 mg/ml).
- Se puede administrar por vía periférica.
- Comenzar la infusión a ritmo de 50 mg/hora, si es bien tolerada aumentar cada 30 minutos hasta un máximo de 400 mg/hora.
- Si fiebre administrar paracetamol.

#### **Pauta de PLASMAFÉRESIS**

Habitualmente se extraen 2500 ml, pero lo adecuado es calcular el volumen plasmático. En el caso de rechazo humoral los recambios se realizaran de 1 VP.

#### **Calculo del Volumen Plasmático (VP):**

$$VP = (1 - Ht^n) \times (b + cP)$$

**P:** Peso corporal magro (Kg).

**b:** 1530 para los hombres, 864 para las mujeres.

**c:** 41 para los hombres y 47.2 para las mujeres.

Una regla mnemotécnica es asignar al volumen plasmático un valor aproximado de 35 a 40 ml/Kg de peso corporal, aplicando el valor más bajo a los pacientes con Ht° normal y 40ml/Kg a los que presenten valores inferiores a lo normal. Por ejemplo: un paciente de 70 Kg con un Ht° normal (0.45) tendría un volumen plasmático estimado de  $70 \times 40 = 2800$  ml.

La reposición se hará con suero fisiológico y albúmina

- Albúmina 20 % : 250 ml (5 frascos de 50 ml).
- Suero fisiológico: 1500 ml (variar en función del volumen plasmático calculado, para que la suma total de la reposición sea igual al volumen de plasma extraído).
- Gluconato calcico: 2.5 ml por cada 500 ml de suero fisiológico (Calcium Sandoz® 10%, viales de 10 ml).
- Bicarbonato sódico 1/6 M: 500 ml.

**Heparina sódica 1%:** 50 mg de inicio y 10 mg/hora.

**Bomba:** 50- 100 ml/min.

## CRITERIOS DE DONANTES EXPANDIDOS

I. Criterios de la UNOS de Port y Metzger modificados (Am J Transplant 2003;3 Suppl.4:114-125).

1. Donante  $\geq 60$  años
2. Donante 50-60 años con al menos 2 de estas condiciones:
  - Muerte cardiovascular (IAM ó ACV isquémico).
  - Presencia de HTA y/o diabetes.
  - Creatinina sérica  $> 1.5$  mg/dl.

II. Score de Nyberg 2003 (Niberg SL, Am J transplant 2003;3. 715-721).

Variable	Score
<b>Edad</b>	
< 30	<b>0</b>
30-39	<b>5</b>
40-49	<b>10</b>
50-59	<b>15</b>
60-69	<b>20</b>
> 70	<b>25</b>
<b>Historia de HTA</b>	
No	<b>0</b>
Si, Duración desconocida	<b>2</b>
< 5 años	<b>2</b>
6-10 años	<b>3</b>
> 10 años	<b>4</b>
<b>C Cr</b>	
> 100	<b>0</b>
75-99	<b>2</b>
50-74	<b>3</b>
<50	<b>4</b>
<b>Mismatch HLA</b>	
0	<b>0</b>
1-2	<b>1</b>
3-4	<b>2</b>
5-6	<b>3</b>
<b>Causa de muerte</b>	
No ACV	<b>0</b>
ACV	<b>3</b>
<b>TOTAL</b>	<b>0 - 39</b>

<b>NYBERG, 2003</b>	
<b>Riñones</b>	<b>Puntos</b>
<b>A</b>	<b>0 - 9</b>
<b>B</b>	<b>10 - 19</b>
<b>C</b>	<b>20-29</b>
<b>D</b>	<b>30-39</b>

Un Donante con **puntuación > 19 (C o D)** debe considerarse con criterio expandido.

### III. Criterios de Nyberg modificados (excluyendo MM HLA) (Málaga, 2009).

<b>Variable</b>	<b>Score</b>
<b>Edad</b>	
< 30	<b>0</b>
30-39	<b>5</b>
40-49	<b>10</b>
50-59	<b>15</b>
60-69	<b>20</b>
> 70	<b>25</b>
<b>Historia de HTA</b>	
No	<b>0</b>
Si, Duración desconocida	<b>2</b>
< 5 años	<b>2</b>
6-10 años	<b>3</b>
> 10 años	<b>4</b>
<b>C Cr</b>	
> 100	<b>0</b>
75-99	<b>2</b>
50-74	<b>3</b>
<50	<b>4</b>
<b>Causa de muerte</b>	
No ACV	<b>0</b>
ACV	<b>3</b>
<b>TOTAL</b>	<b>0 - 36</b>

<b>NYBERG-MÁLAGA, 2009</b>	
<b>Riñones</b>	<b>Puntos</b>
<b>A</b>	<b>0 - 10</b>
<b>B</b>	<b>11 - 20</b>
<b>C</b>	<b>21-29</b>
<b>D</b>	<b>30-36</b>

Un Donante con **puntuación > 20 (C o D)** debe considerarse con criterio expandido.

A todos los injertos procedentes de donantes con criterios expandidos (definidos en apartado I, II ó III) se les realizará una biopsia en cuña.

Condiciones de la biopsia renal:

- Muestra adecuada: 25 ó más glomérulos y dos arterias interlobulillares y/o arcuatas.
- Muestra marginal: 10-24 glomérulos y al menos una arteria interlobulillar y/o arcuata.
- Muestra inadecuada: Menos de 10 glomérulos y/o ausencia de arterias.

Protocolo de puntuaciones:

LESIONES	% de glomérulos esclerosados o con atrofia total	Arteriopatía hialina	Elastosis Miointimal	Atrofia Tubular	Fibrosis Intersticial	TOTAL
Riñón Derecho						
Riñón Izquierdo						

### Valoración de las puntuaciones

Cada apartado se valora de 0 a 3:

1. **Glomérulos** esclerosados o con atrofia total por quistificación.

- **0:** 0-4.9% (**ausencia** de lesiones).
- **1:** 5-14.9% (glomeruloesclerosis **leve**).
- **2:** 15-24.9% (glomeruloesclerosis **moderada**).
- **3:** más del 25% (glomeruloesclerosis **intensa**).

## 2. Arteriolopatía hialina.

- **0: ausencia** de depósitos hialino PAS (+) de las paredes arteriolares.
- **1: leve** (presencia de depósito hialino PAS (+) no afectando a toda la circunferencia, en al menos 1 arteriola)
- **2: moderada** (deposición hialino PAS (+) afectando a toda la circunferencia en al menos una arteriola, sin comprometer la luz.
- **3: intensa** (deposición hialino PAS (+) afectando a toda la circunferencia en al menos una arteriola, con compromiso de la luz.

## 3. Hiperplasia miointimal. Engrosamiento fibroso de la íntima vascular.

- **0: ausencia** de lesiones.
- **1: Leve** (oclusión de la luz inferior al 25 %).
- **2: Moderada** (oclusión de la luz vascular entre 25-50%).
- **3: Intensa** (oclusión de la luz vascular superior al 50%).

## 4. Atrofia tubular.

- **0: Ausencia** de lesiones (menos del 5% de los túbulos con engrosamiento/desdoblamiento de la membrana basal y/o cilindros lumbales).
- **1: Leve** (entre el 5 y el 25% de los túbulos con engrosamiento/desdoblamiento de la membrana basal y/o cilindros lumbales).
- **2: Moderada** (entre 26% y 50% de los túbulos con engrosamiento/desdoblamiento de la membrana basal y/o cilindros lumbales).
- **3: Intensa** (más del 50% de los túbulos con engrosamiento/desdoblamiento de la membrana basal y/o cilindros lumbales).

## 5. Fibrosis intersticial:

- **0: Ausencia** de lesiones (menos del 10% del área cortical afectada).
  - **1: Leve** (entre 10%-25% del área cortical afectada).
  - **2: Moderada** (entre 26%-50% del área cortical afectada).
  - **3: Intensa** más del 50% del área cortical afectada.
- 
- Muestra renal con **histología desfavorable**: puntuación mayor de 7 y/o puntuación aislada de 3 en esclerosis glomerular, arteriopatía hialina y/ elastosis miointimal.  
Desestimar para trasplante
  - Muestra renal con **histología favorable**: puntuación menor o igual a 7:
  - Si puntuación < 5: **trasplante renal simple**.
  - En los casos de puntuación entre 5 y 7: **valorar trasplante birrenal**.

Hay que tener en cuenta que en congelación (que es como se procesan de forma urgente las biopsias) no se puede valorar la arteriopatía hialina, por lo tanto la puntuación total en general estará valorada “a la baja”.

Aunque existe una marcada diferencia en la definición de función retrasada del injerto (FRI), y también cierta controversia sobre su efecto a largo plazo, en general se acepta que ejerce un impacto negativo en la función renal y en la supervivencia del injerto. Yarlagadda y col realizaron una revisión sistemática sobre la influencia de la FRI en la supervivencia de injertos y pacientes, y concluyeron que ejercía un efecto negativo sobre la función renal, con cifras de creatinina más elevada, que además era un factor de riesgo para pérdida del injerto, y que incrementaba el riesgo de rechazo agudo, aunque no influía en la supervivencia de los pacientes a los 5 años de seguimiento.

De ahí el interés en conocer que factores influyen en su desarrollo. En los últimos años se han descrito diferentes escalas de valoración del riesgo de desarrollo de FRI, según las características de los donantes (edad, raza, antecedentes de HTA, diabetes, función renal y causa

de éxitus), y factores basales del trasplante (tiempo de isquemia fría, tiempo de isquemia de revascularización, compatibilidad HLA).

En 2010, se redefinió un nomograma para calcular el riesgo de FRI en base a factores del donante, del receptor y datos del trasplante<sup>13</sup>. De fácil acceso ([www.transplantcalculator.com](http://www.transplantcalculator.com)), tras introducir datos del donante y receptor, predice el riesgo de FRI después del trasplante, y adicionalmente de fallo del injerto. Así, un 25 a 50% de probabilidad de FRI se asoció con un 50% de incremento de fallo del injerto respecto a los que tenían un riesgo de FRI < 25%. La validación externa de este nomograma mostró una c-estadística de 0.7, lo que indica un buen grado de discriminación, y mejoría respecto al previo desarrollado en 2003 que mostró una c-estadística de 0.67.

## CRITERIOS PARA TRASPLANTE RENAL DOBLE

### Criterios del Donante

a. Donantes con criterios expandidos definidos por apartado I, II y III (páginas 174 y 175) + puntuación en la biopsia entre 5 y 7.

Resumidos:

- Donante  $\geq 60$  años
- Donante 50-60 años con al menos 2 de estas condiciones:
  - Muerte cardiovascular (IAM ó ACV isquémico).
  - Presencia de HTA y/o diabetes.
  - Creatinina sérica  $> 1.5$  mg/dl.

En todos estos donantes hay que hacer biopsia.

Si puntuación  $< 5$  → trasplante renal simple.

Si puntuación **entre 5 y 7** → trasplante renal doble.

Si puntuación  $> 7$  → desestimar para trasplante.

b. Donante **Mayor de 75 años** (con biopsia apta).

Riñones con estructura vasculares únicas y vía urinaria simple.

Tener en cuenta además:

- El aspecto macroscópico de los riñones y de las arterias del donante.
- Valorar peso y talla del donante.
- Los criterios indicados son orientativos. Siempre se debe hacer una valoración individual.

### Criterios del receptor

1. Edad  $> 60$  años.
2. Bajo riesgo quirúrgico: ausencia de patología complicada vascular y urológica.
3. Consentimiento informado.

## DONANTES INFANTILES

1. Donante < 3 años y/o peso < 15 kg será ofertado a aquellos centros donde se realice trasplante renal en bloque.
2. Donante de 3-4 años podrá ser valorado para: receptor infantil, implante en bloque o implante de un sólo injerto en adultos de muy baja superficie corporal, no hipertensos.
3. El donante > 5 años podrá ser valorado para ser implantado en adultos de baja superficie corporal, no hipertensos, primer trasplante y no hiperinmunizados.

### **Inmunosupresión en pacientes que reciban injertos de donantes infantiles**

- a. Receptores jóvenes: Inducción con **Timoglobulina**, Esteroides, Micofenolato e introducción tardía de Tacrolimus (misma pauta descrita en página 150).
- b. Receptores mayores: Inducción con **Basiliximab**, Esteroides, Micofenolato e Introducción tardía de Tacrolimus (misma pauta descrita en página 145)

### **Profilaxis con antiagregantes plaquetarios.**

- En el postoperatorio inmediato **heparina de bajo peso molecular** a dosis profiláctica.
- Para continuar con **ácido acetil salicílico** 100-150 mg/día.

## INGRESO EN LA UNIDAD DE TRASPLANTE. ANALITICAS, EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS Y ÓRDENES DE ENFERMERIA

### A su ingreso en la Unidad:

- Monitorización EKG y saturación de oxígeno.
- Extracción de sangre para **analítica urgente**: hemograma, gasometría, GUCI.
- Comprobar funcionamiento de la fístula arteriovenosa.

Administración adecuada de fluidos intravenosos para mantener al paciente euvolémico o ligeramente hipervolémico.

Comprobar la permeabilidad de la sonda en los pacientes en anuria y periódicamente en los pacientes con hematuria macroscópica si se sospecha la formación de coágulos.

Vigilancia de los drenajes y catéteres centrales.

Vigilancia estrecha de la diuresis.

### Primer día del postoperatorio:

1. Analítica de **sangre**: hemograma, GUCI y **orina** elemental e iones (**Novahis**, urgente, perfil: trasplante renal rutina).

2. Analítica de sangre:

Bioquímica completa: deberá incluir:

- Ac úrico, Calcio, Fosforo, Fosfatasa Alcalina, Colesterol, Triglicéridos, HDL y LDL colesterol. Apolipoprotina A y B ,hierro, Ferritina, Transferrina, GOT, GPT, GGT, Bilirrubina total, LDH, Magnesio.
- Hemoglobina Glicosilada.
- PTH.
- 25 Hidroxi Vitamina D.
- Virus B, Virus C y HIV.
- Serología viral: CMV, Ebstein Barr, Herpes virus.

Solicitar vía normal, por **Novahis** (perfil: primer día postrasplante renal).

3. Analítica del **drenaje**: creatinina, sodio, potasio (solicitar vía urgente por Novahis; perfil : orina bioquímica nefro y en las observaciones poner drenaje).

4. **Eco-Doppler del injerto renal**: solicitado urgente el primer día laborable tras el trasplante (en días festivos y fines de semana se solicitará cuando se sospeche la presencia de alguna complicación aguda).

**Durante el ingreso del paciente:**

- Diariamente: analítica de sangre: hemograma, GUCI y orina elemental e iones (Novahis, urgente, perfil: trasplante renal rutina).
- **Niveles de Inmunosupresores**: anticalcineurínicos: en general: lunes, miércoles y viernes. Inhibidores de mTOR: lunes y jueves (que son los días en que los hacen en el laboratorio). Ac: micofenólico, no pedir rutinariamente, solo cuando haya alguna indicación clínica.
- La analítica del **drenaje** solo se repetirá cuando por el volumen o aspecto microscópico del mismo se sospeche alguna complicación.
- **Cultivos de orina**: 2 veces por semana: lunes y jueves.
- Las **ecografías-doppler** se realizarán según la evolución del paciente. En aquellos que se mantengan en oligoanuria se repetirán cada 2-3 días.
- **Biopsia del injerto** de forma precoz cuando persista función retrasada del injerto o cuando se produzca deterioro de la función renal, sospecha de rechazo agudo, recidiva de enfermedad renal primitiva, etc.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## ANEXO B: CLASIFICACIÓN DE BANFF 2013

**Table 2:** Revised (Banff 2013) classification of antibody-mediated rejection (ABMR) in renal allografts

**Acute/active ABMR; all three features must be present for diagnosis<sup>1,2</sup>**

1. Histologic evidence of acute tissue injury, including one or more of the following:
  - Microvascular inflammation ( $g > 0^3$  and/or  $ptc > 0$ )
  - Intimal or transmural arteritis ( $v > 0^4$ )
  - Acute thrombotic microangiopathy, in the absence of any other cause
  - Acute tubular injury, in the absence of any other apparent cause
2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including at least one of the following:
  - Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d  $> 0$  by IHC on paraffin sections)
  - At least moderate microvascular inflammation ( $[g + ptc] \geq 2^5$ )
  - Increased expression of gene transcripts in the biopsy tissue indicative of endothelial injury, if thoroughly validated<sup>6</sup>
3. Serologic evidence of donor-specific antibodies (DSAs) (HLA or other antigens)

**Chronic, active ABMR; all three features must be present for diagnosis<sup>1,7</sup>**

1. Morphologic evidence of chronic tissue injury, including one or more of the following:
  - Transplant glomerulopathy (TG) ( $cg > 0^8$ ), if no evidence of chronic thrombotic microangiopathy
  - Severe peritubular capillary basement membrane multilayering (requires EM)<sup>9</sup>
  - Arterial intimal fibrosis of new onset, excluding other causes<sup>10</sup>
2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including at least one of the following:
  - Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d  $> 0$  by IHC on paraffin sections)
  - At least moderate microvascular inflammation ( $[g + ptc] \geq 2^5$ )
  - Increased expression of gene transcripts in the biopsy tissue indicative of endothelial injury, if thoroughly validated<sup>6</sup>
3. Serologic evidence of DSAs (HLA or other antigens)

**C4d staining without evidence of rejection; all three features must be present for diagnosis<sup>11</sup>**

1. Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d  $> 0$  by IHC on paraffin sections)
2.  $g = 0$ ,  $ptc = 0$ ,  $cg = 0$  (by light microscopy and by EM if available),  $v = 0$ ; no TMA, no peritubular capillary basement membrane multilayering, no acute tubular injury (in the absence of another apparent cause for this)
3. No acute cell-mediated rejection (Banff 97 type 1A or greater) or borderline changes

cg, Banff chronic glomerulopathy score; EM, electron microscopy; ENDAT, endothelial activation and injury transcript; g, Banff glomerulitis score; GBM, glomerular basement membrane; IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; ptc, peritubular capillary; TCMR, T cell-mediated rejection; v, Banff arteritis score.

<sup>1</sup>For all ABMR diagnoses, it should be specified in the report whether the lesion is C4d-positive (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections; C4d  $> 0$  by IHC on paraffin sections) or without evident C4d deposition (C4d0 or C4d1 by IF on frozen sections; C4d0 by IHC on paraffin sections).

<sup>2</sup>These lesions may be clinically acute, smoldering or subclinical. Biopsies showing two of the three features, except those with DSA and C4d without histologic abnormalities potentially related to ABMR or TCMR (C4d staining without evidence of rejection; see footnote 11, below) may be designated as "suspicious" for acute/active ABMR.

<sup>3</sup>Recurrent/*de novo* glomerulonephritis should be excluded.

<sup>4</sup>It should be noted that these arterial lesions may be indicative of ABMR, TCMR or mixed ABMR/TCMR. "v" lesions are only scored in arteries having a continuous media with two or more smooth muscle layers.

<sup>5</sup>In the presence of acute TCMR, borderline infiltrates or evidence of infection,  $ptc \geq 2$  alone is not sufficient to define moderate microvascular inflammation and g must be  $\geq 1$ .

<sup>6</sup>At present the only validated molecular marker meeting this criterion is ENDAT expression (4), and this has only been validated in a single center (University of Alberta). The use of ENDAT expression at other centers or other test(s) of gene expression within the biopsy as evidence of ABMR must first undergo independent validation as was done for ENDAT expression by Sis et al (4).

<sup>7</sup>Lesions of chronic, active ABMR can range from primarily active lesions with early TG evident only by EM (cg1a) to those with advanced TG and other chronic changes in addition to active microvascular inflammation. In the absence of evidence of current/recent antibody interaction with the endothelium (those features in the Second Section), the term active should be omitted; in such cases DSA may be present at the time of biopsy or at any previous time posttransplantation.

<sup>8</sup>Includes GBM duplication by EM only (cg1a) or GBM double contours by light microscopy.

<sup>9</sup> $\geq 7$  layers in one cortical peritubular capillary and  $\geq 5$  in two additional capillaries (17), avoiding portions cut tangentially.

<sup>10</sup>While leukocytes within the fibrotic intima favor chronic rejection, these are seen with chronic TCMR as well as chronic ABMR, and are therefore helpful only if there is no history of TCMR. An elastic stain may be helpful as absence of elastic lamellae is more typical of chronic rejection and multiple elastic lamellae are most typical of arteriosclerosis, although these findings are not definitive.

<sup>11</sup>The clinical significance of these findings may be quite different in grafts exposed to anti-blood-group antibodies (ABO-incompatible allografts), where they do not appear to be injurious to the graft (18,19) and may represent accommodation. However, with anti-HLA antibodies such lesions may progress to chronic ABMR (20) and more outcome data are needed.

**Table 3:** Consensuses reached in development of the revised Banff classification of antibody-mediated rejection (ABMR)

1. ABMR (both acute/active and chronic, active) may now be diagnosed in the absence of C4d deposition. However, in the absence of C4d, additional evidence of current or recent antibody interaction with the vascular endothelium must be present; this will help avoid overdiagnosis of ABMR. Such evidence may be morphologic, in the form of at least moderate microvascular inflammation, or molecular, as detailed in Table 2 and in the text.
2. As the criteria in Table 2 apply to both for-cause and protocol biopsies, and because similar biopsy findings may be seen in acute and smoldering lesions of ABMR, the term "acute/active" is used rather than just "acute." Further studies are needed to directly compare graft outcomes in patients diagnosed with acute/active ABMR in different clinical settings, as well as with preformed/recurrent versus *de novo* DSAs. Where deemed appropriate the pathologist may comment that the biopsy findings and clinical circumstances suggest a lesion that is acute or smoldering. Likewise, a comment may be made as to the relative activity and chronicity in cases of chronic, active ABMR.
3. Intimal arteritis (v1 and v2) should be included among lesions satisfying histologic criteria for ABMR, based on findings of Lefaucheur et al [21] that were recently published and presented at the 2013 Banff meeting. In ABMR, intimal arteritis is associated with an inferior prognosis; however, these lesions are more commonly associated with mixed ABMR/TCMR than with "pure" ABMR, and may also be seen in pure TCMR in the absence of DSAs. Intimal arteritis may be the only histologic manifestation of ABMR, although this quite uncommon (8 of 64 cases with DSA and intimal arteritis in Lefaucheur et al [21] lacked glomerulitis and peritubular capillaritis).
4. Diffuse (C4d3) and focal (C4d2) peritubular capillary C4d staining by IF and IP as well minimal (C4d1) staining by IP should be considered C4d-positive, the latter because of the lower sensitivity of staining by IP on paraffin sections (22) and evidence that C4d1 by IP is associated with microvascular inflammation (11). There was disagreement on whether to consider C4d1 on frozen sections as C4d-positive; a small majority felt it should not be although the clinical significance of C4d1 needs further investigation.

DSA, donor-specific antibody; IF, immunofluorescence; IP, immunoperoxidase; TCMR, T cell-mediated rejection.

**Table 4:** New Banff Renal Working Groups and proposed questions to be addressed

**T Cell-Mediated Rejection (TCMR) Working Group**

1. Should the ti score be included in the classification for TCMR diagnosis? Options include:
  - As a replacement for the i score
  - As part of a new category of chronic/active TCMRRecommend inclusion of ti score in the diagnosis line, possibly with a comment as to its prognostic significance, but do not change the current TCMR classification
2. Should the borderline category be modified to try and identify those lesions most specific for active TCMR? Options include:
  - By assessing edema and tubular injury (as in CCTT classification)
  - By including immunohistochemical stains (e.g. granzyme B)
  - By assessing the extent of tubulitis (as in CCTT classification)By inclusion of molecular data where available, and if so what are the most useful transcripts/transcript sets to examine?
3. Are there clinical and pathological differences in borderline infiltrates in for-cause versus protocol biopsies?

**Clinical and Laboratory Assessment of Highly Sensitized Patients Working Group**

1. Develop evidence-based recommendations for transplantation of patients with broad sensitization and high titer DSAs, for whom the only transplant option is desensitization
  - How frequently to monitor DSA?
  - Role of protocol biopsies, when (and to how far out posttransplant) should these be done?
  - Should an increase in DSA without a change in graft function prompt a biopsy, and if so should a specific minimum mean fluorescence intensity (MFI) be required?
  - What are the minimal capabilities a center needs to have to support care for these patients (including but not limited to HLA lab/pathology evaluation and turn-around time, available therapies, specialized personnel)?
2. Systematically evaluate possible differences in ABMR (clinically, serologically, pathologically and from a molecular standpoint) in this group of patients versus those of other sensitized patients and of nonsensitized patients with *de novo* DSA that may be relevant to how the patients are treated

**Working Group for Evaluation of Adjunctive Diagnostics in Renal Allograft Biopsy Interpretation**

1. Develop consensus guidelines for circumstances under which it is advisable to perform serologic testing for DSAs and molecular analysis on renal biopsy tissue, serum and/or urine collected at the time of biopsy
2. Generate consensus for applicable molecular markers and marker panels that are associated with improved diagnostic precision and/or prediction of clinical outcomes
3. Develop and conduct multicenter molecular studies for specific diagnostic circumstances (e.g. early and late ABMR without evident C4d deposition, borderline lesions, assessment of donor biopsies), including assessment of inter-center assay reproducibility

ABMR, antibody-mediated rejection; i, Banff interstitial inflammation score; ti, Banff total interstitial inflammation score.

Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff meeting report writing committee. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *American Journal of Transplantation* 2014; 14: 272–283.

## ANEXO C: LUMINEX.

**I. En cada lote de pruebas, analice un suero de control negativo (N° de catálogo OLI LS-NC o equivalente) para establecer los valores de fondo. Para completar la prueba en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml**

1. Mezcle bien las microesferas LABScreen agitando suavemente en vórtex o pipeteando hacia arriba y abajo varias veces antes del uso.
2. Incube en la oscuridad 5 µl de microesferas LABScreen con 20 µl del suero en estudio en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml durante 30 minutos a 20 – 25 °C con agitación suave.
3. Diluya tampón de lavado 10X (N° de catálogo OLI LSPWABUF) en agua destilada para obtener una solución 1X.
4. Añada 1 ml de tampón de lavado 1X a cada tubo con la solución de microesferas o suero y agite en el vórtex. Centrifugue a 9,300 g durante 2 minutos. Aspire y deseche el sobrenadante.
5. Repita el paso 4 dos veces.
6. Diluya 1 µl por prueba de anti-IgG humana conjugada con PE 100X (N° de catálogo OLI LS-AB2) con 99 µl de tampón de lavado 1X para preparar una solución 1X.
7. Añada 100 µl de anti-IgG humana conjugada con PE 1X a cada tubo. Agite en el vórtex y luego incube en la oscuridad durante 30 minutos a 20–25 °C con agitación suave.
8. Repita el paso 4 dos veces.
9. Añada 80 µl de tampón PBS 1X a cada tubo. Proceda a la adquisición y el análisis de los datos o almacene la bandeja a 2–8 °C en la oscuridad hasta 24 horas antes del análisis.

**II. Para completar la prueba en una placa de 96 pocillos**

**Precaución:** Cierre la bandeja de 96 pocillos con cuidado y completamente para evitar la contaminación de las muestras entre pocillos presionando el cierre contra cada uno de los bordes de los 96 pocillos. No vuelva a utilizar los cierres para bandejas. Utilice un cierre nuevo en cada paso que requiera la aplicación de un cierre para bandeja.

1. Mezcle bien las microesferas LABScreen agitando suavemente en vórtex o pipeteando hacia arriba y abajo varias veces antes del uso.
2. Incube en la oscuridad 5 µl de microesferas LABScreen con 20 µl del suero en estudio en cada pocillo de una placa 96 pocillos durante 30 minutos a 20 – 25 °C con agitación suave.
3. Diluya tampón de lavado 10X (Nº de catálogo LSPWABUF) en agua destilada para obtener una solución de lavado 1X.
4. Después de la incubación, añada 150 µl de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubra con cierre para bandeja (Nº de catálogo OLI SSPSEA300 o equivalente) y agite en un vórtex. Centrifugue a 1.300 g durante 5 minutos.
5. Retire el tampón de lavado de los pocillos de la placa agitando las bandejas o mediante aspiración por vacío.
6. Añada 200 µl de tampón de lavado 1X a cada pocillo de la placa. Cubra la bandeja con un cierre nuevo y agite en un vórtex. Centrifugue a 1.300 g durante 5 minutos.
7. Retire el sobrenadante de los pocillos de la placa agitando las bandejas o mediante aspiración por vacío.
8. Repita los pasos 6 y 7.
9. Diluya 1 µl por prueba de anti-IgG humana conjugada con PE 100X (Nº de catálogo OLI LS-AB2) con 99 µl de tampón de lavado 1X para preparar una solución 1X.
10. Añada 100 µl de anti-IgG humana conjugada con PE 1X a cada pocillo. Cubra con cierre para bandeja y agite en un vórtex. Incube en la oscuridad durante 30 minutos a 20–25 °C con agitación suave.
11. Centrifugue a 1.300 g durante 5 minutos.
12. Retire el sobrenadante de los pocillos de la placa agitando las bandejas o mediante aspiración por vacío.
13. Repita dos veces los pasos 6 y 7.
14. Añada 80 µl de tampón PBS 1X a cada pocillo. Cubra la bandeja con un cierre nuevo y agite en un vórtex. Proceda a la adquisición y el análisis de los datos o almacene la bandeja a 2–8 °C en la oscuridad hasta 24 horas antes del análisis.

### III. Para completar la prueba en una bandeja para filtración de 96 pocillos

1. Mezcle bien las microesferas LABScreen agitando suavemente en vórtex o pipeteando hacia arriba y abajo varias veces antes del uso.
  2. Diluya tampón de lavado 10X (Nº de catálogo OLI LSPWABUF) en agua destilada para obtener una solución 1X (aproximadamente 3,2 ml/bandeja/lavado).
  3. Cubra los pocillos de la placa que no se usarán durante la prueba con un cierre para bandeja para asegurarse de que los pocillos no utilizados permanezcan secos. Humedezca previamente los filtros de la bandeja para filtración dispensando 300 µl de tampón de lavado solo en aquellos pocillos que se utilizarán durante la prueba.
  4. Incube la placa durante 10 minutos en una plataforma de agitador de placas a velocidad baja.
  5. Aspire todos los tampones de lavado de los pocillos utilizando una válvula de vacío Millipore. No supere una presión de vacío de 100 mm Hg.
  6. Apada 5 µl de microesferas LABScreen con 20 µl del suero en estudio por pocillo de prueba.
- Nota:** Durante los pasos de dispensación de las microesferas y las muestras, presione la punta de la pipeta delicadamente contra la placa de filtración para evitar que los filtros se rompan.
7. Incube la placa en la oscuridad durante 30 minutos a 20–25 °C con agitación suave.
  8. Añada 175 µl de tampón de lavado a cada pocillo.
  9. Encienda la bomba de vacío. Presione firmemente la placa sobre la válvula de vacío. Asegúrese de que el líquido se drene lentamente. Asegúrese de que el líquido se haya eliminado de los pocillos antes de continuar.
- Precaución:** No supere una presión de vacío de 100 mm Hg. Si el vacío se produce rápidamente, se perderán microesferas, debido a que quedan atrapadas en los poros del papel del filtro.
10. Repita cuatro veces los pasos 8 y 9, indicados más arriba.
  11. Añada 100 µl de anti-IgG humana conjugada con PE 1X a cada pocillo.
  12. Incube en la oscuridad durante 30 minutos a 20–25 °C con agitación suave.
  13. Repita cinco veces los pasos 8 y 9.
  14. Añada 80 µl de tampón PBS 1X a cada pocillo.

15. Lea la muestra con el analizador de flujo LABScan 100™ y ajuste la altura de la sonda si es necesario.

#### IV. Análisis combinados

Se puede utilizar cualquiera de los protocolos anteriores en una prueba combinada de ciertos productos LABScreen.

- Para conocer combinaciones aceptables de lotes de LS12PRA consulte [www.onelambda.com](http://www.onelambda.com) (Antibody Detection (Detección de anticuerpos)>LABScreen>LABScreen PRA/ Product Documentation (Documentación de productos): LABScreen Bead Combo – Multiple IDs DataSheet (Combinación de microesferas LABScreen – Hoja de datos de ID múltiple)).
- No combine paneles LABScreen de antígeno aislado Clase I combinado y Clase II (dado que se superpondrían los ID de las microesferas).

1. Mezcle volúmenes iguales de microesferas. Luego dispense la cantidad agregada apropiada (10 o 15 µl) de mezcla de microesferas por prueba.

2. Las combinaciones de microesferas y cantidades a dispensar se indican en la tabla siguiente.

Identificador de catálogo	Volumen de microesferas por prueba	Microesferas de control (NC/PC)	Suero de análisis por prueba
LS12PRA (microesferas CI y CII)	5 µl + 5 µl	Incluidas	40 µl
LS1A04	5 µl	Incluidas	20 µl

## **ANEXO D: TÉCNICA DEL C1q**

- 1.- Añadir 40µl de suero a un tubo de 1.5 ml.
- 2.- Calentar a 56°C durante 30 minutos.
- 3.- Preparar durante 30 minutos de la incubación las microesferas de los análisis (Se prepara una muestra más de las que vamos a hacer).

En un tubo de 1.5 ml añadimos:

3a.- 5µl de microesferas de prueba (SAI o SAII) por muestra.

3b.-0.5µl de microesferas de control positivo C1q por muestra.

3c.- Se mezcla todo con el vórtex y se mantiene en hielo hasta su uso.

- 4.- También se prepara durante la incubación una solución de C1q para análisis (Se prepara una muestra más de las que vamos a hacer).

En un tubo de 1.5 ml añadimos:

4a.-4µl de hepbuf (tampón hepes) por muestra.

4b.-1µl de C1q de complemento humano (PEPC1Q) por muestra.

4c. Se mezcla todo con el vórtex y se mantiene en hielo hasta su uso.

- 5.- Centrifugar a 10.500 rpm durante 10 minutos (si fuésemos a tardar en hacer el análisis transferir 30µl de suero (sobrenadante) a otro tubo de 1.5 ml y mantener en hielo).
- 6.- Agitar antes de su uso. Y del suero si se ha decantado a otro tubo.
- 7.- Añadir 5µl del complemento humano diluido (PEPC1Q) a cada pocillo.
- 8.- Añadir 5 µl de las microesferas de análisis premezcladas.
- 9.- Añadir 5 µl de suero a los pocillos designados de la planca de 96 pocillos.
- 10.- Cubrir, agita con la mano en la mesa e incubar 20 minutos en oscuridad.
- 11.- Añadir 5 µl de anti-C1q conjugada con PE (PEPAC1Q) a cada pocillo, agitar con la mano en la mesa. Y otros 20 minutos de oscuridad.
- 12.- Añadir 80µl de PBS a cada pocillo.

13.- Centrifugar a 2.400 rpm durante 4 minutos.

14.- Extraer sobrenadante con un flick.

15.- Añadir 80µl de PBS, vórtex y se lee.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

1. Lawrence H. **Advances in immunology: a meeting in honor of Sir Peter Medawar.** *Cell Immunol.* 1981;62(2):233–310.
2. Solez K, Benediktsson H, Burdick JF et al. **The International Society of Nephrology Commission of acute renal failure. Banff international classification of renal allograft pathology.** *Lab Invest.* 1992;66:103A.
3. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, et al. **International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology.** *Kidney Int.* 1993;44(2):411–22.
4. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, et al. **Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells.** *Lancet (London, England).* 1966;2(7465):662–5.
5. Patel R, Terasaki PI. **Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation.** *N Engl J Med.* 1969;280(14):735–9.
6. Janeway CA. **How the immune system works to protect the host from infection: A personal view.** *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(13):7461–7468.
7. Delves PJ, Roitt IM. **The immune system. First of two parts.** *N Engl J Med.* 2000;343(1):37–49..
8. Delves PJ, Roitt IM. **The immune system. Second of two parts.** *N Engl J Med.* 2000;343(2):108–17.
9. Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, et al. **Early and late inflammatory changes occurring in rat renal isografts from brain dead donors.** *Transplant Proc.* 33(1-2):867–8.
10. Jang HR, Rabb H. **The innate immune response in ischemic acute kidney injury.** *Clin Immunol.* 2009;130(1):41–50.
11. van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, et al. **Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor**

- liver in the rat.** *Ann Surg.* 2000;232(6):804–13.
12. Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. **The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney.** *J Mol Med (Berl).* 2009;87(9):859–64.
  13. Kim BS, Lim SW, Li C, et al. **Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys.** *Transplantation.* 2005;79(10):1370–7.
  14. Bianchi ME. **DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger.** *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):1–5.
  15. Wolfs TGAM, Buurman WA, van Schadewijk A, et al. **In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation.** *J Immunol.* 2002;168(3):1286–93.
  16. Wu H, Chen G, Wyburn KR, et al. **TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury.** *J Clin Invest.* 2007;117(10):2847–59.
  17. Pulskens WP, Teske GJ, Butter LM, et al. **Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury.** *PLoS One.* 2008;3(10):e3596.
  18. Kaczorowski DJ, Nakao A, Mollen KP, et al. **Toll-like receptor 4 mediates the early inflammatory response after cold ischemia/reperfusion.** *Transplantation.* 2007;84(10):1279–87.
  19. González Molina M, Alonso A. **Biología de la inmunosupresión del trasplante de órganos.** Editado po.; 2005.
  20. Abbas AK LA. *Cellular and Molecular Immunology.* Fifth Edit. (Saunders, ed.); 2003.
  21. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. **Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure.** *N Engl J Med.* 2015;372(12):1138–49.
  22. Gorer PA. **The antigenic basis of tumour transplantation.** *J Pathol Bacteriol.* 1938;47:231–252.
  23. GORER PA. **The antibody response to skin homografts in mice.** *Ann N Y Acad Sci.* 1955;59(3):365–73.

24. GORER PA. **Some recent work on tumor immunity.** *Adv Cancer Res.* 1956;4:149–86.
25. Morris PJ, Williams GM, Hume DM, et al. **Serotyping for homotransplantation. XII. Occurrence of cytotoxic antibodies following kidney transplantation in man.** *Transplantation.* 1968;6(3):392–9.
26. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, et al. **Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss.** *Kidney Int.* 1993;43(6):1333–8..
27. Terasaki PI. **Humoral theory of transplantation.** *Am J Transplant.* 2003;3(6):665–73.
28. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. **Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation.** *Transplantation.* 2000;69(3):319–26.
29. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. **Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups.** *Am J Transplant.* 2010;10(3):464–471.
30. Mengel M, Sis B, Haas M, et al. **Banff 2011 Meeting Report: New Concepts in Antibody-Mediated Rejection.** *Am J Transplant.* 2012;12(3):563–570.
31. Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. **Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions.** *Am J Transplant.* 2014;14(2):272–83.
32. Farkash EA, Colvin RB. **Diagnostic challenges in chronic antibody-mediated rejection.** *Nat Rev Nephrol.* 2012;8(5):255–7.
33. Djamali A., Kaufman DB, Ellis TM, et al. **Diagnosis and Management of Antibody-Mediated Rejection: Current Status and Novel Approaches.** *Am J Transplant.* 2014;14(2):255–271.
34. Cascalho M, Platt JL. **Basic mechanisms of humoral rejection.** *Pediatr Transplant.* 2005;9(1):9–16.
35. Gebel HM, Bray RA. **The evolution and clinical impact of human leukocyte antigen technology.** *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010;19(6):598–602.
36. Lynch RJ, Silva IA, Chen BJ, et al. **Cryptic B cell response to renal transplantation.** *Am J Transplant.* 2013;13(7):1713–23.

37. Lucchiari N, Panajotopoulos N, Xu C, et al. **Antibodies eluted from acutely rejected renal allografts bind to and activate human endothelial cells.** *Hum Immunol.* 2000;61(5):518–527.
38. Lúcia M, Luque S, Crespo E, et al. **Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation.** *Kidney Int.* 2015;88(4):874–87.
39. Clatworthy MR. **B Cell Responses to Allograft-More Common Than We Thought?** *Am J Transplant.* 2013;13(7):1629–1630.
40. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, et al. **Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining.** *Am J Transplant.* 2009;9(10):2312–23.
41. Sis B, Halloran PF. **Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection.** *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(1):42–8.
42. Lund FE, Randall TD. **Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity.** *Nat Rev Immunol.* 2010;10(4):236–47.
43. Clatworthy MR. **Targeting B Cells and Antibody in Transplantation.** *Am J Transplant.* 2011;11(7):1359–1367.
44. Ng Y-H, Oberbarnscheidt MH, Chandramoorthy HCK, et al. **B cells help alloreactive T cells differentiate into memory T cells.** *Am J Transplant.* 2010;10(9):1970–80.
45. Vinuesa CG, Linterman MA, Goodnow CC, et al. **T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection.** *Immunol Rev.* 2010;237(1):72–89.
46. Thauinat O, Field A-C, Dai J, et al. **Lymphoid neogenesis in chronic rejection: Evidence for a local humoral alloimmune response.** *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(41):14723–14728.
47. Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, et al. **Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates.** *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(3):603–12.

48. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, et al. **Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells.** *Blood.* 2011;117(2):530–41.
49. Sumitran-Holgersson S. **Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation.** *Curr Opin Immunol.* 2008;20(5):607–613.
50. Ishizaka T, Ishizaka K, Salmon S, et al. **Biologic activities of aggregated gamma-globulin. 8. Aggregated immunoglobulins of different classes.** *J Immunol.* 1967;99(1):82–91.
51. Duncan AR, Winter G. **The binding site for C1q on IgG.** *Nature.* 1988;332(6166):738–740.
52. Tao MH, Smith RI, Morrison SL. **Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation.** *J Exp Med.* 1993;178(August):661–667.
53. Roopenian DC, Akilesh S. **FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age.** *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):715–25.
54. Vaccaro C, Zhou J, Ober RJ, et al. **Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels.** *Nat Biotechnol.* 2005;23(10):1283–8.
55. Pavlov V, Raedler H, Yuan S, et al. **Donor deficiency of decay-accelerating factor accelerates murine T cell-mediated cardiac allograft rejection.** *J Immunol.* 2008;181(7):4580–9.
56. Peng Q, Li K, Anderson K, et al. **Local production and activation of complement up-regulates the allostimulatory function of dendritic cells through C3a-C3aR interaction.** *Blood.* 2007;111(4):2452–2461.
57. Strainic MG, Liu J, Huang D, et al. **Locally Produced Complement Fragments C5a and C3a Provide Both Costimulatory and Survival Signals to Naive CD4+ T Cells.** *Immunity.* 2008;28(3):425–435.
58. Kwan W, van der Touw W, Paz-Artal E, et al. **Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells.** *J Exp Med.*

- 2013;210(2):257–68.
59. Li K, Patel H, Farrar CA, et al. **Complement activation regulates the capacity of proximal tubular epithelial cell to stimulate alloreactive T cell response.** *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(9):2414–22.
  60. Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, et al. **C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity.** *Science.* 1996;271(5247):348–50.
  61. Brentjens JR, Andres G. **Interaction of antibodies with renal cell surface antigens.** *Kidney Int.* 1989;35(4):954–68.
  62. Feucht HE, Opelz G. **The humoral immune response towards HLA class II determinants in renal transplantation.** *Kidney Int.* 1996;50(5):1464–1475.
  63. McNearney T, Ballard L, Seya T, et al. **Membrane cofactor protein of complement is present on human fibroblast, epithelial, and endothelial cells.** *J Clin Invest.* 1989;84(2):538–45.
  64. Cosio FG, Sedmak DD, Mahan JD, et al. **Localization of decay accelerating factor in normal and diseased kidneys.** *Kidney Int.* 1989;36(1):100–7.
  65. Hamilton KK, Ji Z, Rollins S, et al. **Regulatory control of the terminal complement proteins at the surface of human endothelial cells: neutralization of a C5b-9 inhibitor by antibody to CD59.** *Blood.* 1990;76(12):2572–7.
  66. González-Molina M, Burgos D, Cabello M, et al. **Impact of immunosuppression treatment on the improvement in graft survival after deceased donor renal transplantation: a long-term cohort study.** *Nefrologia.* 2014;34(5):570–8.
  67. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche H-U. **Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal.** *Am J Transplant.* 2011;11(3):450–62.
  68. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, et al. **Understanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody-Mediated Rejection and Nonadherence.** *Am J Transplant.* 2012;12(2):388–399.
  69. Arias M, Rush DN, Wiebe C, et al. **Antibody-Mediated Rejection.** *Transplantation.* 2014;98(3):S3–S21.

70. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, et al. **Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection.** *Am J Transplant.* 2003;3(6):708–14.
71. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, et al. **Incidence and Impact of De Novo Donor-Specific Alloantibody in Primary Renal Allografts.** *Transplant J.* 2013;95(3):410–417.
72. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. **Evolution and Clinical Pathologic Correlations of De Novo Donor-Specific HLA Antibody Post Kidney Transplant.** *Am J Transplant.* 2012;12(5):1157–1167.
73. Loupy A, Vernerey D, Tinel C, et al. **Subclinical Rejection Phenotypes at 1 Year Post-Transplant and Outcome of Kidney Allografts.** *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(7):1721–31.
74. Orandi BJ, Chow EHK, Hsu A, et al. **Quantifying renal allograft loss following early antibody-mediated rejection.** *Am J Transplant.* 2015;15(2):489–98.
75. Banasik M, Boratyńska M, Nowakowska B, et al. **Variability in Donor-Specific Alloantibody Production After Transplantation.** *Transplant Proc.* 2007;39(9):2715–2717.
76. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, et al. **Anti-Human Leukocyte Antigen and Donor-Specific Antibodies Detected by Luminex Posttransplant Serve as Biomarkers for Chronic Rejection of Renal Allografts.** *Transplantation.* 2009;87(10):1505–1513.
77. Cooper JE, Gralla J, Adebisi O, et al. **Donor specific antibodies before and after kidney transplant: the University of Colorado Experience.** *Clin Transpl.* 2013:407–12.
78. Malheiro J, Martins LS, Tafulo S, et al. **Impact of de novo donor-specific anti-HLA antibodies on grafts outcomes in simultaneous pancreas-kidney transplantation.** *Transpl Int.* 2015.
79. Heilman RL, Nijim A, Desmarteau YM, et al. **De novo donor-specific human**

- leukocyte antigen antibodies early after kidney transplantation.** *Transplantation*. 2014;98(12):1310–5.
80. Liefeldt L, Brakemeier S, Glander P, et al. **Donor-Specific HLA Antibodies in a Cohort Comparing Everolimus With Cyclosporine After Kidney Transplantation.** *Am J Transplant*. 2012;12(5):1192–1198.
81. Ginevri F, Nocera A, Comoli P, et al. **Posttransplant de novo donor-specific hla antibodies identify pediatric kidney recipients at risk for late antibody-mediated rejection.** *Am J Transplant*. 2012;12(12):3355–62.
82. Lachmann N, Terasaki PI, Schönemann C. **Donor-specific HLA antibodies in chronic renal allograft rejection: a prospective trial with a four-year follow-up.** *Clin Transpl*. 2006:171–99.
83. Piazza A, Poggi E, Ozzella G, et al. **Post-transplant donor-specific antibody production and graft outcome in kidney transplantation: results of sixteen-year monitoring by flow cytometry.** *Clin Transpl*. 2006:323–36.
84. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, et al. **Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation.** *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(9):2804–12.
85. Moreso F, Carrera M, Goma M, et al. **Early subclinical rejection as a risk factor for late chronic humoral rejection.** *Transplantation*. 2012;93(1):41–6.
86. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, et al. **Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study.** *Lancet (London, England)*. 2013;381(9863):313–9.
87. Sautanet, B. Blanco, G. Buchler M et al. **One year results of the effects of rituximab on acute humoral rejection in renal Transplantation: RITUX ERAH, a multicenter randomized placebo controlled trial.** *Am J Transplantation*2. 2013;13:112.
88. Freitas MCS, Rebellato LM, Ozawa M, et al. **The Role of Immunoglobulin-G Subclasses and C1q in De Novo HLA-DQ Donor-Specific Antibody Kidney Transplantation Outcomes.** *Transplant J*. 2013;95(9):1113–1119.

89. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentlejewski C, et al. **IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury.** *J Am Soc Nephrol.* 2015;1–12.
90. Jurcevic S, Ainsworth ME, Pomerance a, et al. **Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation.** *Transplantation.* 2001;71(7):886–892.
91. Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, et al. **Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection.** *N Engl J Med.* 2005;352(6):558–69.
92. Platt JL, Vercellotti GM, Lindman BJ, et al. **Release of heparan sulfate from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hyperacute rejection.** *J Exp Med.* 1990;171(4):1363–8.
93. Saadi S, Platt JL. **Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement.** *J Exp Med.* 1995;181(1):21–31.
94. Colvin RB. **Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis.** *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(4):1046–56.
95. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, et al. **Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics.** *Transplantation.* 2001;71(5):652–8.
96. Nankivell BJ, Alexander SI. **Rejection of the kidney allograft.** *N Engl J Med.* 2010;363(15):1451–62.
97. Zhang X, Reed EF. **Effect of Antibodies on Endothelium.** *Am J Transplant.* 2009;9(11):2459–2465.
98. Jindra PT, Jin Y-P, Rozengurt E, et al. **HLA class I antibody-mediated endothelial cell proliferation via the mTOR pathway.** *J Immunol.* 2008;180(4):2357–2366.
99. Lepin EJ, Zhang Q, Zhang X, et al. **Phosphorylated S6 Ribosomal Protein: A Novel Biomarker of Antibody-Mediated Rejection in Heart Allografts.** *Am J Transplant.* 2006;6(7):1560–1571.
100. Jindra PT, Zhang X, Mulder A, et al. **Anti-HLA Antibodies Can Induce Endothelial**

- Cell Survival or Proliferation Depending on their Concentration.** *Transplantation*. 2006;82(Supplement 1):S33–S35.
101. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. **Adaptive immune features of natural killer cells.** *Nature*. 2009;457(7229):557–561.
  102. Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, et al. **A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody.** *Am J Transplant*. 2012;12(2):313–21.
  103. Li XC, Baldwin WM. **NK cells: new partners in antibody-triggered chronic rejection.** *Am J Transplant*. 2012;12(2):275–6.
  104. Crespo M, Yelamos J, Redondo D, et al. **Circulating NK-Cell Subsets in Renal Allograft Recipients With Anti-HLA Donor-Specific Antibodies.** *Am J Transplant*. 2015;15(3):806–814.
  105. Yamakuchi M, Kirkiles-Smith NC, Ferlito M, et al. **Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(4):1301–1306.
  106. Hanf W, Bonder CS, Coates PTH. **Transplant Glomerulopathy: The Interaction of HLA Antibodies and Endothelium.** *J Immunol Res*. 2014;2014:549315.
  107. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, et al. **Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome.** *Transplantation*. 2003;75(7):1034–40.
  108. Issa N, Cosio FG, Gloor JM, et al. **Transplant Glomerulopathy: Risk and Prognosis Related to Anti-Human Leukocyte Antigen Class II Antibody Levels.** *Transplantation*. 2008;86(5):681–685.
  109. Thauvat O, Hanf W, Dubois V, et al. **Chronic humoral rejection mediated by anti-HLA-DP alloantibodies: insights into the role of epitope sharing in donor-specific and non-donor specific alloantibodies generation.** *Transpl Immunol*. 2009;20(4):209–11.
  110. Bentall A, Cornell LD, Gloor JM, et al. **Five-Year Outcomes in Living Donor Kidney**

- Transplants With a Positive Crossmatch.** *Am J Transplant.* 2013;13(1):76–85.
111. Baid-Agrawal S, Farris AB, Pascual M, et al. **Overlapping pathways to transplant glomerulopathy: chronic humoral rejection, hepatitis C infection, and thrombotic microangiopathy.** *Kidney Int.* 2011;80(8):879–885.
112. Sis B, Campbell PM, Mueller T, et al. **Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause.** *Am J Transplant.* 2007;7(7):1743–52.
113. Regele H, Böhmig GA, Habicht A, et al. **Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection.** *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(9):2371–80.
114. Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, et al. **Transplant Glomerulopathy: Subclinical Incidence and Association with Alloantibody.** *Am J Transplant.* 2007;7(9):2124–2132.
115. Regele H, Exner M, Watschinger B, et al. **Endothelial C4d deposition is associated with inferior kidney allograft outcome independently of cellular rejection.** *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(10):2058–66.
116. Terasaki PI. **Deduction of the fraction of immunologic and non-immunologic failure in cadáver donor transplants.** In: Cecke JM TP, ed. *In Clinical Transplants.;* 2003:449–452.
117. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, et al. **Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor.** *J Clin Invest.* 1999;103(7):945–952.
118. Muro M, López-Hoyos M, Balas A, et al. **Estandarización de informes clínicos de sensibilización por anticuerpos anti-antígeno leucocitario humano.** *Inmunología.* 2013;32(2):75–83.
119. Sapir-Pichhadze R, Wang Y, Famure O, et al. **Time-dependent variability in tacrolimus trough blood levels is a risk factor for late kidney transplant failure.** *Kidney Int.* 2014;85(6):1404–11. doi:10.1038/ki.2013.465.

120. Wu M-J, Cheng C-Y, Chen C-H, et al. **Lower variability of tacrolimus trough concentration after conversion from prograf to advagraf in stable kidney transplant recipients.** *Transplantation.* 2011;92(6):648–52.
121. Ekberg H, Mamelok RD, Pearson TC, et al. **The challenge of achieving target drug concentrations in clinical trials: experience from the Symphony study.** *Transplantation.* 2009;87(9):1360–6.
122. Gondos A, Döhler B, Brenner H, et al. **Kidney graft survival in Europe and the United States: strikingly different long-term outcomes.** *Transplantation.* 2013;95(2):267–74.
123. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, et al. **High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors.** *N Engl J Med.* 1995;333(6):333–336.
124. Andreoni K A., Brayman KL, Guidinger MK, et al. **Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1996-2005.** *Am J Transplant.* 2007;7(SUPPL. 1):1359–1375.
125. McCullough KP, Keith DS, Meyer KH, et al. **Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1998-2007: access for patients with diabetes and end-stage renal disease.** *Am J Transplant.* 2009;9(4 Pt 2):894–906.
126. Montiel-Casado MC, Pérez-Daga J A., Aranda-Narváez JM, et al. **Pancreas graft survival in simultaneous pancreas-kidney versus pancreas-after-kidney and pancreas alone transplantations: A single institution experience.** *Transplant Proc.* 2013;45(10):3609–3611.
127. Reddy KS, Davies D, Ormond D, et al. **Impact of acute rejection episodes on long-term graft survival following simultaneous kidney-pancreas transplantation.** *Am J Transpl.* 2003;3:439–444.
128. Cardinal H, Hébert M-J, Rahme E, et al. **Modifiable factors predicting patient survival in elderly kidney transplant recipients.** *Kidney Int.* 2005;68(1):345–351.
129. Ojo AO, Morales JM, Gonzalez-Molina M, et al. **Comparison of the long-term outcomes of kidney transplantation: USA versus Spain.** *Nephrol Dial Transplant.*

- 2012;28(1):213–220.
130. Taber DJ, Douglass K, Srinivas T, et al. **Significant racial differences in the key factors associated with early graft loss in kidney transplant recipients.** *Am J Nephrol.* 2014;40(1):19–28.
  131. González-Molina M, Ruiz-Esteban P, Caballero A, et al. **Immune response and histology of humoral rejection in kidney transplantation.** *Nefrologia.* 2015[Under Rev].
  132. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, et al. **Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation.** *Transplant J.* 2013;95(1):19–47.
  133. DeVos JM, Gaber a O, Knight RJ, et al. **Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation.** *Kidney Int.* 2012;82(5):598–604.
  134. *Organ Procurement and Transplantation Net work: Scientific registry of transplant recipients.* Available at: Available at:<http://optn.transplant.hrsa.gov/data/>. Accessed May, 2010.
  135. *Rapport d activiteé de prelevement et de greffe.* Agence de la Biomedicine. Available at: Available at: [http://www.agence-biomedicine.fr/uploads/document/RA\\_1\\_2-entier .pdf](http://www.agence-biomedicine.fr/uploads/document/RA_1_2-entier .pdf). Accessed May 2010.
  136. Lefaucheur C, Loupy a., Hill GS, et al. **Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation.** *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(8):1398–1406.
  137. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. **Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk.** *Am J Transplant.* 2003;3(12):1488–500.
  138. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, et al. **Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival.** *N Engl J Med.* 2013;369(13):1215–1226.
  139. Morales JM, Martinez-Flores JA, Serrano M, et al. **Association of early kidney**

- allograft failure with preformed IgA antibodies to  $\beta$ 2-glycoprotein I.** *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(3):735–45.
140. Chen G, Sequeira F, Tyan DBB. **Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads.** *Hum Immunol.* 2011;72(10):849–858.
141. Woof JM, Burton DR. **Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures.** *Nat Rev Immunol.* 2004;4(2):89–99.
142. Kushihata F, Watanabe J, Mulder A, et al. **Human leukocyte antigen antibodies and human complement activation: role of IgG subclass, specificity, and cytotoxic potential.** *Transplantation.* 2004;78(7):995–1001.
143. Arnold M-L, Ntokou I-S, Doxiadis IIN, et al. **Donor-specific HLA antibodies: evaluating the risk for graft loss in renal transplant recipients with isotype switch from complement fixing IgG1/IgG3 to noncomplement fixing IgG2/IgG4 anti-HLA alloantibodies.** *Transpl Int.* 2014;27(3):253–261.
144. Eng HS, Bennett G, Chang SH, et al. **Donor human leukocyte antigen specific antibodies predict development and define prognosis in transplant glomerulopathy.** *Hum Immunol.* 2011;72(5):386–91.
145. Sijpkens YW, Joosten SA, Wong M-C, et al. **Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy.** *Kidney Int.* 2004;65(6):2409–18.
146. Suri DL, Tomlanovich SJ, Olson JL, et al. **Transplant glomerulopathy as a cause of late graft loss.** *Am J Kidney Dis.* 2000;35(4):674–80.
147. Maryniak RK, First MR, Weiss MA. **Transplant glomerulopathy: evolution of morphologically distinct changes.** *Kidney Int.* 1985;27(5):799–806.
148. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, et al. **Impact of IgM and IgG3 Anti-HLA Alloantibodies in Primary Renal Allograft Recipients.** *Transplantation.* 2014;97(5):494–501.
149. Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KMK, et al. **Assessing Antibody Strength:**

- Comparison of MFI, C1q, and Titer Information.** *Am J Transplant.* 2015;15(9):2421–30.
150. Tyan DB. **New approaches for detecting complement-fixing antibodies.** *Curr Opin Organ Transplant.* 2012;17(4):409–415.
151. Terasaki PI, Cai J. **Human Leukocyte Antigen Antibodies and Chronic Rejection: From Association to Causation.** *Transplantation.* 2008;86(3):377–383.
152. Stastny P, Ring S, Lu C, et al. **Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients.** *Hum Immunol.* 2009;70(8):600–604.
153. Morath C, Opelz G, Zeier M, et al. **Clinical relevance of HLA antibody monitoring after kidney transplantation.** *J Immunol Res.* 2014;2014:845040.
154. Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, et al. **Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival.** *J Am Soc Nephrol.* 2015..
155. Muro M, Balas A, Torío A et al. **Report of the Iberian Workshop of Histocompatibility 2012. Component of standardization of anti-HLA antibodies results by solid phase assay.** *Inmunologia.* 2012;31:135–141.
156. Singh N, Djamali A, Lorentzen D, et al. **Pretransplant Donor-Specific Antibodies Detected by Single-Antigen Bead Flow Cytometry Are Associated With Inferior Kidney Transplant Outcomes.** *Transplantation.* 2010;90(10):1079–1084.
157. Mizutani K, Terasaki P, Hamdani E, et al. **The importance of anti-HLA-specific antibody strength in monitoring kidney transplant patients.** *Am J Transplant.* 2007;7(4):1027–31.
158. Vaidya S. **Clinical importance of anti-human leukocyte antigen-specific antibody concentration in performing calculated panel reactive antibody and virtual crossmatches.** *Transplantation.* 2008;85(7):1046–50.
159. Otten HG, Verhaar MC, Borst HPE, et al. **Pretransplant Donor-Specific HLA Class-I and -II Antibodies Are Associated With an Increased Risk for Kidney Graft**

- Failure.** *Am J Transplant.* 2012;12(6):1618–1623.
160. Crespo M, Torio A, Mas V, et al. **Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: Does C1q-fixation matter?** *Transpl Immunol.* 2013;29(1-4):28–33.
161. Khovanova N, Daga S, Shaikhina T, et al. **Subclass analysis of donor HLA-specific IgG in antibody-incompatible renal transplantation reveals a significant association of IgG<sub>4</sub> with rejection and graft failure.** *Transpl Int.* 2015:n/a–n/a.
162. Torio A, Auyanet I, Montes-Ares O, et al. **Effect of CYP3A51/3 polymorphism on blood pressure in renal transplant recipients.** *Transplant Proc.* 2012;44(9):2596–8.
163. Kasiske BL, Vazquez MA, Harmon WE, et al. **Recommendations for the outpatient surveillance of renal transplant recipients. American Society of Transplantation.** *J Am Soc Nephrol.* 2000;11 Suppl 1:S1–86.
164. Kasiske BL, Cohen D, Lucey MR, et al. **Payment for immunosuppression after organ transplantation. American Society of Transplantation.** *JAMA.* 2000;283(18):2445–50.
165. Koo EH, Jang HR, Lee JE, et al. **The impact of early and late acute rejection on graft survival in renal transplantation.** *Kidney Res Clin Pract.* 2015;34(3):160–4.
166. Wu K, Budde K, Schmidt D, et al. **The inferior impact of antibody-mediated rejection on the clinical outcome of kidney allografts which develop de novo thrombotic microangiopathy.** *Clin Transplant.* 2015.