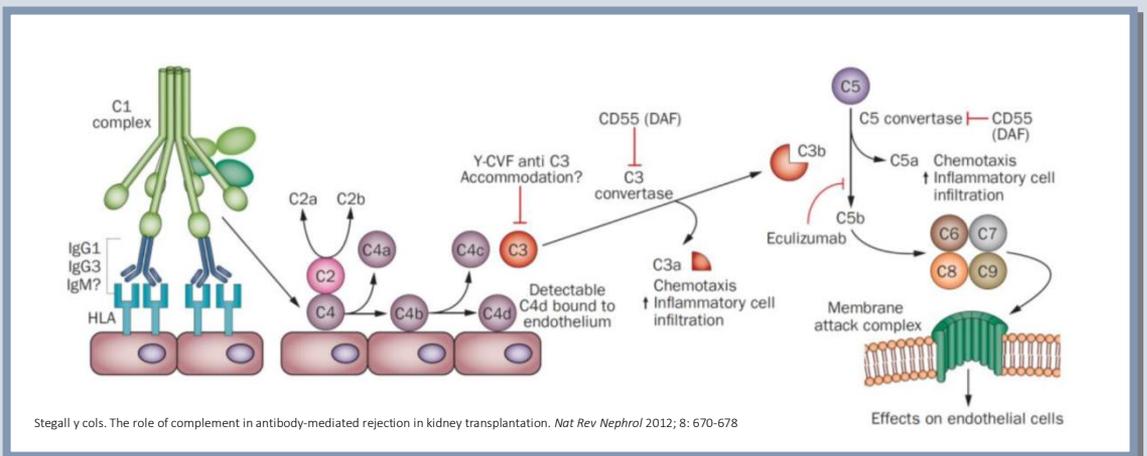


IMPACTO DE LA CAPACIDAD DE FIJACIÓN DE C1Q DE LOS ANTICUERPOS PREFORMADOS ESPECÍFICOS DE DONANTE SOBRE LA EVOLUCIÓN DEL ALOINJERTO RENAL

IMPACT OF PREFORMED C1Q-BINDING ABILITY DONOR-SPECIFIC ANTIBODIES ON KIDNEY ALLOGRAFT OUTCOME



Juan Eduardo Molina Alcaide

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Programa de Doctorado en Biomedicina
Universidad de Córdoba

Directores: Prof. Dr. Rafael Solana Lara · Dra. Corona Alonso Díaz

TITULO: *Impacto de la capacidad de fijación C1Q de los anticuerpos preformados específicos de donante sobre la evolución del aloinjerto renal*

AUTOR: *Juan Eduardo Molina Alcaide*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>







UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Programa de Doctorado en Biomedicina

**Impacto de la capacidad de fijación de C1q de los anticuerpos
preformados específicos de donante sobre la evolución del aloinjerto
renal**

*Impact of preformed C1q-binding ability donor-specific antibodies on
kidney allograft outcome*

Juan Eduardo Molina Alcaide

Trabajo de Tesis Doctoral dirigido por

Prof. Dr. Rafael Solana Lara

Dra. Corona Alonso Díaz

Córdoba, 12 Marzo 2018



TÍTULO DE LA TESIS:

Impact of preformed C1q-binding ability donor-specific antibodies on kidney allograft outcome

DOCTORANDO/A:

D. Juan Eduardo Molina Alcaide inició la realización de su Tesis Doctoral en el año 2014 en el Programa de Doctorado en Biomedicina. La fase experimental de dicha tesis ha sido realizada en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y durante este tiempo ha ampliado el conocimiento científico y tecnológico, que ya había adquirido durante su periodo formativo como Especialista en Inmunología en la UGC de Inmunología del citado hospital (2011-2015). Particularmente, dicho conocimiento se ha focalizado en el área de la histocompatibilidad e inmunología del trasplante, y más concretamente, sobre el impacto que ejercen los anticuerpos anti-HLA sobre el aloinjerto renal trasplantado. El doctorando ha concluido satisfactoriamente el Programa de Formación propuesto y aceptado por la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biomedicina, habiendo sido aceptadas las Memorias de Seguimiento de las distintas anualidades. Asimismo, el doctorando ha aprendido a diseñar y desarrollar la metodología de trabajo de un proyecto de investigación traslacional y transmitir el resultado de su investigación a la comunidad científica. Los resultados obtenidos del trabajo de tesis doctoral han sido publicados en un artículo original titulado *Impact of preformed donor-specific anti-human leukocyte antigen antibody C1q-binding ability on kidney allograft outcome* por la revista *Frontiers in Immunology* (Q1) y han sido presentados en diferentes congresos de ámbito nacional e internacional.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 12 de Marzo de 2018

Firma del/de los director/es

Fdo.: RAFAEL SOLANO

Fdo.: M. CORONA ALONSO

“Las ideas no se muestran fecundas con quien las sugiere o las aplica por primera vez, sino con los tenaces que las sienten con vehemencia y en cuya virtualidad ponen toda su fe y todo su amor. Bajo este aspecto, bien puede afirmarse que las conquistas científicas son creaciones de la voluntad y ofrendas de la pasión”

Santiago Ramón y Cajal

Petilla de Aragón, España, 1852 - Madrid, 1934

Premio Nobel de Medicina en 1906

Agradecimientos

Han pasado algo más de 3 años y aun no puedo creer que esto llegue a su fin. Ha sido un duro e inolvidable camino cargado de emociones contradictorias. Suele decirse que con paciencia todo llega y cuando al final ves que tu trabajo es reconocido, nada es comparable a esa sensación indescriptible que te invade, es justo ahí cuando te das cuenta de que, sin duda, todo el esfuerzo empleado ha merecido la pena.

Es hora de dar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que han contribuido a que este proyecto se materialice y sin las cuales su desarrollo no hubiese sido posible.

Por supuesto, agradecer a mis padres y familiares su apoyo incondicional durante todos estos años. Gracias por no dejar de creer en mí.

A toda la UGC de Inmunología del Hospital Reina Sofía, a sus Facultativos y Técnicos, a mis residentes mayores, Luis, Orlando, Rocío y a mis colegas investigadores Mario, Laura, Carmen, Alejandra, Sara, Fahkri y Nelson, con todos he compartido grandes momentos.

Al equipo de nefrólogos encabezado por su Jefe de Servicio, el Dr. Pedro Aljama, mi compañero Cristian Rodelo y en especial a los doctores Alberto Rodríguez-Benot y Marisa Agüera, con los que he tenido el privilegio de aprender en muchas tardes de trabajo conjunto. A vosotros os debo el desarrollo de esta idea y creedme si os digo que nunca os estaré lo suficientemente agradecido por vuestro apoyo.

A mis directores de tesis la Dra. Corona Alonso y el Dr. Rafael Solana; vuestra brillantez y profesionalidad, sin duda han sido un ejemplo a lo largo de todos estos años. Os agradezco no sólo el desarrollo de este proyecto de tesis, sino mi propia formación como especialista. Espero desarrollar algún día todo el conocimiento adquirido y poder decir con orgullo que me formé a vuestro lado.

Por último, quisiera finalizar esta sección haciendo una especial mención a la persona sin la cual todo este trabajo ni tan siquiera hubiese comenzado. Una persona a la que admiro por sus muchas virtudes (inteligencia, conocimiento, tenacidad, esfuerzo, pragmatismo...) y a la que quiero por todo lo demás. Alguien con quien tuve la suerte, hace ahora más de 5 años, de coincidir por capricho del destino y que poco a poco y sin darme cuenta fue entrando en mi vida hasta cambiarla para siempre. A mi compañera durante todo este viaje. Sólo espero que éste sea el principio de un proyecto profesional y personal en común, para toda la vida... Gracias Ana.

ÍNDICE



1. Resumen	16
2. Abstract	20
3. Introducción	24
3.1 La enfermedad renal crónica y el trasplante renal	26
3.2 El HLA y su implicación en el trasplante	28
3.3 El rechazo renal	32
3.4 Mecanismos efectores del rechazo	36
3.5 La Teoría Humoral del Trasplante	41
3.6 Relevancia de los anticuerpos anti-HLA preformados	44
4. Hipótesis	54
5. Objetivos	58
6. Materiales y Métodos	62
6.1 Población seleccionada	64
6.2 Terapia inmunosupresora	64
6.3 Tipaje HLA del donante	65
6.4 Detección y caracterización de los DSA	65
6.5 Análisis estadístico de los resultados	67
7. Resultados	70
7.1 Anticuerpos anti-HLA en la población seleccionada	72
7.2 Características clínicas e inmunológicas de los pacientes trasplantados	74
7.3 Supervivencia del aloinjerto renal	77
7.4 Riesgo de pérdida del injerto	81
7.5 Análisis de los modelos predictivos	84
7.6 Correlación entre el valor MFI de los anticuerpos anti-HLA y su capacidad para fijar el componente C1q humano	85
8. Discusión	88
9. Conclusiones	106
10. Abreviaturas	110
11. Referencias	114
12. Anexos	128
13. Producción científica derivada de la tesis	136

1. RESUMEN



Introducción. La consolidación del ensayo single antigen beads (SAB-panIgG) como método para la detección de anticuerpos frente a antígenos leucocitarios humanos (HLA), sin duda ha mejorado las expectativas de éxito en el trasplante de órganos sólidos. Paradójicamente, su alta sensibilidad para la detección de anticuerpos ha limitado seriamente las opciones de trasplante de una importante parte de la población que se encuentra sensibilizada frente a moléculas HLA. La actual estratificación del riesgo inmunológico en base a la presencia de un anticuerpo detectado por el ensayo SAB-panIgG, hace difícil encontrar donantes idóneos para estos pacientes, hecho que prolonga excesivamente su tiempo de permanencia en lista de espera. Una reciente modificación del ensayo estándar SAB-panIgG nos permite detectar únicamente aquellos anticuerpos capaces de activar la vía del complemento (ensayo SAB-C1q), los cuales, *a priori*, son más relevantes desde el punto de vista clínico. No obstante, la utilidad del ensayo SAB-C1q para estratificar el riesgo inmunológico de un anticuerpo preformado es un tema que, a día de hoy, suscita debate entre la comunidad científica.

Objetivo. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el impacto de la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA específicos de donante (DSA) sobre la supervivencia del aloinjerto renal.

Materiales y Métodos. Evaluamos retrospectivamente en muestras de suero pre-trasplante, pertenecientes a 389 pacientes trasplantados de riñón en el Hospital Universitario Reina Sofía entre los años 1995-2009, la presencia de DSA y su capacidad de fijar C1q mediante los ensayos SAB-panIgG y SAB-C1q, respectivamente. Analizamos la supervivencia del aloinjerto renal en la población a los 7 años post-trasplante en función de su estatus de anticuerpos. El fallo de aloinjerto, definido como retorno a diálisis, fue considerado como evento de interés. Evaluamos el valor predictivo de fallo renal de múltiples variables clínicas e inmunológicas y establecimos un modelo de regresión de Cox multivariante para determinar el riesgo ajustado de pérdida de injerto en presencia de DSA y de su capacidad de unión por C1q.

Resultados. Nuestro estudio reveló que los pacientes con DSA preformados capaces de fijar C1q presentaron la tasa de supervivencia del aloinjerto renal más baja de la población estudiada (40,7%), siendo



significativamente menor a la de pacientes con DSA incapaces de fijar C1q (73,4%; $p=0,001$) y a la de pacientes sin DSA previos al trasplante (79,1%; $p<0,001$). Mientras, la supervivencia del aloinjerto fue similar entre pacientes con DSA preformados C1q negativos y pacientes sin DSA ($p=0,403$). Llama la atención que entre la población cuyo DSA tuvo un valor de intensidad de fluorescencia media elevado (≥ 10.000 , $n=46$), el aloinjerto de aquellos pacientes en los que dicho DSA fue además capaz de fijar C1q mostró una peor supervivencia (38,4% vs. 68,9%; $p=0,041$). Finalmente, nuestro modelo predictivo multivariante determinó que únicamente la presencia de DSA capaces de unir C1q (HR 4,012; IC 95% 2,326-6,919; $p<0,001$), y no la de aquellos DSA incapaces de unir C1q (HR 1,389; IC 95% 0,784-2,461; $p=0,260$), constituye un factor predictivo independiente de riesgo de fallo renal, tras estratificar la población con DSA en función de su capacidad de unir C1q y ajustar el modelo por otros factores predictivos pre-trasplante como: i) la edad del donante, ii) el tiempo de isquemia fría y iii) las incompatibilidades HLA-DR entre donante y receptor.

Conclusión. La caracterización de antígenos inaceptables de acuerdo al ensayo SAB-C1q podría mejorar la actual estratificación del riesgo de pérdida de aloinjerto basada, fundamentalmente, en la presencia de anticuerpos definidos por SAB-panIgG. Este hecho aumentaría la limitada oferta de órganos que, a día de hoy, presentan los pacientes sensibilizados frente a moléculas HLA, muchos de los cuales mueren a la espera de recibir un órgano adecuado. Este nuevo algoritmo, que podría ser extendido a cualquier órgano sólido, podría reducir el tiempo de estos pacientes en lista de espera, lo que supondría, sin duda, una mejora sustancial en su calidad de vida, en muchos casos mermada por la mala condición clínica asociada a una permanencia prolongada en diálisis.

2. ABSTRACT



Introduction. The consolidation of the single antigen beads (SAB-panIgG) assay as the main standardized method to detect preformed antibodies against anti-human leukocyte antigens (HLA) has undoubtedly improved solid-organ transplantation success. However, its high sensitivity for the detection of anti-HLA antibodies has seriously limited the possibilities of allograft allocation for those patients sensitized to HLA molecules. The current stratification of the immunological risk according to the presence of antibodies detected by SAB-panIgG hampers the search for a suitable donor for these patients, excessively prolonging their waiting time. A recent modification of the standardized SAB-panIgG assay allows us to detect only those antibodies capable of activating the complement cascade (SAB-C1q assay), which are *a priori* more clinically relevant. Nevertheless, the clinical usefulness of SAB-C1q assay to stratify the immunological risk of a particular preformed antibody-specificity and determine the unacceptable HLA mismatches is currently under discussion.

Objective. The aim of this study was to evaluate the impact of the ability to bind C1q of donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) on kidney allograft survival.

Material and Methods. We retrospectively evaluated in pre-transplantation serum samples belonging to 389 single-kidney transplanted patients at Reina Sofia University Hospital between 1995-2009, the presence of DSA and their C1q-binding ability, using SAB-panIgG and SAB-C1q assays, respectively. We analyzed kidney-allograft survival up to 7 years according to the presence/absence of DSA and their ability to bind C1q. Allograft loss, defined as return to dialysis, was considered the event of interest. Furthermore, we evaluated the predictive value of allograft failure of multiple clinical and immunological variables and we designed a Cox multivariate regression model to predict the adjusted-risk of allograft loss in the presence of DSA and their C1q-binding ability.

Results. Our study revealed that recipients with preformed C1q-binding DSA showed the lowest allograft survival rate up to 7 years (40.7%) compared to patients with preformed non-C1q-binding DSA (73.4%; $p=0.001$) and without DSA (79.1%; $p<0.001$). Allograft survival rate was similar between patients with preformed non-C1q-binding DSA and patients without preformed DSA ($p=0.403$). Interestingly, among the transplanted



population with high-mean fluorescence intensity DSA ($\geq 10,000$; $n=46$), those patients whose DSA were further capable of binding C1q showed a poorer allograft outcome (38.4 vs. 68.9%; $p=0.041$). Moreover, our multivariate predictive model for assessing the risk of allograft loss determined that only the presence of C1q-binding DSA (HR 4.012; CI 95% 2.326–6.919; $p<0.001$) but not of non-C1q-binding DSA (HR 1.389; CI 95% 0.784–2.461; $p=0.260$) remained an independent predictor after stratifying the DSA population according to the C1q-binding ability and adjusting the model for other pre-transplantation predictive factors including donor age, cold-ischemia time, and HLA-DR mismatches.

Conclusions. The definition of unacceptable mismatches according to SAB-C1q assay would improve the current risk stratification of allograft loss, which is essentially based on the presence of antibodies predefined by SAB-panIgG assay. This improved risk stratification would expand the limited allograft allocation that patients pre-sensitized to HLA molecules are currently exposed to, many of whom die while waiting for a suitable donor. This new algorithm, which could be implemented to other solid-organ transplants, would shorten the waiting times of these highly sensitized patients, so considerably improving their quality of life.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y EL TRASPLANTE RENAL

La enfermedad renal crónica (ERC) engloba un conjunto de enfermedades heterogéneas que afectan de manera irreversible a la estructura y función renal (1). La definición y clasificación de la ERC ha evolucionado a lo largo del tiempo. Actualmente, las guías internacionales (National Kidney Foundation, NKF y Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, KDOQI) definen esta condición como una disminución de la función renal con un filtrado glomerular inferior a 60 mL/min/1.73m² y/o la aparición de determinados marcadores de daño renal (albuminuria, sedimento urinario anormal, alteraciones electrolíticas debidas a un desorden tubular, anomalías estructurales o histológicas e historia de trasplante renal) durante al menos tres meses, independientemente de la causa subyacente que lo produzca (Tabla 1) (2).

Tabla 1. Pronóstico de ocurrencia de ERC según valores de filtrado glomerular y albuminuria. Adaptado de Levey y Coresh (1). Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012; 379:165-180.

				Albuminuria				
				Categorías, descripción y rangos (mg/g)				
				A1		A2	A3	
				Óptima y normal-alta		Alta	Muy alta y nefrótica	
				<10	10-29	30-299	300-1999	≥2000
Filtrado glomerular	G1	Normal y elevado	>105					
			90-104					
	G2	Ligeramente disminuido	75-89					
			60-74					
	G3a	Ligera a moderadamente disminuido	45-59					
	G3b	Moderada a severamente disminuido	30-44					
	G4	Severamente disminuido	15-29					
	G5	Fallo renal	<15					

- Sin ERC
- Moderado riesgo de ERC
- Alto riesgo de ERC
- Muy alto riesgo de ERC

La alta incidencia y prevalencia de la ERC, se estima que 12 de cada 100.000 personas padecen ERC, tasa que podría aumentar hasta 14 de cada 100.000 en el año 2030, su morbilidad y el coste económico que supone a los sistemas públicos de salud hacen que sea un problema sanitario de primer orden. Particularmente, en España aproximadamente 4 millones de personas padecen ERC (dato tomado del Documento Marco sobre Enfermedad Renal Crónica (ERC) dentro de la Estrategia de Abordaje a la Cronicidad en el SNS. Febrero 2015. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad). La prevalencia de la ERC aumenta de forma progresiva con el envejecimiento y con otras enfermedades como la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial y la arteriosclerosis. La Tabla 2 muestra las causas más frecuentes de ERC en España.

Tabla 2. Causas más frecuentes de ERC en España (datos tomados del Registro Español de Enfermos Renales 2016).

	15-44	45-64	65-74	>75
Vasculares	3,4 %	19,9 %	28,5 %	48,2 %
Sistémicas	14,0 %	28,7 %	22,4 %	34,9 %
No filiadas	10,3 %	27,2 %	28,1 %	34,4 %
Otras	7,5 %	28,8 %	30,5 %	33,2 %
Diabetes mellitus	6,4 %	32,7 %	33,2 %	27,7 %
PNC/NIC	15,6 %	33,7 %	25,1 %	25,7 %
Glomerulonefritis	18,3 %	42,9 %	20,0 %	18,8 %
Enfermedad poliquística	14,8 %	59,3 %	15,7 %	10,3 %
Otras hereditarias/congénitas	42,2 %	34,9 %	17,4 %	5,5 %

La manifestación más avanzada de la ERC es la insuficiencia renal crónica terminal, haciéndose necesario un tratamiento renal sustitutivo (TRS) de la función renal mediante hemodiálisis, diálisis peritoneal o trasplante renal. Se estima que el TRS

consume entre el 2,5% y el 3% del presupuesto del Sistema Nacional de Salud y más del 4% de atención especializada. El coste medio anual por paciente tratado con hemodiálisis es de más de 46.000 € y de más de 30.000 € en diálisis peritoneal (3). De las tres posibles opciones, el trasplante renal es el que permite una mejor supervivencia y un menor coste económico (4, 5).

El Hospital Universitario Reina Sofía posee una amplia experiencia en la implementación de tratamientos renales sustitutivos, y particularmente en la realización del trasplante renal, habiéndose llevado a cabo más de 1.600 trasplantes renales (dato tomado del Registro de Trasplantes de la UGC de Nefrología del Hospital Universitario Reina Sofía) desde 1979, año del primer trasplante renal realizado en Córdoba (6). El perfeccionamiento de las técnicas quirúrgicas, junto con el desarrollo de fármacos inmunosupresores cada vez más eficaces, ha permitido que este procedimiento se convierta en poco tiempo en una terapia consolidada con muy buenos resultados. No obstante, la respuesta inmune del receptor frente a su aloinjerto sigue siendo una de las principales limitaciones del trasplante a corto y largo plazo.

3.2 EL HLA Y SU IMPLICACIÓN EN EL TRASPLANTE

Jean Dausset y cols. describieron por primera vez el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) como un locus genético cuyos productos eran responsables del rechazo agudo de aloinjertos tisulares (7). Dado que fue descubierto en la superficie de los glóbulos blancos (leucocitos), los primeros productos de los genes MHC humanos se conocieron como antígenos leucocitarios y es por ello por lo que el MHC humano se conoce también como HLA, por sus siglas en inglés (Human Leukocyte Antigen).

El MHC constituye la región genómica más relevante con respecto a la infección o la autoinmunidad, jugando un papel crucial en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa. Su mapa genético extendido (Figura 1) abarca una amplia región de 7,6 MB localizada en el brazo corto de cromosoma 6 y está conformada por varias



regiones génicas que desde el telómero hacia el centrómero son definidas como: la subregión extendida de Clase I (3,9 MB), la subregión clásica de Clase I (1,9 MB), la subregión clásica de Clase III (0,7 MB), la subregión clásica de Clase II (0,9 MB) y la subregión de Clase II extendida (0,2 MB) (8).

Dentro de todo este complejo mapa genético, en las subregiones de Clase I y II clásicas se localizan los genes más importantes desde un punto de vista inmunológico, incluyendo los genes HLA clásicos, un grupo génico heterogéneo, de expresión codominante y altamente polimórfico, cuyos productos son las proteínas HLA Clase I y II clásicas implicadas en la presentación antigénica, hecho que permite al sistema inmune a través de las células T, discernir lo propio de lo ajeno.

No obstante en estas subregiones también encontramos: i) genes que codifican proteínas HLA no clásicas de Clase I (HLA F, G o E), cuya función no ha sido definida con exactitud aunque algunas de ellas como el HLA-G parece estar involucrada en fenómenos de tolerancia inmunológica, existiendo formas HLA-G solubles cuya utilidad se ha postulado como herramienta para prevenir el rechazo en el trasplante de órganos sólidos (9); ii) genes MIC (MHC Class I chain related), cuyos productos, ligandos del receptor activador de células asesinas naturales (NK) NKG2D, juegan un papel destacado en respuestas antivirales y antitumorales (10) y iii) genes no clásicos de Clase II, como el HLA-DM, involucrados en el procesamiento antigénico por la vía endosomal. Finalmente, en la subregión clásica de Clase III podemos encontrar genes de proteínas de choque térmico, citoquinas (TNF) o factores del sistema del complemento (C2, C4), con una importante función en el mantenimiento de la homeostasis.

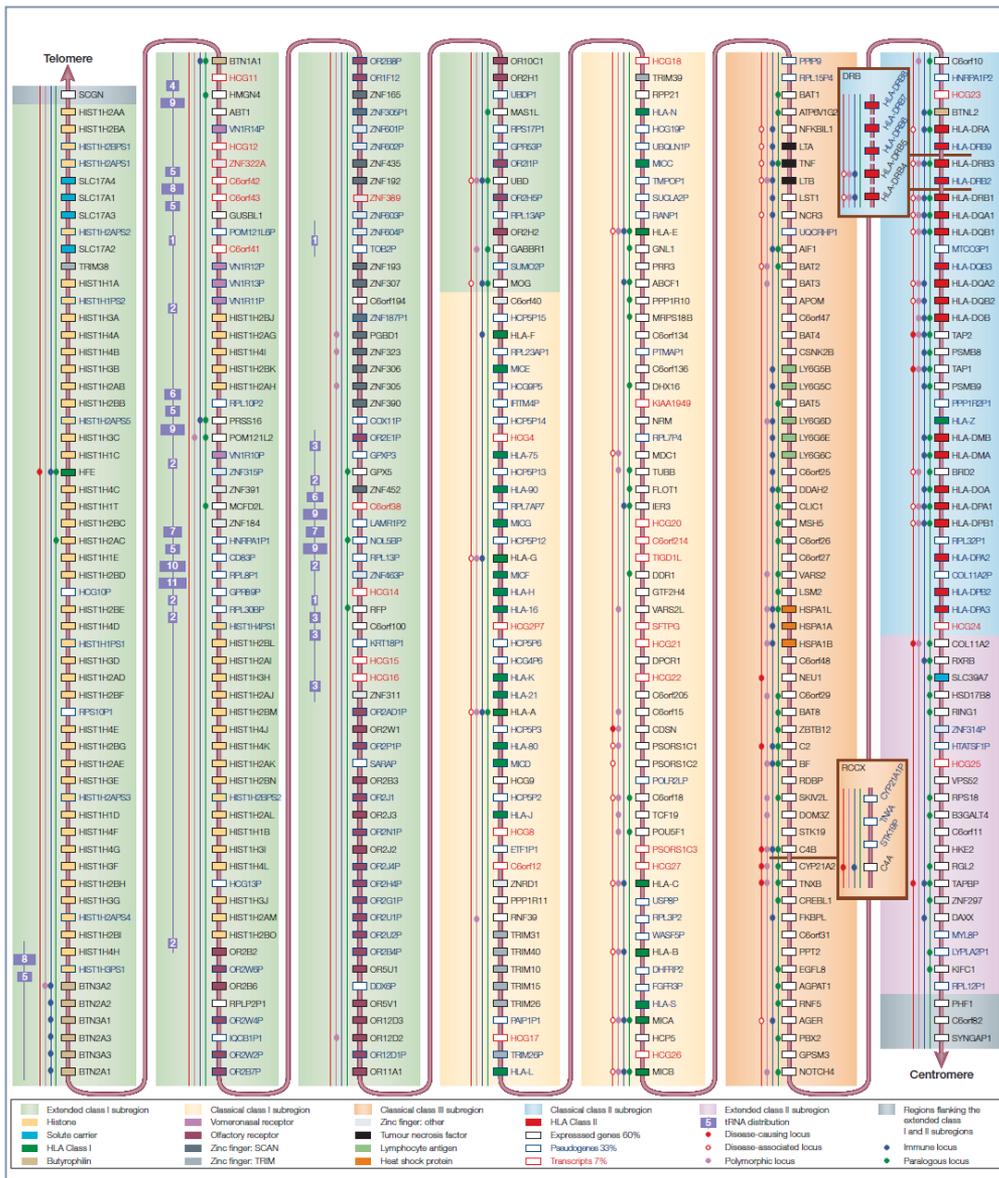


Figura 1. Mapa genético del MHC humano. Tomado de Horton y cols. (8) Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet.* 2004; 5: 889-899.

Las moléculas HLA clásicas son proteínas glicosiladas localizadas en la membrana plasmática que se dividen en dos grandes grupos dependiendo del origen del péptido que van a exponer. Las moléculas HLA de Clase I, combinadas con β_2 microglobulina, unen péptidos procedentes del catabolismo proteico endógeno que

tiene lugar en el proteasoma, mientras las de Clase II exponen péptidos derivados de proteínas captadas del exterior, procesadas por la vía endosomal (Figura 2) (11). Los genes de los loci *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-Cw* codifican las moléculas HLA de Clase I clásicas y son expresados en todas las células nucleadas. Los genes de los loci *HLA-DR*, *HLA-DP* y *HLA-DQ* codifican moléculas HLA de Clase II que son expresadas fundamentalmente en células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales (linfocitos B, macrófagos y células dendríticas) pudiendo, no obstante, su expresión ser inducida por γ interferón en otros linajes celulares, como por ejemplo en células endoteliales durante una respuesta inflamatoria (12).

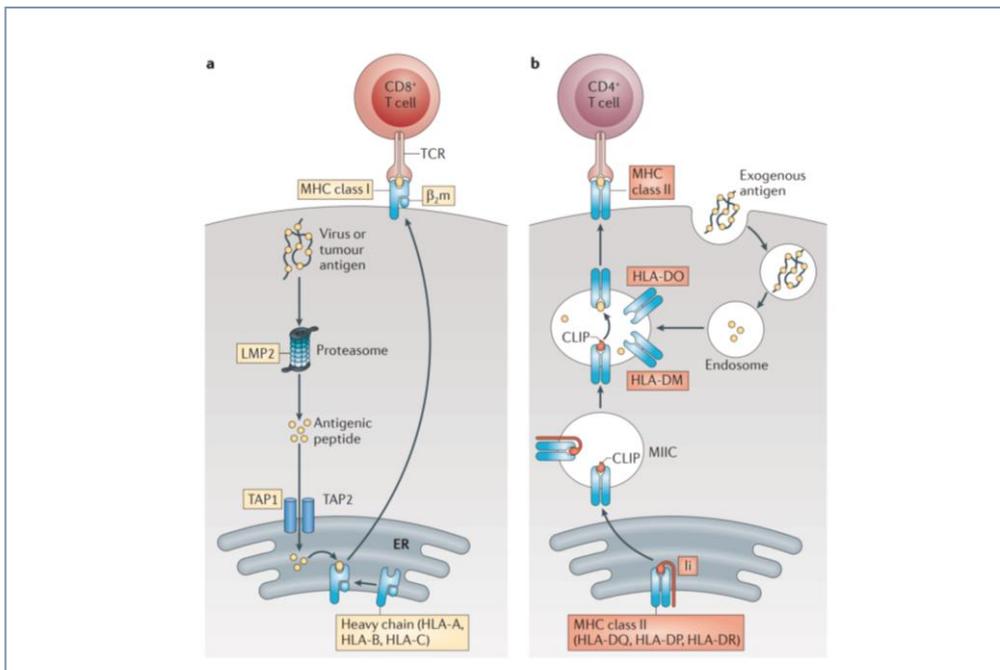


Figura 2. Vías de presentación antigénica de las moléculas MHC de Clase I y II. Tomado de Kobayashi y van den Elsen (13) NLR5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12: 813-820.

Sin duda la característica fundamental del HLA es su elevado polimorfismo, existiendo en la población una gran cantidad de variantes alélicas para cada locus y siendo concretamente el *HLA-B*, el gen humano más polimórfico conocido. A día de hoy



se han descrito 3.192 alelos del gen *HLA-A*, 3.977 alelos del gen *HLA-B*, 2.740 del *HLA-Cw*, 1.764 alelos del *HLA-DRB1* y 807 para *HLA-DQB1* (14). Este polimorfismo extremo hace que el HLA de un individuo sea prácticamente único, usándose, la tipificación genética HLA, como herramienta forense o en estudios de paternidad. Los diferentes alelos codifican proteínas que difieren estructuralmente en su lugar de anclaje al péptido (15), lo que provoca diferencias específicas de ligamiento entre los péptidos por los distintos alelos HLA. Este hecho podría considerarse como una respuesta evolutiva para optimizar la protección de los organismos vertebrados frente a un ambiente hostil, dotando al sistema inmune de una capacidad de reconocimiento antigénico prácticamente ilimitada. Por otra parte, las marcadas diferencias interindividuales en la respuesta frente a antígenos extraños o la susceptibilidad a determinadas patologías también pueden explicarse en base al polimorfismo HLA. Por último, esta extraordinaria variabilidad genética de las moléculas HLA en la población constituye la principal limitación para el trasplante de órganos alogénicos (16). Las diferencias polimórficas entre el HLA del donante y receptor son percibidas por el sistema inmune de este último, el cual pondrá en marcha toda una serie de mecanismos inmunológicos, fundamentalmente de naturaleza adaptativa, para intentar eliminar al agente invasor, *el aloinjerto*.

3.3 EL RECHAZO RENAL

El mecanismo por el cual el sistema inmune del receptor ataca al órgano trasplantado se conoce como *rechazo* y puede definirse atendiendo fundamentalmente al momento en el que se produce, siendo hiperagudo, agudo y crónico los principales tipos de rechazo (17). No obstante, también puede ser clasificado según los cambios fisiopatológicos observados (celular-intestinal, vascular, endotelial), la severidad del mismo, la respuesta al tratamiento (cortico-resistente), la presencia o ausencia de disfunción del aloinjerto (clínico o subclínico, respectivamente) y los mecanismos inmunológicos implicados (celulares y humorales) (18).



El rechazo hiperagudo es un proceso que aparece en los primeros minutos-horas tras la reperfusión del injerto (Figura 3), causando lesiones vasculares severas, fundamentalmente capilares, que culminan con la pérdida del riñón, el cual nunca llega a funcionar o lo hace por escasos minutos. Se trata de una respuesta inmunológica inmediata, producida como consecuencia de la existencia de anticuerpos en el receptor frente a los antígenos HLA endoteliales del aloinjerto. Estos anticuerpos preexistentes, producto de un proceso de alosensibilización previa, pueden inducir tanto la activación de la cascada del complemento por la vía clásica, como la estimulación de la secreción del factor procoagulante de Von Willebrand por las células endoteliales, dando lugar a la adhesión y agregación plaquetarias. Como resultado final de este conjunto de reacciones, se produce una oclusión trombótica intravascular que induce un proceso isquémico irreversible (19).

El rechazo renal agudo suele aparecer después de la primera semana post-trasplante y normalmente antes de los primeros 3 meses, si bien, un paciente puede experimentar fenómenos de rechazo agudo durante toda la evolución del aloinjerto. Actualmente, es considerado como uno de los mayores problemas del post-trasplante temprano y su ocurrencia está fuertemente asociada a un descenso de la supervivencia del injerto renal, siendo el factor de riesgo más importante para la aparición de rechazo crónico (20, 21). Su diagnóstico se realiza a partir de los hallazgos histo-patológicos resultantes en una biopsia, normalmente realizada en un contexto de disfunción clínica, y siguiendo los sistemas de clasificación internacionales, como la clasificación de Banff para el rechazo del aloinjerto renal (22).

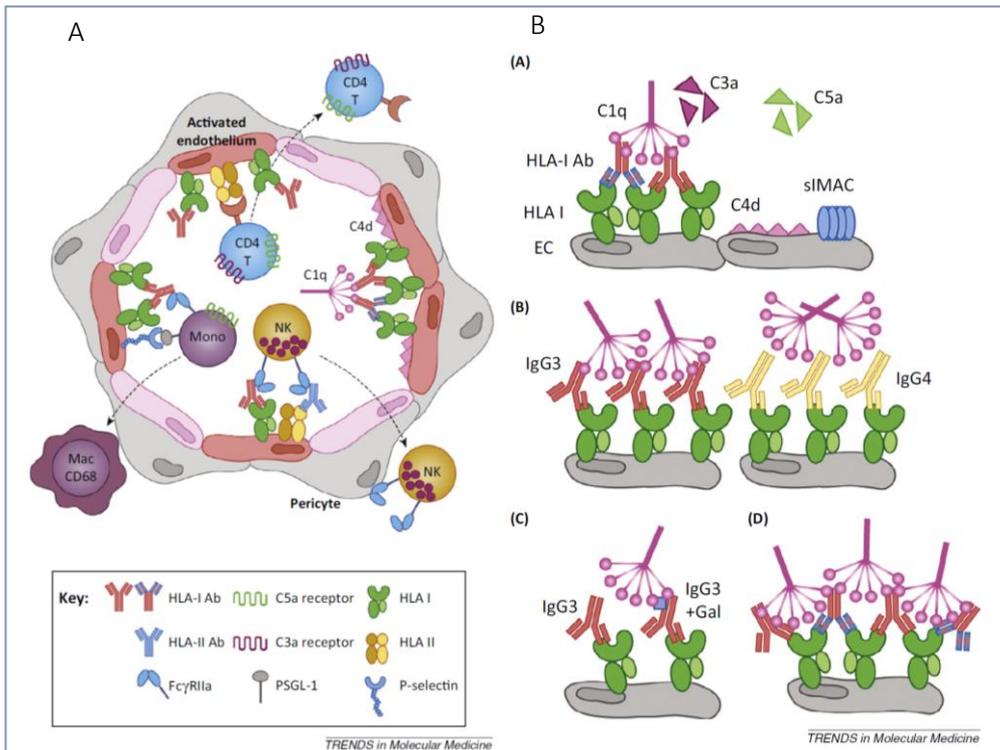


Figura 3. Esquema representativo de los acontecimientos que se producen en el aloinjerto trasplantado durante el rechazo hiperagudo sobre el endotelio vascular (A) y la activación de la cascada del complemento (B). Tomado de Thomas y cols. (19) The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcγR, and endothelium in transplant rejection. *Trends Mol Med* 2015; 5: 319-329.

Se piensa que el rechazo renal agudo es el resultado de dos mecanismos inmunológicos que pueden actuar de forma aislada o mixta: un proceso dependiente de células T, que se correspondería con un rechazo agudo de tipo celular y un proceso dependiente de células B, que generaría un rechazo agudo de naturaleza humoral. Con diferente grado de afectación, el rechazo agudo suele ser reversible tras un ajuste adecuado del tratamiento inmunosupresor. Así, en el tratamiento del rechazo celular agudo suele ser efectiva la administración de corticoides por vía intravenosa, pudiéndose emplear terapia deplectora de linfocitos como segunda línea en caso de fracaso, obteniéndose buenas tasas de respuesta funcional para rechazos celulares Banff grado 1 (IA y IB) y Banff grado 2A (23). Para el tratamiento del rechazo humoral

agudo, dirigido a eliminar el anticuerpo o impedir su desarrollo y/o acción, procedimientos como la plasmaféresis o inmunoadsorción, terapias basadas en rituximab o bortezomib, y el uso de inmunoglobulina intravenosa (IVIG), han demostrado beneficio clínico (24). El eculizumab, un inhibidor de la escisión del componente C5 del complemento que evita la formación del complejo de ataque a membrana (25), también se ha postulado como terapia para el rechazo humoral agudo, si bien, su eficacia no ha sido demostrada.

Finalmente, el rechazo crónico se desarrolla de meses a años después del trasplante y engloba un conjunto de alteraciones estructurales y funcionales de etiología no muy bien definida, en la que parecen intervenir múltiples mecanismos tanto inmunológicos como no inmunológicos que conducen a un lento y progresivo deterioro de la función del injerto (26). Clínicamente la disfunción renal crónica se manifiesta por un aumento progresivo de la creatina y/o proteinuria. Histológicamente se caracteriza por la presencia de vasculopatía, consistente en una fibrosis concéntrica de la intima arterial que puede llegar a ocluir la luz vascular, y glomerulopatía. Sin embargo, su evolución silente en muchos casos puede retrasar el diagnóstico. Se cree que los mecanismos inmunológicos que causan rechazo crónico son consecuencia del desarrollo de una alorreactividad antígeno-específica mediada por células T y/o anticuerpos. Esta alorreactividad genera un estado de inflamación perivascular que merma la integridad endotelial de capilares glomerulares, peritubulares así como de otros vasos de pequeño y mediano calibre. El daño endotelial conduce a hipertrofia celular, expansión y duplicación de la membrana basal y daño de algunos podocitos, con la apariencia histológica de glomerulopatía del trasplante (26). Se postula que el rechazo crónico se produce por la vía indirecta, después de que las células dendríticas del donante sean reemplazadas por las del receptor dentro del órgano. No obstante, los aloinjertos también pueden ser crónicamente dañados por mecanismos no-inmunológicos, como fármacos, isquemia, infecciones, la edad y el desarrollo de enfermedades *de novo* o la recurrencia de enfermedades de base (27). Se sabe que los

órganos que experimentan rechazo crónico muestran muchas de las características presentes en los tejidos cicatriciales, incluyendo proliferación de fibroblastos, células endoteliales o epiteliales y deposición de colágeno dentro del parénquima del órgano y los vasos sanguíneos (28).

3.4 MECANISMOS EFECTORES DEL RECHAZO

Los dos principales mecanismos inmunológicos que se producen durante el rechazo del aloinjerto engloban respuestas innatas no específicas, que predominan en la fase temprana de la respuesta inmune, y respuestas adaptativas específicas de donante, que resultan del reconocimiento aloantigénico por las células T del receptor.

Las respuestas inmunes innatas son consecuencia de varios eventos asociados al procedimiento clínico del trasplante, como el daño causado por la isquemia-reperfusión y las infecciones, que conducen a la liberación de DAMPs o patrones moleculares asociados a daño (especies reactivas de oxígeno, proteínas de choque térmico, sulfato de heparina o fibrinógeno), y PAMPs o patrones moleculares asociados a patógeno (29). Inmediatamente después del trasplante, las señales de daño tisular liberadas, mediante su unión a receptores de reconocimiento de patrones o PRRs, localizados en determinadas tipos de células hematopoyéticas como, por ejemplo, células dendríticas, activan la transcripción de genes de respuesta inflamatoria, lo que induce la maduración celular, estimulando su capacidad de presentación antigénica e incrementando la expresión de moléculas co-estimuladoras y la secreción de citoquinas proinflamatorias (30). En este contexto, las CPA maduras del donante migran a las áreas de células T de los órganos linfoides secundarios e inducen la activación y diferenciación de células T CD4⁺ naïve alorreactivas, que se convierten en células T CD4⁺ efectoras. Estas células T CD4⁺ efectoras se desplazan hacia el órgano diana donde activan macrófagos y granulocitos que han infiltrado al injerto en respuesta al estímulo inflamatorio. Además, en el contexto proinflamatorio, las células NK desempeñan



también un papel importante. Así, por un lado producen interferón γ que induce la expresión de MHC de Clase I y II en las células endoteliales, las cuales se tornan más susceptibles al ataque por células T, por otro lado, las células NK pueden ejercer un rol efector directo causando la citólisis de células diana del aloinjerto bajo la acción de determinadas citoquinas inflamatorias como MCP-1 y CX3CT1 (31).

El sistema del complemento lleva a cabo un papel central como mecanismo efector de la respuesta inmune innata. Las tres vías del complemento pueden ser activadas por DAMPs, así como por el ambiente inflamatorio que se desarrolla durante el daño causado por la isquemia-reperfusión (32).

Por su parte, la respuesta inmune adaptativa aparece más tarde y su principal característica es que es antígeno-específica. El inicio de esta respuesta es posible gracias a la presentación de aloantígenos por las CPA, principalmente las células dendríticas, y su alorreconocimiento por las células T del receptor.

El alorreconocimiento antigénico de las moléculas MHC del injerto se puede producir por tres vías (Figura 4). En la vía *directa*, los linfocitos del receptor reconocen la molécula MHC intacta sobre la superficie de las CPA del donante. En un ambiente proinflamatorio, las CPA del donante maduran y migran a los órganos linfoides secundarios donde contribuyen a la maduración de las células T del receptor, inducida por señales como IL-1 β , TNF- α y CD40. La segunda es la vía *indirecta*, en la que los linfocitos del receptor reconocen las moléculas HLA del donante tras ser procesadas y presentadas por las CPA del receptor. Dado que las células dendríticas expresan tanto MHC de Clase I como de Clase II, los antígenos del donante pueden ser presentados tanto a células T CD4⁺ como CD8⁺. La tercera de las vías es la *semi-directa*, caracterizada por la habilidad dual que presentan las CPA del receptor tanto de i) presentar el MHC del donante de manera íntegra, que es adquirido por contacto célula-célula o por la fusión a su membrana de exosomas liberados por las células del donante, como de ii) internalizar, procesar y exponer el MHC del donante en fragmentos peptídicos anclados



a moléculas MHC autólogas. En esta vía, las células T CD4⁺ y CD8⁺ alorreactivas son estimuladas a partir de que las CPA del receptor adquieran y presenten el MHC del donante por vía directa e indirecta (33, 34).

El tipo de alorreconocimiento antigénico tendrá una implicación en el tipo de respuesta inmunitaria frente al aloinjerto (35). Así, la presentación antigénica a través de la vía directa de alorreconocimiento inicia una respuesta inmune adaptativa temprana o aguda al trasplante HLA-incompatible. No obstante, dado que el número de leucocitos del donante transferidos en el aloinjerto es limitado y únicamente permanecen otras células, como las endoteliales, para estimular las células T por vía directa, esta respuesta disminuye con el tiempo. Por otra parte, la presentación antigénica por la vía indirecta se puede producir mientras que el injerto permanezca *in situ* y, por tanto, se convierte en la vía principal de alorreconocimiento a largo plazo. El significado de la vía semi-directa en el contexto del rechazo aún no se ha dilucidado (36).

Como consecuencia del alorreconocimiento, se presentan señales antígeno-específicas a las células T a través del complejo TCR-CD3. Estas señales no son suficientes para activar de forma completa a las células T naïve, sino que se necesitan moléculas co-estimuladoras como el par CD80/CD86-CD28. La molécula CD28 se expresa constitutivamente en las células T y se une a las moléculas CD80 o CD86 sobre la superficie de las CPA. La señalización a través de CD28 reduce el umbral de activación de la célula T, aumenta la expresión de IL-2, promueve la proliferación de las células T y su resistencia a muerte celular inducida por apoptosis. Además, el efecto de la señalización vía CD28 aumenta la expresión de CD40L, otra molécula estimuladora. La interacción de CD40 en la superficie de las CPA con su ligando, CD40L en las células T, activa las CPA para amplificar la activación de las células T naïve, que maduran y se diferencian a células T efectoras CD4⁺ y CD8⁺.

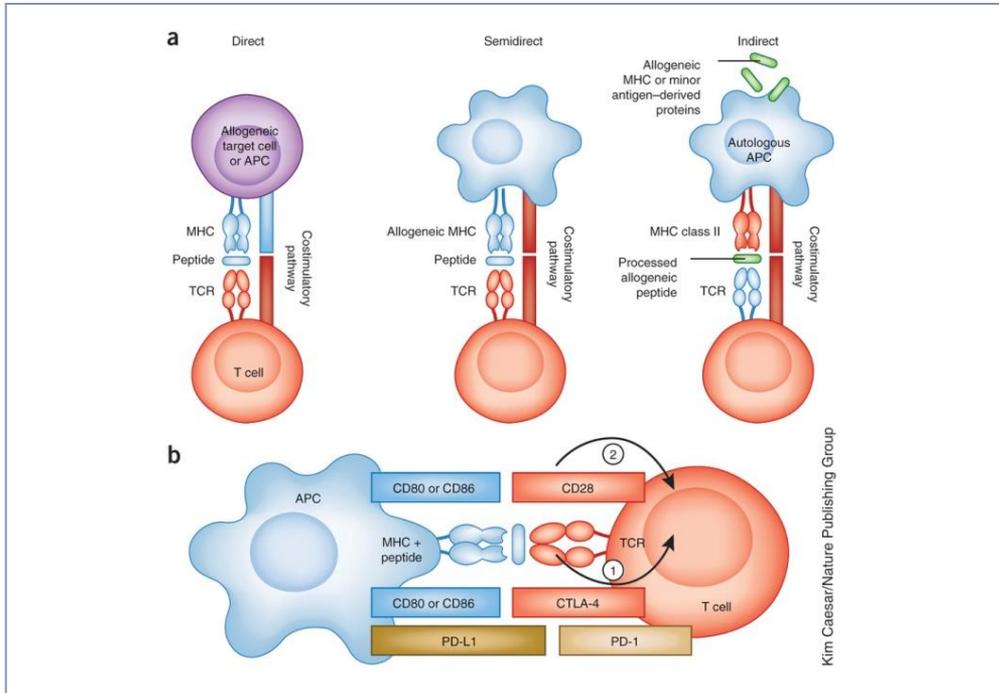


Figura 4. Vías de alorreconocimiento antigénico: directa, indirecta y semi-directa. Imagen tomada de Zakrzewski y cols. (37) Overcoming immunological barriers in regenerative medicine. *Nat Biotechnol.* 2014; 32: 786-794

Por su parte, las células B pueden actuar como células secretoras de anticuerpos, pero también como CPA, dado que expresan tanto MHC de Clase I y II, como moléculas co-estimuladoras, incluyendo el CD40. Como CPA, las células B interactúan con las células T CD4⁺ a través de su TCR y mediante las moléculas co-estimuladoras, creando una sinapsis que permite la secreción de citoquinas por las células T para la activación y diferenciación de células B en células plasmáticas productoras de anticuerpos (36).

Se han identificado varios mecanismos efectores por los cuales los anticuerpos pueden causar daño sobre el aloinjerto. Estos mecanismos (Figura 5) incluyen la activación del complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por células NK y la activación del endotelio (38).



Sin duda, de las tres vías, el complemento representa el principal mecanismo de daño (19, 39). Todo comienza con la unión de los anticuerpos a sus dianas antigénicas, HLA y/o no-HLA, ubicadas en la superficie de las células endoteliales de la microvasculatura del aloinjerto. Los complejos antígeno-anticuerpo se fijan a la molécula C1q, disparando la activación del complemento por la vía clásica, la cual, a través de una cascada de eventos, conduce a la formación de las convertasas de C3 y C5 y la subsecuente formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). El MAC forma poros transmembrana generando un desequilibrio electrolítico que produce la lisis de la célula. Otros componentes del complemento como C3a y C5a actúan como quimio-atrayentes para neutrófilos y macrófagos. El C5a actúa también como una potente anafilotoxina y conduce a la formación de edema, debido a la liberación de histamina por los mastocitos.

En relación a la ADCC, las células NK a través de su receptor FcγRIII (CD16) son capaces de unirse a los anticuerpos, a su vez unidos a sus antígenos diana sobre el endotelio vascular, por su región Fc. La unión FcγRIII - anticuerpo (Fc) induce la activación de las células NK que secretan perforinas y granzimas provocando la muerte de las células diana.

Los anticuerpos, además de activar la cascada del complemento, pueden también activar directamente el endotelio vascular, especialmente la proliferación celular, que es particularmente importante en la patogénesis asociada al rechazo crónico. A diferencia de la activación de la cascada del complemento, que fundamentalmente causa la lisis de las células endoteliales, en la activación directa del endotelio mediada por anticuerpos predominan el daño endotelial subléptico y la modificación estructural de la microcirculación. Histológicamente, estos cambios se manifiestan como una proliferación de las células endoteliales y/o el engrosamiento, duplicación y multilaminación de la membrana basal del glomérulo y los capilares peritubulares.

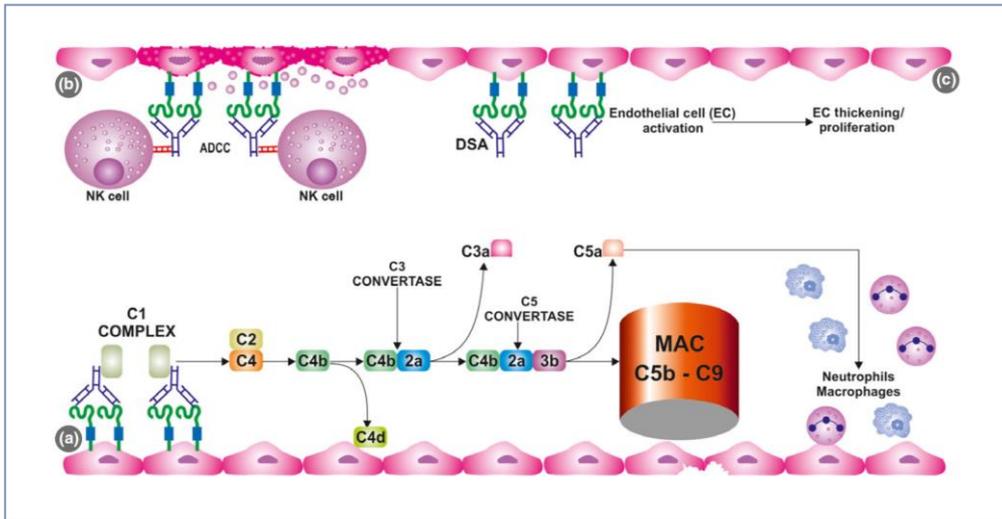


Figura 5. Mecanismos de daño mediado por anticuerpos: activación del complemento (a), citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por células NK (b) y activación del endotelio (c). Imagen tomada de Mehra NK y cols. (38) Clinical and immunological relevance of antibodies in solid transplantation. *Int J Immunogenet.* 2016; 43: 351-368.

Finalmente, la producción policlonal de anticuerpos en respuesta a los antígenos del aloinjerto adquirirá una trascendental relevancia en futuros intentos de trasplante, una vez fracase la función del primer injerto. Dado el carácter lesivo de estos anticuerpos, su presencia constituye la principal barrera para el trasplante de la población sensibilizada.

3.5 LA TEORÍA HUMORAL DEL TRASPLANTE

“La respuesta inmune al trasplante es predominantemente celular, siendo los linfocitos los principales efectores del rechazo del aloinjerto. El papel que juegan los anticuerpos en el rechazo humoral es incierto y prácticamente imposible de demostrar” (40). Así comienza la introducción del artículo publicado en Septiembre de 1966 por Kissmeyer-Nielsen y cols., en el que describen la ocurrencia de dos rechazos hiperagudos en una serie de 21 alotrasplantes renales consecutivos y donde sugieren que ambos fenómenos podrían estar relacionados con la preexistencia de anticuerpos



dirigidos frente a los antígenos de los donantes. Los autores hacen hincapié en que los sucesos de rechazo se producen en dos mujeres, de 33 y 38 años. Ambas pacientes habían recibido diálisis peritoneal como tratamiento renal sustitutivo durante varias semanas antes del trasplante. A lo largo de dicho periodo recibieron, además, sucesivas transfusiones de sangre completa y plasma para reemplazar la pérdida proteica peritoneal. Curiosamente, la primera de las receptoras había tenido cinco embarazos, la segunda tres. Los dos trasplantes se realizaron a partir de donantes con isogrupo ABO con respecto a las receptoras. Inmediatamente después del trasplante, ambos riñones adquirieron rápidamente un color, tono y temperaturas normales y se observó secreción de orina en los dos minutos siguientes a la apertura de la anastomosis. La secreción de orina continuó en un rango normal durante unos 10 minutos, pero entonces disminuyó gradualmente y cesó transcurrida la primera hora. Simultáneamente el riñón trasplantado perdió el tono y se puso flácido y cianótico. La anatomía patológica de ambos riñones reveló la presencia de microtrombos en las arteriolas y capilares glomerulares y yuxtaglomerulares, con ausencia de infiltrado celular. Dado que los leucocitos y trombocitos son importantes en los procesos de isoimmunización con trasfusiones sanguíneas y/o embarazo, Kissmeyer-Nielsen y cols. argumentaron que los antígenos renales frente a los cuales estaban dirigidos los anticuerpos responsables del rechazo deberían encontrarse igualmente en estos tipos celulares.

Tres años más tarde, concretamente en Abril de 1969, Patel y Terasaki (41), estudiando los resultados de 226 trasplantes de riñón llevados a cabo en diferentes centros, demostraron la fuerte asociación entre la presencia de anticuerpos citotóxicos dirigidos frente a los antígenos linfocitarios del donante y un resultado positivo de la prueba cruzada por linfocitotoxicidad dependiente de complemento, resaltando su utilidad clínica como prueba previa al trasplante, por su valor predictivo de aparición de rechazo hiperagudo. De los 226 receptores estudiados, 63 tuvieron anticuerpos preformados frente a antígenos leucocitarios. Un total de 34 de los 80 injertos (42,5%)



trasplantados a estos 63 receptores con anticuerpos preformados fueron rechazados inmediatamente mientras que, de los 168 injertos practicados sobre 163 receptores sin anticuerpos, sólo se rechazaron 4 (2,4%; $p < 0,001$). Para estudiar el efecto de la prueba cruzada (suero receptor x linfocitos del donante) los 63 receptores con anticuerpos preformados fueron categorizados en tres grupos: aquellos con prueba cruzada positiva ($n=30$), aquellos en los que no se realizó prueba cruzada ($n=23$) y los que tuvieron un resultado negativo para la prueba cruzada ($n=27$). De los 30 aloinjertos trasplantados a receptores con prueba cruzada positiva, 24 (80%) fallaron inmediatamente y uno (3,3%) fue rechazado a los cuatro meses.

Treinta y cuatro años después, Terasaki enunció su Teoría Humoral del Trasplante (42), considerada como uno de los dogmas centrales de la Histocompatibilidad. Múltiples evidencias acumuladas a largo de décadas de investigación demuestran que los anticuerpos, más concretamente aquellos dirigidos frente a los antígenos leucocitarios humanos, juegan un papel crucial en el rechazo (*hiperagudo, agudo y crónico*) de los aloinjertos trasplantados

No obstante, en la respuesta inmunológica desarrollada frente al órgano trasplantado se pueden generar otro tipo de anticuerpos dirigidos frente a antígenos distintos a los HLA clásicos. Estos anticuerpos no-HLA pueden estar dirigidos frente a dianas no-polimórficas o proteínas no-alélicas y su desarrollo puede deberse a fenómenos de sobreexpresión durante el proceso inflamatorio en respuesta al trasplante, o cuando determinados antígenos crípticos son expuestos al sistema inmune como consecuencia del daño que se produce sobre el aloinjerto. Se cree que el microambiente dentro del injerto o el rechazo pueden romper la tolerancia humoral a autoantígenos (43). Estos anticuerpos no-HLA pueden ser generados *de novo* o estar presentes en el pre-trasplante, si bien su formación no siempre está vinculada a un evento de sensibilización clásico (44). Así ocurre con los anticuerpos dirigidos frente a la cadena α del antígeno MIC o MICA, donde una mutación A5.1 en el donante,

relacionada con el alelo MICA*008, está asociada a un incremento en la expresión de MICA por las células endoteliales y, por tanto, estas moléculas MICA mutadas pueden ser diana para la formación de anticuerpos.

Se han descrito y estudiado varios tipos de anticuerpos no-HLA. Entre ellos, destacan los anticuerpos anti-células endoteliales, los anticuerpos anti-receptor tipo 1 de la angiotensina II, los anticuerpos anti-receptor tipo A de la endotelina-1 o los anticuerpos anti-MICA. Aunque su relevancia clínica no se ha definido con exactitud se hipotetiza que estos anticuerpos junto con los anticuerpos anti-HLA clásicos ejercen un efecto sinérgico de daño sobre el aloinjerto. Así, mientras que los anticuerpos anti-HLA producen daño endotelial con la subsecuente exposición de autoantígenos, una respuesta inflamatoria inducida por anticuerpos no-HLA podría incrementar la expresión de moléculas HLA estimulando a su vez la respuesta aloimmune. Esta hipótesis es apoyada por varios estudios que muestran como aquellos pacientes con anticuerpos anti-HLA y anticuerpos no-HLA presentan peores tasas de supervivencia del aloinjerto en relación a los pacientes que sólo tienen un tipo de anticuerpos (45, 46).

3.6 RELEVANCIA DE LOS ANTICUERPOS anti-HLA PREFORMADOS

Los anticuerpos anti-HLA preformados representan, sin duda, una de las principales limitaciones en el trasplante de órganos sólidos. Su aparición es producto fundamentalmente de un proceso de alosensibilización previa que, de forma clásica, puede producirse a través de tres vías: i) trasplante previo, ii) el embarazo y iii) transfusiones sanguíneas, si bien, estos anticuerpos pueden aparecer espontáneamente mediante procesos de sensibilización cruzada durante el curso de una infección o por eventos proinflamatorios (47). Tras décadas de investigación, podemos afirmar que los anticuerpos anti-HLA preformados, y más concretamente aquellos dirigidos específicamente frente a los antígenos HLA del donante, en mayor o menor grado, juegan un papel crucial en todos los tipos de rechazo descritos. Así pues, los anticuerpos anti-HLA preformados son responsables del rechazo hiperagudo (40, 41), y



su presencia está fuertemente asociada al desarrollo de episodios de rechazo agudo a corto-medio plazo (48-50) o a la aparición de nefropatía crónica del trasplante (20). En este contexto, la caracterización de las especificidades de anticuerpos anti-HLA circulantes presentes en pacientes en lista de espera de trasplante de órgano sólido se ha convertido en una práctica clínica crucial, a fin de asegurar la correcta compatibilidad HLA entre donante y receptor evitando el daño que estos anticuerpos pudieran producir sobre el aloinjerto (51).

Las técnicas para determinar la presencia de aloanticuerpos séricos han evolucionado a largo del tiempo. Las primeras, introducidas a finales de los 60 por Patel y Terasaki, estaban basadas en la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Considerada como uno de los métodos de referencia para la detección de anticuerpos (Figura 6), los test basados en la CDC tiene un extraordinario valor en la predicción del rechazo temprano (41), siendo incluso hoy día recomendada su realización como prueba de compatibilidad previa al trasplante.

A modo de resumen, la prueba cruzada por CDC consiste en una primera incubación donde ponemos en contacto las células del donante (linfocitos T+B obtenidos de sangre periférica, ganglio, o bazo) con el suero del posible receptor candidato al trasplante, seguida de una segunda incubación con complemento purificado exógeno. Si hay anticuerpos en suero del receptor dirigidos frente a los antígenos leucocitarios (HLA) del donante (DSA), éstos se unirán específicamente a ellos. Esta unión antígeno-anticuerpo activará la vía clásica del complemento, produciendo la lisis celular por choque osmótico. Finalmente, las células son teñidas con el uso de colorantes vitales (naranja de acridina + bromuro de etidio), lo que facilita la interpretación de la prueba bajo un microscopio de fluorescencia, permitiéndonos estimar el porcentaje de muerte celular ocurrido. Un resultado positivo de la prueba cruzada (>20% de muerte) contraindica el trasplante, ya que evidencia la presencia en

el receptor de anticuerpos citotóxicos dirigidos específicamente frente a antígenos HLA del donante.

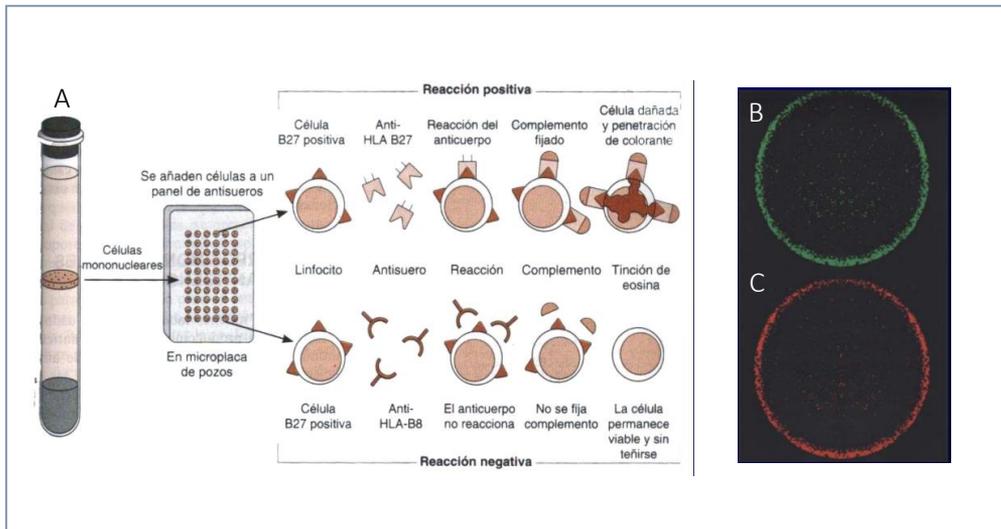


Figura 6. Prueba cruzada por citotoxicidad dependiente de complemento. Aislamiento de la fracción de células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de Ficoll, adición a placa de Terasaki junto con el suero de los receptores candidatos y una fuente de complemento exógeno e incubación (A). Resultado de una prueba cruzada negativa (B) y de una prueba cruzada positiva (C).

Por extensión, las pruebas de linfocitotoxicidad fueron ampliamente utilizadas convirtiéndose en la herramienta estándar para la detección de anticuerpos. De manera rutinaria, los laboratorios de histocompatibilidad cruzaban en placas de Terasaki el suero de pacientes en lista de espera de trasplante de órgano sólido con líneas celulares de tipaje HLA conocido, definiendo aquellas especificidades antigénicas para las cuales el resultado del test era positivo. Dichos antígenos HLA eran excluidos y descartaban a un paciente para el trasplante, siempre y cuando en la tipificación HLA del donante, previa al trasplante, esas especificidades antigénicas estuviesen presentes. Igualmente, mediante estas pruebas podemos determinar el panel de reactividad de anticuerpos (PRA), que no es sino una estimación del porcentaje de la población frente a la que el suero de un paciente es reactivo. El valor de PRA indica el grado de



sensibilización de un paciente e históricamente se ha usado como factor predictivo de rechazo, puesto que un PRA elevado suele estar asociado a un mayor riesgo de rechazo y pérdida temprana del injerto (52-54).

En la década de los 90 surgen los primeros test de detección de anticuerpos en fase sólida como el ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) que, al contrario que los ensayos celulares, usan moléculas HLA solubilizadas e inmovilizadas sobre una matriz sólida. El ELISA utiliza inmunoprecipitados de glicoproteínas HLA, a partir de líneas celulares transformadas con EBV, inmovilizadas en los pocillos de una microplaca. En este ensayo añadimos un suero problema sobre los diferentes pocillos de la microplaca, cada uno de los cuales representa un antígeno HLA concreto. Durante la incubación, los anticuerpos séricos presentes se fijarán únicamente sobre aquellos pocillos donde se hallen sus antígenos HLA diana inmovilizados. Después, incorporamos un anticuerpo anti-IgG marcado con una molécula reportera, como la fosfatasa alcalina, que se unirá al anticuerpo anti-HLA primario fijado sobre la placa. Finalmente, añadimos un sustrato que al ser desfosforilado por la enzima producirá un viraje de color fácilmente detectable en los pocillos donde la reacción sea positiva. El ELISA, al ser un método más sensible que la CDC para de detección de anticuerpos anti-HLA, fue ampliamente utilizado para determinar la pre- y post- sensibilización en el trasplante de órgano sólido. Con la introducción de la tecnología Luminex esta metodología cayó en desuso (55).

Desarrollada hace apenas 15 años (2003) la tecnología Luminex supuso una auténtica revolución en la histocompatibilidad del trasplante y pronto se consolidaría como método estándar para la detección de anticuerpos, dada su gran sensibilidad y reproducibilidad (55). Esta tecnología inmoviliza moléculas HLA purificadas a partir de líneas celulares linfoblásticas sobre microesferas de poliestireno (Figura 7). Una de las ventajas de esta tecnología es que en un sólo pocillo desarrollamos una reacción que nos permite caracterizar el panel de anticuerpos de un paciente. Para ello, cada



microesfera está marcada con una mezcla concreta de dos fluorocromos que al ser excitados por una luz laser a 630 nm en la plataforma Luminex emiten una señal de fluorescencia a 660 nm (rojo) y 730 nm (infrarrojo) respectivamente. Midiendo la composición de las intensidades de emisión para ambos canales, es posible identificar de forma simultánea hasta 100 esferas distintas combinadas con antígeno HLA único.

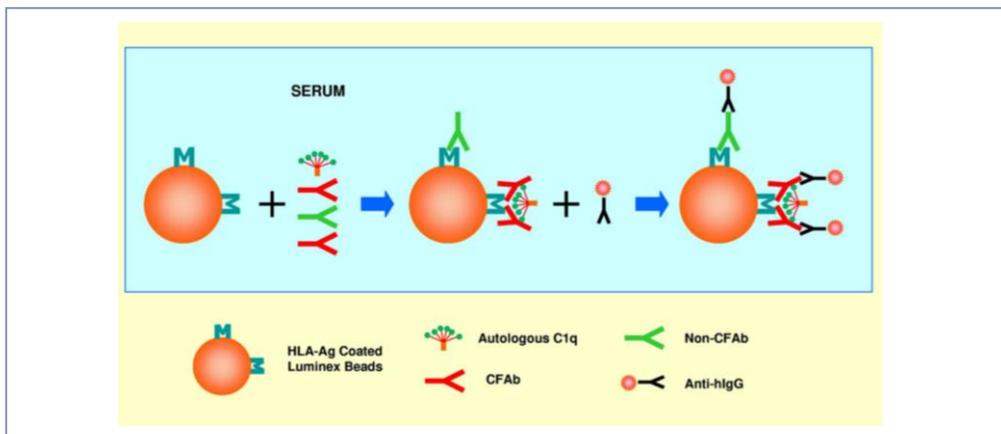


Figura 7. Esquema del funcionamiento de la tecnología Luminex para la detección de anticuerpos anti-HLA. Modificado a partir de Chen y cols. (56) Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol* 2011; 72: 849-858.

Luminex presenta fundamentalmente dos niveles de caracterización de los anticuerpos anti-HLA presentes en el suero (Figura 8). En el primer nivel, las bolas están conjugadas con una mezcla de moléculas HLA (Mixed), lo que se utiliza en el cribado inicial, es decir, en definir el estatus de anticuerpos (positivo o negativo) de un paciente. En el segundo nivel, aquellos sueros que han resultado positivos se incuban con un conjunto de bolas cada una de las cuales está conjugada con un único antígeno HLA de ahí el nombre de *single antigen bead* (SAB). Se estima que los antígenos HLA conjugados con las bolas Luminex, representan el 99,9% de los antígenos HLA presentes en la población.



Durante la incubación inicial, los diferentes anticuerpos séricos se irán uniendo a sus antígenos HLA diana presentes en cada una de las microesferas de forma específica. La detección de estos anticuerpos se consigue mediante una segunda incubación con un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo R-ficoeritrina (PE), dirigido específicamente frente a la fracción cristalizable (Fc) de la IgG humana. Finalmente, sobre las bolas dentro de la plataforma Luminex inciden dos láseres, uno rojo a 630 nm, que excita sus fluorocromos internos permitiendo la identificación de cada bola concreta con su antígeno HLA único asociado y otro verde a 532 nm, que excita la ficoeritrina del anticuerpo secundario el cual estará unido al primario en caso de que se haya producido reacción. A partir de esta señal de intensidad de fluorescencia media o MFI, que expresa de forma semi-cuantitativa la fuerza relativa de unión antígeno-anticuerpo, definimos las especificidades de anticuerpos presentes (57).

Análogamente al valor de PRA obtenido por CDC, a partir de los resultados del ensayo por SAB-panIgG es posible realizar una estimación virtual del porcentaje, relativo a una población aleatoria, frente a la que un suero problema resultaría positivo, atendiendo al número de especificidades de anticuerpos anti-HLA detectados y la frecuencia de dichos alelos en la población (calculated panel reactive antibody o cPRA) (58).

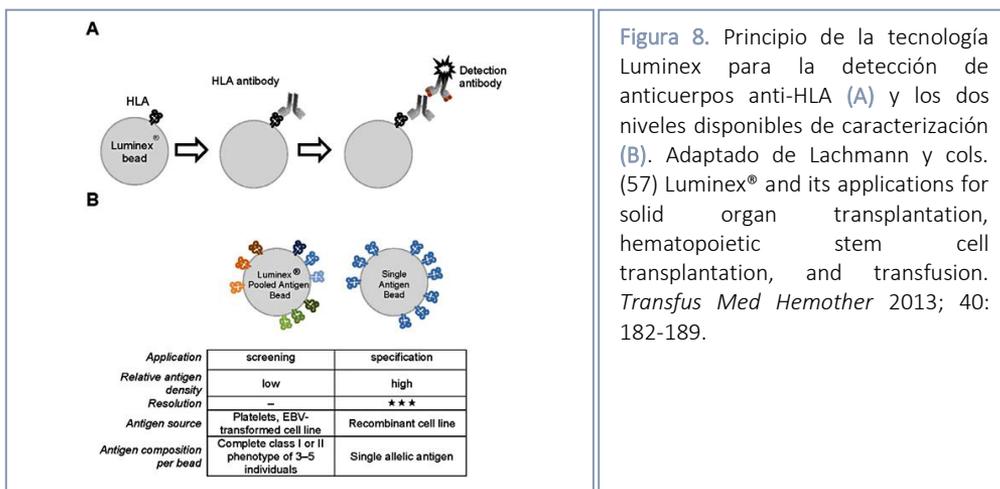


Figura 8. Principio de la tecnología Luminex para la detección de anticuerpos anti-HLA (A) y los dos niveles disponibles de caracterización (B). Adaptado de Lachmann y cols. (57) Luminex® and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfus Med Hemother* 2013; 40: 182-189.

Dada la sensibilidad del análisis SAB-panIgG para la detección de anticuerpos, la definición actual de los antígenos HLA inaceptables y la introducción de la prueba cruzada virtual (VXM) pre-trasplante, sin duda ha mejorado las perspectivas de éxito en el trasplante, al evitar el impacto que los anticuerpos preformados, desapercibidos bajo técnicas menos sensibles como la CDC, pudieran ejercer sobre el aloinjerto. Sin embargo, la alta sensibilidad del ensayo ha incrementado de forma alarmante el número de pacientes sensibilizados en lista de espera, dificultando la asignación de aloinjertos para este grupo de pacientes, que ven muy limitadas sus opciones de trasplante (59).

En este contexto, los protocolos de desensibilización surgieron como una opción para reducir los niveles de anticuerpos anti-HLA y aumentar las posibilidades de trasplante de aquellos pacientes sensibilizados mediante la inmunomodulación de la respuesta inmune (60). Estas estrategias varían desde el uso de plasmaféresis o IVIG hasta la administración de anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente frente a las células CD20⁺ o frente al factor C5 del complemento (61). A pesar de que la desensibilización puede posibilitar un éxito a corto plazo del trasplante HLA incompatible, la reducción de las altas tasas de rechazo temprano y la disminución prolongada del nivel de anticuerpos representan retos aún sin resolver (62). Así pues, muchos de los esfuerzos actuales se focalizan en entender la verdadera patogenicidad de los anticuerpos anti-HLA.

La relevancia clínica de los anticuerpos anti-HLA preformados identificados por los diversos métodos de detección de fase sólida disponibles, fundamentalmente el SAB-panIgG, bajo un contexto de prueba cruzada por CDC negativa, ha sido ampliamente debatida por la comunidad científica. Existen estudios publicados hasta la fecha que describen resultados contradictorios, de manera que ciertos grupos no han encontrado una correlación clara entre la pérdida del aloinjerto trasplantado y la presencia de DSA detectados por SAB-panIgG (63-65), mientras que otros demuestran



la existencia de una estrecha asociación entre la presencia de dichos anticuerpos, aun en un contexto de CDC negativo, y un incremento en el riesgo de rechazo así como una disminución en la tasa de supervivencia del aloinjerto (66-68).

Sabemos que la principal vía de daño mediada por anticuerpos se produce tras la interacción antígeno-anticuerpo y la activación de la vía clásica del complemento (69, 70). Dicha capacidad parece ser una propiedad fundamental del anticuerpo a la hora de definir su valor patológico (39). Desde esta perspectiva, aquellos anticuerpos con capacidad de activar la cascada del complemento, de entre todos los anticuerpos predefinidos por SAB-panIgG (71, 72) podrían ser los más relevantes desde un punto de vista clínico.

Recientemente, se ha introducido una modificación en la estandarizada técnica SAB-panIgG que nos permite detectar únicamente aquella fracción de anticuerpos anti-HLA capaces de activar la cascada del complemento (56). El ensayo SAB-C1q (Figura 9) consiste en incubar conjuntamente las bolas Luminex y un suero problema previamente descomplementado (56°C durante 30 min), con una fuente exógena de proteína C1q humana purificada. Tras la unión antígeno-anticuerpo, la proteína C1q se acoplará sobre las especificidades de anticuerpos anti-HLA potencialmente capaces de activar la vía del complemento. Finalmente, el resultado de la reacción es revelado gracias a una segunda incubación con un anticuerpo secundario, conjugado con PE, dirigido específicamente frente a la proteína C1q. Análogamente al ensayo estándar cada bola será excitada por 2 láseres y el conjunto de señales emitidas definirán tanto el número de bola como su valor de MFI mediante el cual podremos caracterizar aquellas especificidades, dentro del panel predefinido por SAB-panIgG, C1q reactivas.

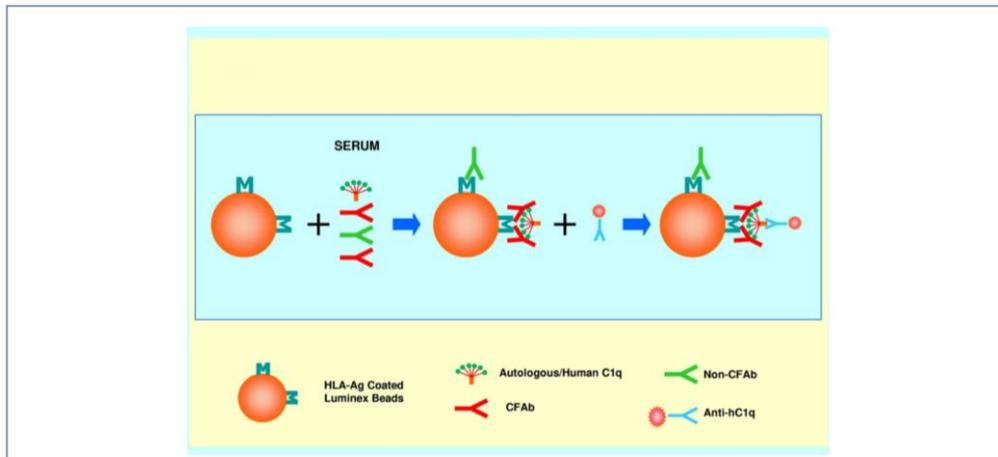


Figura 9. Esquema del funcionamiento del ensayo single antigen bead (SAB)-C1q para la detección de anticuerpos anti-HLA capaces de unir la fracción C1q del complemento. Modificado a partir de Chen y cols. (56) Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol* 2011; 72: 849-858.

Aunque la información concerniente a la utilidad clínica del ensayo SAB-C1q como método de detección de anticuerpos es bastante escasa aún, algunos estudios han mostrado la existencia de una fuerte correlación entre la presencia de DSA preformados fijadores de C1q y la ocurrencia de rechazo mediado por anticuerpos (AMR) con deposición de C4d y fallo prematuro del aloinjerto (73, 74). Estos hallazgos parecen apoyar el principio general de que los anticuerpos capaces de activar la cascada del complemento son los principales anticuerpos implicados en el rechazo y sugieren que el ensayo SAB-C1q podría constituir una valiosa herramienta para definir su valor patológico.

4. HIPÓTESIS



Múltiples evidencias indican que la activación del complemento es la principal vía de daño ejercida por los anticuerpos sobre el aloinjerto en los fenómenos de rechazo. Desde esta perspectiva, nuestra hipótesis plantea cómo el riesgo inmunológico de los anticuerpos anti-HLA preformados, predefinidos por SAB-panIgG, podría ser estratificado en función de su habilidad para activar la vía clásica del complemento, evaluada en base a su capacidad de fijar C1q, el primer componente de la cascada del complemento humano.

5. OBJETIVOS



Considerando estos antecedentes, el objetivo general de este trabajo de tesis doctoral fue *evaluar la utilidad clínica del ensayo SAB-C1q en la definición de grupos de anticuerpos anti-HLA con diferente riesgo inmunológico.*

De este objetivo general se desglosan los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Analizar la supervivencia del aloinjerto renal en la población a los 7 años post-trasplante según su estatus de anticuerpos anti-HLA previo al trasplante: i) presencia o ausencia de DSA y ii) capacidad de fijación de C1q del DSA.
- ✓ Determinar el impacto sobre la supervivencia del aloinjerto de la capacidad de fijar complemento de un anticuerpo, más allá de su valor de MFI.
- ✓ Evaluar la relación entre el valor MFI de los anticuerpos anti-HLA y su capacidad de fijación por C1q.
- ✓ Establecer un modelo predictivo de fallo de aloinjerto renal en base al estatus de anticuerpos anti-HLA previo al trasplante, ajustado por otras características clínicas e inmunológicas con demostrado valor predictivo.

Para ello, caracterizamos de manera retrospectiva, en una cohorte de pacientes trasplantados renales, la presencia de DSA preformados y su capacidad de fijar C1q.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 POBLACIÓN SELECCIONADA

En el presente estudio, incluimos un total de 389 pacientes trasplantados de riñón en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (España) entre los años 1995 y 2009 y cuyo suero previo al trasplante estuvo disponible para su análisis por plataforma Luminex. Todos los trasplantes se realizaron a partir de aloinjertos procedentes de donante-cadáver. Los pacientes incluidos se trasplantaron con grupo sanguíneo ABO compatible y todos presentaron una prueba cruzada CDC (linfocitos T+B) negativa previa al trasplante. Aquellos pacientes trasplantados de riñón combinado con otro órgano sólido (corazón, páncreas o hígado) fueron excluidos. El tiempo de seguimiento para todos los pacientes trasplantados fue de 7 años.

6.2 TERAPIA INMUNOSUPRESORA

El régimen inmunosupresor implementado a los 389 pacientes incluidos fue heterogéneo, algo lógico considerando el amplio periodo de tiempo que comprende el estudio. En cualquier caso y, a pesar de las variaciones en los protocolos de inmunosupresión, todos los pacientes recibieron triple terapia inmunosupresora de mantenimiento basada en la administración de un anti-calceurínico (ciclosporina o tacrolimus) combinado con un inhibidor de la síntesis de ADN (azatioprina o mofetil micofenolato) y bajas dosis de esteroides. Excepcionalmente, algunos pacientes incluidos se trataron con rapamicina, un inhibidor de la vía mTOR, combinada con tacrolimus y prednisona. A partir de 1998, aquellos pacientes considerados de alto riesgo inmunológico (pacientes con un panel de reactividad de anticuerpos o PRA superior al 80% y pacientes re-trasplantados con rechazo como causa subyacente al fallo del aloinjerto previo) fueron inducidos con timoglobulina (preparación de inmunoglobulinas anti-timocitos humanos derivados de anticuerpos policlonales purificados de ratón) durante los primeros 4-7 días. Los episodios de rechazo agudo fueron tratados con bolos de esteroides durante 3 días consecutivos. Rechazos cortico-

resistentes se trataron con OKT3 (anticuerpo monoclonal dirigido específicamente frente a la molécula CD3, proteína de membrana de los linfocitos T) o timoglobulina a partir del año 1998. No se llevaron a cabo protocolos de desensibilización en ninguno de los pacientes trasplantados incluidos.

6.3 TIPAJE HLA DEL DONANTE

Todos los donantes generados localmente fueron genotipados para los locus *HLA-A*, *-B*, *-DRB1*, y *-DRB3/4/5* por métodos moleculares basados en la amplificación del ADN en regiones diana específicas para cada locus HLA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de la hibridación de los productos amplificados con sondas oligonucleotídicas de secuencia específica (SSO) inmovilizadas sobre una membrana de nylon (Dynal Reli SSO Test. Invitrogen Corporation). En aquellos pacientes trasplantados donde objetivamos anticuerpos anti-*HLA-DQ* circulantes previos al trasplante, el locus *HLA-DQB1* de su donante respectivo, con muestra disponible, fue retrospectivamente tipificado por técnicas de biología molecular igualmente basadas en la técnica PCR-SSO (Innolipa *HLA-DQB1* typing kit; Innogenetics, Belgium).

6.4 DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DSA

Las muestras de suero neto previo al trasplante de los 389 pacientes incluidos, conservadas a -20°C en la seroteca de la UGC de Inmunología de Hospital Universitario Reina Sofía, se analizaron retrospectivamente mediante técnicas de fase sólida para la detección de anticuerpos anti-*HLA* circulantes (LABScreen Mixed I/II One Lambda Inc). Tras el cribado inicial, en aquellos pacientes que resultaron positivos para la presencia de anticuerpos anti-*HLA* séricos (normalized background (NGB) ratio $\geq 1,5$), determinamos cada una de las especificidades de anticuerpos anti-*HLA* presentes mediante el uso microesferas de poliestireno conjugadas con moléculas de antígeno

HLA único (LABScreen single antigen beads (SAB), One Lambda Inc). Las muestras se analizaron en una plataforma Luminex (LABScan 100) usando Luminex 100 IS versión 2.3 como software de adquisición de datos. Los valores de MFI obtenidos para cada bola se analizaron y validaron por medio del programa Fusion versión 3.0 (One Lambda Inc).

Una vez definidas todas las especificidades de anticuerpos anti-HLA circulantes para cada receptor, realizamos una VXM usando la información del tipaje HLA de los donantes, registrada en la base de datos del Hospital Universitario Reina Sofía. La VXM fue considerada positiva cuando detectamos la presencia de un anticuerpo en el suero del receptor dirigido específicamente frente a una molécula HLA-A, -B, -DRB1 o -DQB1 presente en el donante. Estos anticuerpos fueron definidos como anticuerpos específicos de donante o DSA. Dado que no realizamos la tipificación HLA de los locus *HLA-Cw* y *HLA-DPB1*, el impacto de la presencia de anticuerpos anti-HLA-Cw y anti-HLA-DPB1 sobre el aloinjerto no fue considerado en el presente estudio. Finalmente, analizamos el suero de aquellos pacientes con VXM positiva para determinar la fracción de anticuerpos capaces de fijar el primer componente del complemento humano, utilizando el ensayo SAB-C1q (SAB-C1q, One Lambda, Inc). Aquellos anticuerpos positivos detectados por este último el test y dirigidos específicamente frente a las moléculas de antígeno HLA presentes en el aloinjerto, se consideraron DSA fijadores de C1q.

Para el ensayo SAB-panIgG establecimos como punto de corte para considerar un anticuerpo positivo, frente a una especificidad de antígeno HLA concreta, un valor de MFI de 1.000. De igual modo, para categorizar los anticuerpos detectados en función de su fuerza optamos por un valor de MFI de 10.000. Así, los anticuerpos anti-HLA que presentaron un valor de MFI igual o mayor que 10.000 en el test SAB-panIgG se consideraron anticuerpos con alto valor de MFI o anticuerpos fuertes. Para el ensayo

SAB-C1q establecimos un valor de $MFI \geq 500$ como punto de corte para considerar una reacción positiva.

Tanto el ensayo SAB-panIgG como el SAB-C1q se realizaron siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante, introduciendo pequeñas modificaciones previamente validadas por la sección de Histocompatibilidad de la UGC de Inmunología del Hospital Universitario Reina Sofía. Todos los ensayos se realizaron utilizando un único lote de reactivos. El protocolo seguido para la realización de ambos ensayos puede consultarse en los Anexos del presente proyecto de tesis doctoral. La metodología del estudio queda ilustrada en la Figura 10.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para describir las características demográficas de los pacientes se utilizaron las medias y las desviaciones estándar (DE) en el caso de variables cuantitativas continuas, y el número y porcentaje en el caso de las variables cuantitativas discretas. La comparación de datos cuantitativos paramétricos, es decir, ajustados a una distribución normal, se realizó utilizando el test T de Student. Las variables cuantitativas no paramétricas se compararon utilizando el test U de Mann-Whitney. Para la comparación de variables cualitativas se utilizó el test Chi-cuadrado o el estadístico F de Fisher. El test de Kolmogorov-Smirnov fue utilizado como prueba de normalidad de las variables. La asociación entre variables cuantitativas se estableció mediante el test de correlación de Pearson.

Representamos la supervivencia del aloinjerto renal, de los diferentes grupos en los que estratificamos la población en función de su estatus de anticuerpos previo al trasplante, mediante curvas Kaplan-Meier. Consideramos la pérdida del aloinjerto, definido como retorno a diálisis, como evento de interés. Los datos de pacientes fallecidos con aloinjerto funcionando fueron censurados. Utilizamos el test log-rank para



comparar la supervivencia del aloinjerto de los diferentes grupos en los que estratificamos la población.

Empleamos un modelo de regresión de Cox para estudiar el índice de riesgo o *hazard ratio* (HR) de pérdida del aloinjerto renal para las diferentes características clínicas e inmunológicas analizadas. Aquellas variables predictivas en el análisis de Cox univariante fueron introducidas en un modelo multivariante mediante el método *forward conditional*. Realizamos tests de colinealidad para asegurar la independencia de las variables predictoras y confundentes. Exploramos el valor predictivo de los diferentes modelos obtenidos mediante curvas ROC (*receiver operating characteristic*).

Los valores de p inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

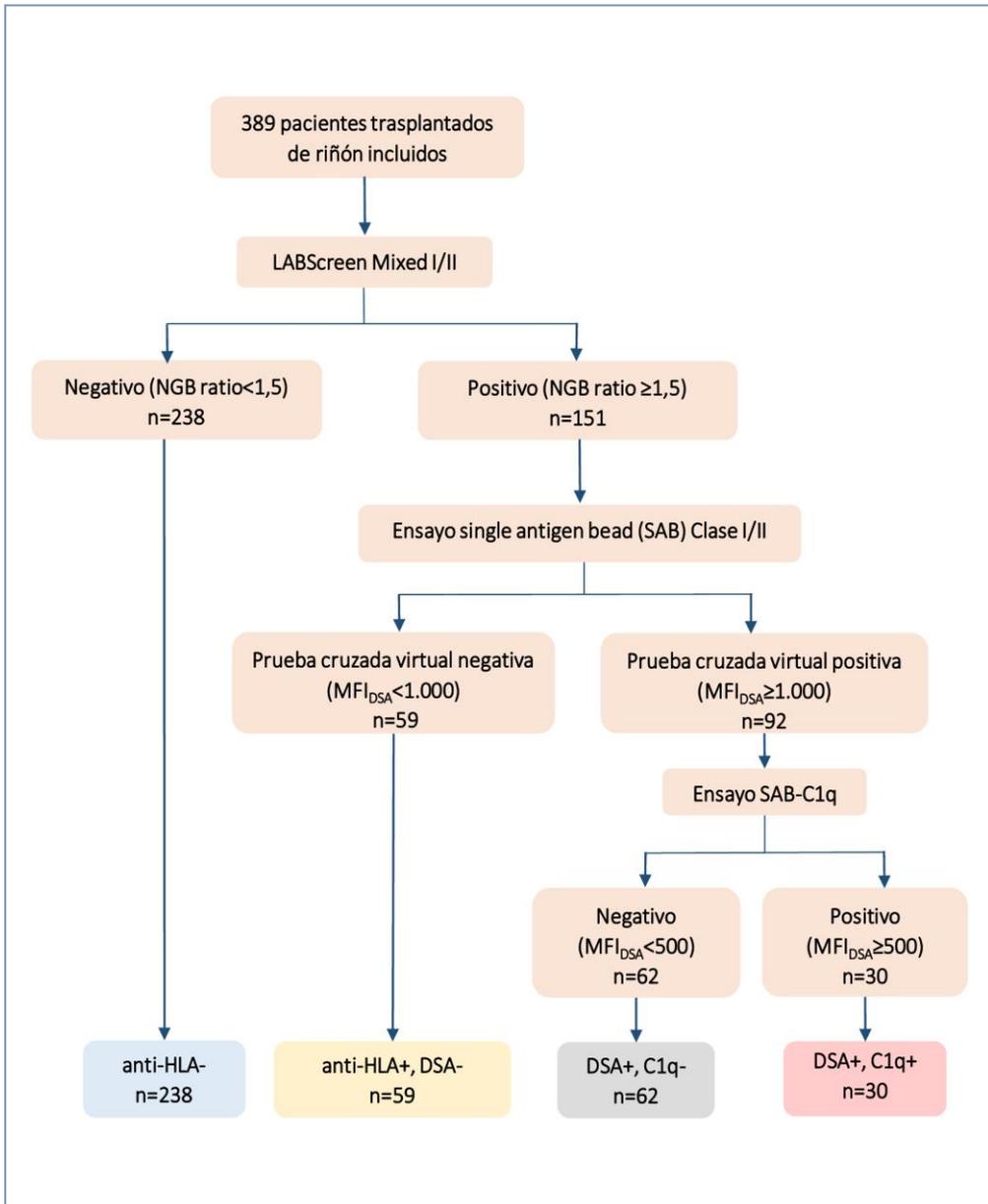


Figura 10. Esquema resumen de la metodología seguida en el estudio. Las muestras de suero fueron analizadas de forma retrospectiva usando el test de cribado Luminex Mixed I/II. Cuando la ratio de fondo normalizada o normalized background ratio (NGB) fue mayor que 1,5, las muestras de suero fueron entonces analizadas mediante el test single antigen bead (SAB)-panIgG. A continuación, se llevó a cabo una prueba cruzada virtual a partir del tipaje HLA del donante. Finalmente, cuando la prueba cruzada virtual fue positiva, las muestras de suero se analizaron mediante el ensayo SAB-C1q.

7. RESULTADOS

Como se ha expuesto con anterioridad, en este trabajo de tesis doctoral, evaluamos de forma retrospectiva el impacto que, sobre la supervivencia del aloinjerto renal, ejerce la capacidad de activar la vía del complemento de aquellos DSA circulantes previos al trasplante.

7.1 ANTICUERPOS anti-HLA EN LA POBLACIÓN SELECCIONADA

Del total de 389 sueros pre-trasplante disponibles, pertenecientes a la cohorte de pacientes trasplantados de riñón entre los años 1995-2009 en el Hospital Universitario Reina Sofía, tras el cribado inicial, 151 (38,8%) resultaron positivos para la presencia de anticuerpos anti-HLA, no detectándose anticuerpos en los restantes 238 (61,2%) sueros analizados. Estos 238 pacientes sin anticuerpos anti-HLA en el momento del trasplante se englobaron dentro de la categoría *anti-HLA-* (Figura 10). Una vez que estratificamos la población en función de la presencia o ausencia de anticuerpos anti-HLA circulantes determinamos, en aquellos pacientes seropositivos para la presencia de anticuerpos (n=151), cada una de las especificidades antigénicas (antígenos HLA) frente a las que dichos anticuerpos estuvieron dirigidos. Seguidamente, cruzamos los datos de las especificidades de anticuerpos anti-HLA identificadas en cada receptor con el tipaje HLA de su donante correspondiente. De los 151 pacientes con anticuerpos anti-HLA preformados analizados, 57 presentaron una VXM negativa mientras que, en 92 de ellos, el resultado de la prueba virtual fue positivo. Dicha positividad fue debida a la presencia en el receptor de anticuerpos anti-HLA circulantes (detectados por el ensayo SAB-panIgG) dirigidos específicamente frente a, al menos, un antígeno HLA presente en el aloinjerto renal (Clase I y/o Clase II). Estos 92 pacientes constituyeron el grupo de estudio caracterizado por la presencia de DSA previos al trasplante (DSA+), que representó el 27,3% del total de la cohorte de pacientes trasplantados.

Dado el consenso establecido sobre el hecho de que el riesgo de rechazo humoral en aquellos pacientes con anticuerpos anti-HLA no específicos de donante es

prácticamente equivalente al de aquellos pacientes sin anticuerpos circulantes, los 238 pacientes sin anticuerpos anti-HLA (*anti-HLA-*) y los 57 pacientes con anticuerpos anti-HLA no específicos de donante (*anti-HLA+*, *DSA-*) se agruparon bajo una misma categoría (*DSA-*). Dichos pacientes (n=287), caracterizados por presentar una prueba cruzada virtual negativa previa al trasplante, representaron el 62,7% de nuestra cohorte de estudio.

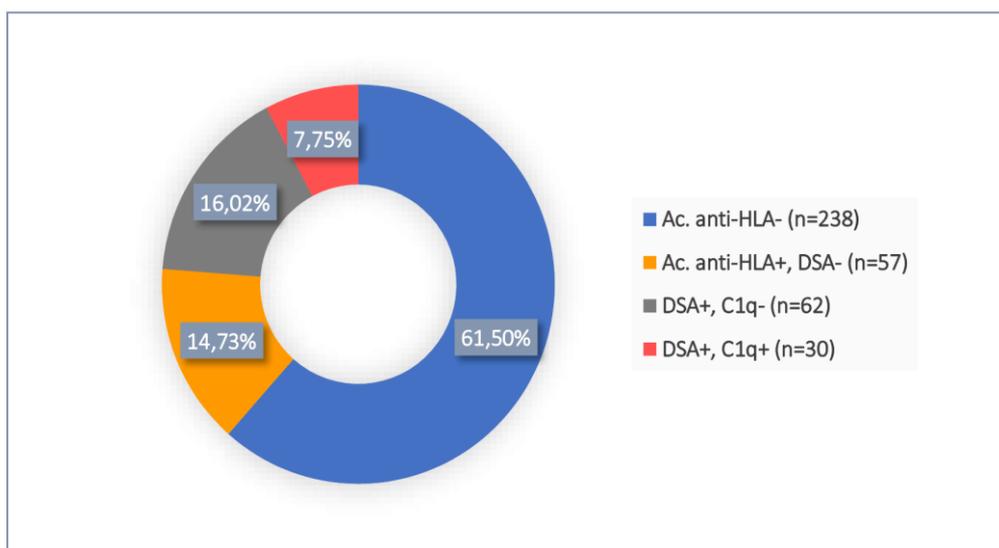


Figura 11. Estratificación de la cohorte de estudio (n=389). Los pacientes incluidos en el estudio fueron categorizados en función de la presencia o ausencia de anticuerpos anti-HLA en el momento del trasplante y su capacidad de fijar C1q.

Además de la estratificación clásica para establecer el riesgo inmunológico de un paciente sometido a un proceso de trasplante, basada en la presencia o ausencia de DSA previos, en el presente trabajo caracterizamos la población con DSA en función de su potencial capacidad para activar la cascada del complemento. El análisis SAB-C1q resultó negativo para 62 (67,4%) de los 92 pacientes con DSA preformado analizados. Dichos pacientes, caracterizados por la incapacidad de su DSA para fijar la molécula C1q, conformaron el subgrupo de pacientes *DSA+*, *C1q-*. Por último, en 30 (32,6%) de los 92 pacientes *DSA+*, al menos uno de los de DSA evaluados resultó positivo en el test

C1q (DSA+, C1q+). En la Figura 11 representamos porcentualmente los diferentes grupos en los que categorizamos los 389 pacientes incluidos, en función de su estatus de anticuerpos anti-HLA previo al trasplante.

7.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E INMUNOLÓGICAS DE LOS PACIENTES TRASPLANTADOS

En la Tabla 3 mostramos las características clínicas e inmunológicas más representativas de cada uno de los subgrupos en los que estratificamos la población según su estatus de anticuerpos anti-HLA previo al trasplante. Como era de esperar, cuando analizamos las vías clásicas de sensibilización frente a moléculas HLA, vimos que en el grupo pacientes con DSA (DSA+) el porcentaje de mujeres (58,7% vs. 29,3%; $p < 0,001$), de pacientes con antecedente de trasplante previo (41,3% vs. 6,4%; $p < 0,001$), y de pacientes poli-trasfundidos (71,7% vs. 38,7%; $p < 0,001$) fue significativamente mayor que en el grupo de pacientes sin DSA (DSA-). Precisamente relacionado con este mayor riesgo de sensibilización frente a moléculas HLA, el grupo DSA+ presentó en el momento del trasplante un valor de PRA, determinado mediante el test CDC, significativamente más alto ($21,7 \pm 30,5$ vs. $2,2 \pm 9,6$; $p < 0,001$). Por último, mientras en el grupo de pacientes DSA+ el tiempo medio de permanencia en lista de espera hasta recibir un injerto fue de 8 años, el tiempo medio en lista de espera del grupo de pacientes DSA- fue de apenas 3,8 años ($p < 0,001$). Este último hecho estuvo probablemente asociado a la mayor dificultad que supone encontrar un donante idóneo para aquellos pacientes sensibilizados frente a múltiples especificidades HLA. Como puede verse en la Tabla 3, no encontramos diferencias significativas entre los diferentes grupos en los que categorizamos la población para el resto de las características clínicas e inmunológicas analizadas, destacando entre ellas, por su especial relevancia como factores predictivos de la supervivencia del aloinjerto, la edad del donante ($p = 0,084$), el tiempo de isquemia fría ($p = 0,927$) y el número de incompatibilidades HLA ($p = 0,474$).



Dado nuestro especial interés en determinar la influencia de la capacidad de fijar complemento como factor predictivo de la supervivencia del aloinjerto, también llevamos a cabo un análisis exhaustivo de las características clínicas e inmunológicas presentes en cada uno de los subgrupos en los que dividimos la población DSA+ de acuerdo precisamente a su habilidad para fijar el primer componente de la cascada del complemento (C1q). Del análisis realizado encontramos como único hallazgo destacable una mayor proporción de pacientes con antecedente de trasplante previo en el grupo DSA+, C1q+ (56,7% vs. 33,9%; $p=0,037$). De igual modo y relacionado probablemente con el hecho de que el trasplante previo es la principal vía de sensibilización frente a moléculas HLA (75), los pacientes cuyo DSA fue además C1q+ presentaron un mayor PRA calculado por CDC al tiempo del trasplante ($36,3\pm 36,9$ vs. $14,5\pm 24,2$; $p=0,005$), así como un mayor cPRA, calculado retrospectivamente con los datos derivados del análisis de anticuerpos mediante el ensayo SAB-panIgG ($97,7\pm 3,3$ vs. $81,1\pm 26,4$; $p<0,001$). Para el resto de las características clínicas e inmunológicas evaluadas, no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos.



Tabla 3. Características clínicas e inmunológicas de los diferentes grupos de los 389 pacientes trasplantados renales en función de su estatus de anticuerpos anti-HLA previo al trasplante.

	Estatus de ac. anti-HLA						p
	DSA -			DSA +			
	Anti-HLA- (n=238)	Anti-HLA, DSA - (n=59)	Cohorte total n=297	DSA+, C1q- (n=62)	DSA+, C1q+ (n=30)	Cohorte total n=92	
Donantes							
Edad, media (DE) ^c	50,6 (17,1)	45,9 (17,3)	49,7 (17,2)	44,3 (17,9)	49,7 (20,2)	46,1 (18,8)	0,084
Tiempo de isquemia fría (horas), media (DE)	17,8 (7,2)	17,2 (7,3)	17,7 (7,2)	17,2 (7,7)	18,9 (7,0)	17,8 (7,5)	0,927
Receptores							
Edad, media (DE)	49,1 (13,7)	47,1 (12,6)	48,7 (13,5)	45,6 (13,3)	48,8 (15,3)	46,7 (14,0)	0,219
Sexo femenino, n (%)	67 (28,2)	20 (33,9)	87 (29,3)	35 (56,5)	19 (63,3)	54 (58,7)	<0,001
Pacientes re-trasplantados, n (%)	8 (3,4)	11 (18,6)	19 (6,4)	21 (33,9)	17 (56,7)	38 (41,3)	<0,001
Pacientes politrasfundidos, n (%)	82 (34,4)	34 (57,6)	115 (38,7)	46 (74,2)	20 (66,7)	66 (71,7)	<0,001
Tiempo en lista de espera (años), media (DE)	3,3 (3,6)	5,6 (4,7)	3,8 (4,0)	8,5 (7,0)	7,0 (5,3)	8,0 (6,5)	<0,001
Incompatibilidades: HLA-A, -B, -DR, media (DE)	3,2 (1,3)	2,9 (1,0)	3,2 (1,2)	3,1 (1,1)	3,6 (1,1)	3,2 (1,1)	0,474
Anticalcineurínicos							0,869
Tacrolimus	132 (55,5)	32 (54,2)	164 (55,2)	34 (54,8)	17 (56,7)	51 (55,4)	
Ciclosporina	106 (44,5)	27 (45,8)	133 (44,8)	28 (45,2)	13 (43,3)	41 (44,6)	
Triple terapia inmunosupresora de mantenimiento ^d							0,979
A, n (%)	164 (68,9)	36 (61,0)	200 (67,3)	42 (67,7)	21 (70,0)	63 (68,5)	
B, n (%)	59 (24,8)	21 (35,6)	80 (26,9)	17 (27,4)	7 (23,3)	24 (26,1)	
C, n (%)	15 (6,3)	2 (3,4)	17 (5,7)	3 (4,8)	2 (6,7)	5 (5,4)	
Ac. anti-HLA pre-trasplante							^e n/c
Anticuerpos negativos, n (%)	238		238 (80,1)				
Clase I, n (%)	-	42 (71,2)	42 (14,1)	24 (38,7)	3 (10,0)	27 (29,3)	
Clase II, n (%)	-	3 (5,1)	3 (1,0)	12 (19,4)	3 (10,0)	15 (16,3)	
Clase I & II, n (%)	-	14 (23,7)	14 (4,7)	26 (41,9)	24 (80,0)	50 (54,3)	
^f PRA pre-trasplante por CDC, media (DE)	-	5,5 (13,4)	2,2 (9,6)	14,5 (24,2)	36,3 (36,9)	21,7 (30,5)	<0,001
^g cPRA pre-trasplante, media (DE)	-	39,4 (31,3)	7,8 (21,0)	81,1 (26,4)	97,7 (3,3)	86,5 (23,1)	<0,001
DSA preformado							0,253
Clase I, n (%)	-	-	-	42 (67,7)	16 (63,0)		
Clase II, n (%)	-	-	-	18 (29,0)	11 (31,5)		
Clase I & II, n (%)	-	-	-	2 (3,3)	3 (5,4)		

^aValor de p calculado para la comparación de las diferentes variables entre los subgrupos de pacientes DSA- (n=297) y DSA+ (n=92)

^bValor de p calculado para la comparación de variables entre los subgrupos de pacientes DSA+, C1q- (n=62) y DSA+, C1q+ (n=30)

^cDE significa desviación estándar

^dTriple terapia inmunosupresora consistente en: anti-calcineurínico + corticoides (A), anti-calcineurínico + azatioprina + inhibidor mTor + corticoides (C)

^eCaracterísticas no comparadas

^fValor de PRA (panel de reactividad de anticuerpos) por linfocitotoxicidad dependiente de complemento (CDC) en el momento del trasplante.

^gValor de cPRA (panel de reactividad de anticuerpos calculado) en el momento del trasplante, calculado retrospectivamente de acuerdo a los antígenos excluidos en base al análisis de especificidades de anticuerpos por el ensayo single antigen beads (SAB). Para su cálculo utilizamos la base de datos perteneciente a la red americana del trasplante de órganos Organ Procurement Transplantation Network (OPTN).

7.3 SUPERVIVENCIA DEL ALOINJERTO RENAL

En la Figura 12 representamos las curvas Kaplan-Meier resultantes del análisis de supervivencia del aloinjerto renal durante los 7 años de seguimiento de los 389 pacientes trasplantados incluidos y estratificados en función tanto de la presencia o ausencia de DSA en el momento del trasplante (Figura 12.A) como de la habilidad del DSA para fijar C1q (Figura 12.B).

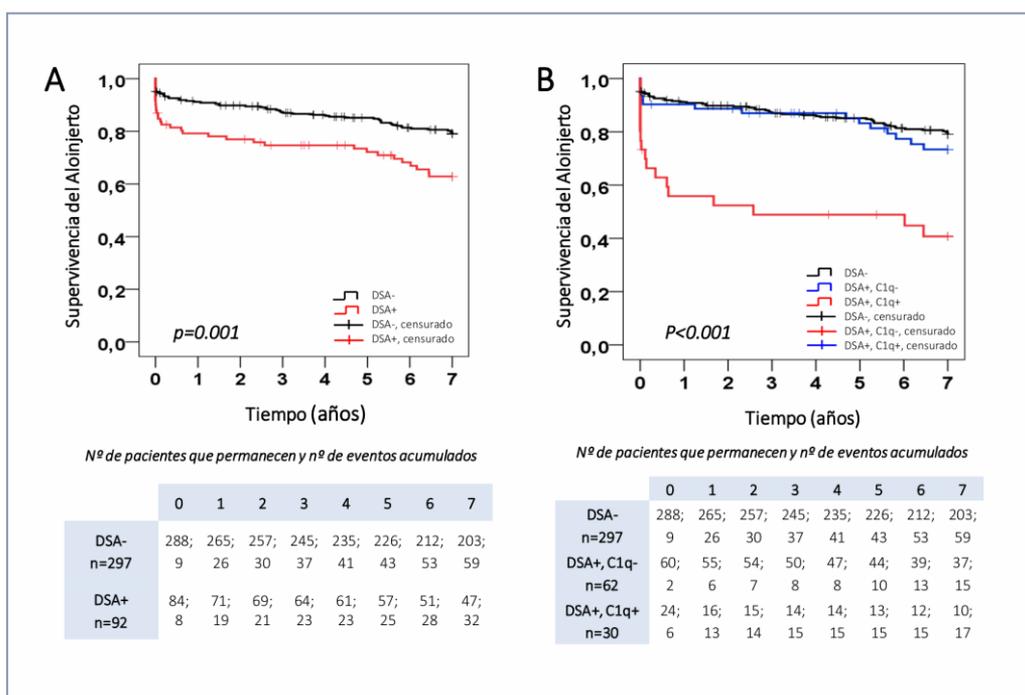


Figura 12. Curvas Kaplan-Meier para la supervivencia del aloinjerto renal hasta 7 años de los 389 pacientes que componen la cohorte de estudio según su estatus de anticuerpos anti-HLA específicos de donante (DSA). Los pacientes fueron categorizados según la presencia o ausencia de DSA en el momento del trasplante (A) y su capacidad para fijar C1q (B). Las curvas se compararon usando el test log-rank.

Como mostramos en la Figura 12.A, el porcentaje de pacientes DSA+ que mantienen el aloinjerto funcional a los 7 años es significativamente inferior al porcentaje de pacientes DSA- que mantienen la función del mismo (62,9% vs. 79,1%;

$p=0,001$), situándose las medias de supervivencia del aloinjerto de pacientes DSA+ y DSA- en los $5,189\pm 0,297$ años y $6,078\pm 0,125$ años respectivamente. Nuestros resultados indican que la probabilidad de fallo renal prematuro es mayor cuando el paciente presenta DSA circulante previo al trasplante.

No obstante, cuando estratificamos la población DSA+ en función de su capacidad para unir el complejo C1q, únicamente aquellos pacientes cuyo DSA fue además capaz de fijar C1q mostraron una tasa de supervivencia significativamente menor a la del resto de subgrupos analizados (Figura 12.B). Concretamente, mientras el 40,7% de los pacientes que presentaron DSA+, C1q+ previo al trasplante mantuvieron su aloinjerto funcional al final del periodo de seguimiento, éste se mantuvo funcional en el 73,4% de los pacientes con DSA+, C1q- ($p=0,001$) y en el 79,1% de los pacientes sin DSA preformado ($p<0,001$). Nuestros resultados indican que prácticamente 6 de cada 10 pacientes trasplantados con DSA fijadores de C1q pierden el aloinjerto antes de los 7 años, siendo la supervivencia media del grupo inferior a 4 años ($3,574\pm 0,606$). El tiempo medio de supervivencia del aloinjerto tanto en los pacientes con DSA+, C1q- como los pacientes DSA- fue de $5,959\pm 0,282$ y $6,078\pm 0,125$ años respectivamente. Curiosamente, cuando comparamos la tasa de supervivencia del aloinjerto entre la población sin DSA previo al trasplante y la población con DSA+, C1q-, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (79,1% vs. 73,4%; $p=0,403$).

Dado que en la mayoría de los centros de trasplante la metodología más común para estratificar el riesgo de rechazo en un paciente con DSA preformado se basa en el valor de MFI obtenido para dicho DSA, llevamos a cabo un análisis de la supervivencia considerando, no sólo la capacidad de fijar complemento, sino también la medida de MFI del anticuerpo detectado, a fin de discernir el impacto real de la habilidad de fijar complemento del DSA más allá de su valor de MFI. Como apunte previo diremos que la capacidad de estratificación del riesgo de rechazo basada en el valor de MFI del

anticuerpo en el análisis SAB se basa en la presunción de que dicho valor es una medida proporcional a su concentración y que, por tanto, *a priori*, aquellos anticuerpos con valores de MFI elevados deben encontrarse en el suero a una mayor concentración que los anticuerpos con valores bajos de MFI.

Así pues y, aunque esta supuesta relación entre concentración y valor de MFI será discutida más adelante, llevamos a cabo nuestro análisis categorizando, en primer lugar los 92 pacientes con DSA preformados en función de su valor de MFI. El punto de corte de MFI establecido para nuestro análisis fue de 10.000, dado que, en la mayor parte de la literatura, este valor suele utilizarse para clasificar los anticuerpos detectados como anticuerpos de fuerza alta o fuertes (≥ 10.000 MFI).

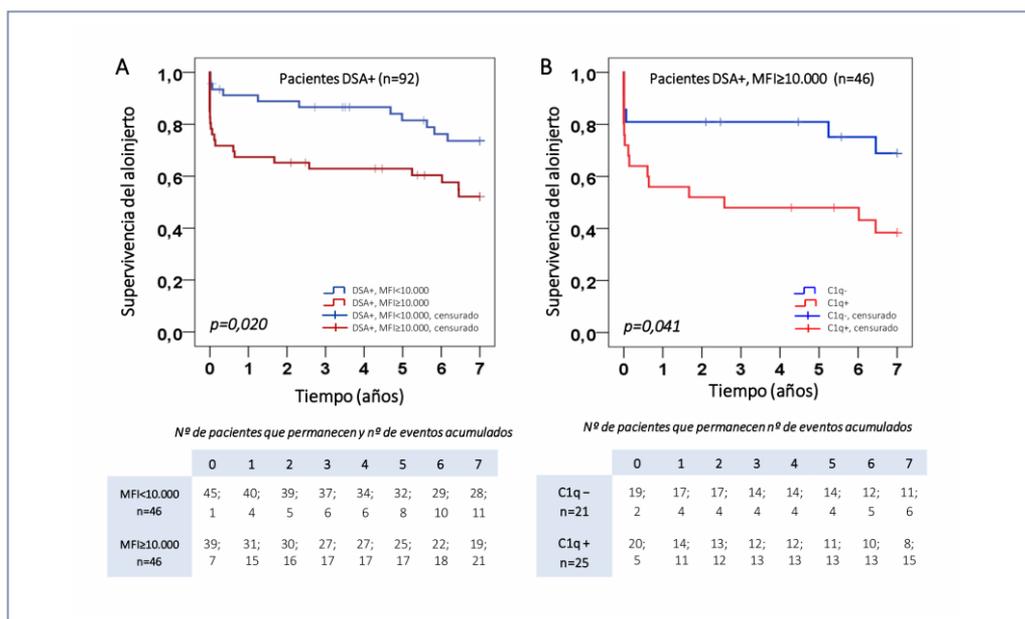
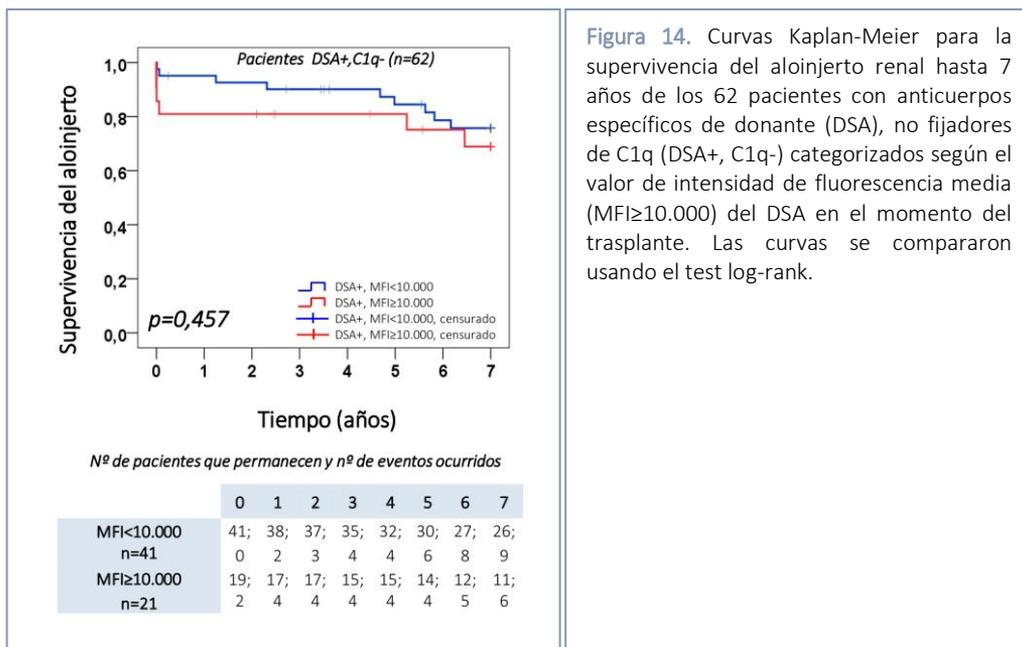


Figura 13. Curvas Kaplan-Meier para la supervivencia del aloinjerto renal hasta 7 años de los 92 pacientes con anticuerpos específicos de donante (DSA), categorizados según la presencia o ausencia de DSA de alto valor de intensidad de fluorescencia media (MFI ≥ 10.000) en el momento del trasplante (A) y tras la estratificación del grupo con DSA de alto valor de MFI (n=46) según su capacidad para fijar C1q (B). Las curvas se compararon usando el test log-rank.

La Figura 13.A muestra las curvas de supervivencia Kaplan-Meier de la población trasplantada y estratificada en función del valor MFI de su DSA en el momento del trasplante. De acuerdo a lo esperado, aquellos pacientes cuyo DSA mostraba un valor de MFI elevado (≥ 10.000 ; $n=46$) presentaron una tasa de supervivencia inferior a la de aquellos pacientes con un bajo valor de MFI en su DSA (< 10.000 ; $n=46$) al momento del trasplante (52,1% vs. 73,7%; $p=0,020$). Sin embargo, nuestros resultados muestran que, cuando los 46 pacientes con DSA de alta fuerza ($MFI > 10.000$) son categorizados en función de su capacidad para unir C1q (Figura 13.B), la tasa de supervivencia del aloinjerto es significativamente menor en aquellos pacientes cuyo DSA es además fijador de C1q (38,4% vs. 68,9%; $p=0,041$). Asimismo, al comparar la supervivencia de la población C1q- estratificada en función de su valor de MFI (Figura 14), encontramos que la tasa de supervivencia entre ambos grupos fue similar ($p=0,457$).



Por último, evaluamos la supervivencia del aloinjerto según el tipo de molécula HLA frente a la cual el DSA+, C1q+ estuvo dirigido (Figura 15). Analizando los 30 pacientes con DSA+, C1q+ (Figura 15.A) circulantes en el momento del trasplante, no encontramos diferencias en la supervivencia del aloinjerto en función de si el DSA estuvo dirigido frente a moléculas HLA de Clase I, Clase II, o a ambos tipos de molécula ($p=0,862$). Del mismo modo, cuando comparamos la supervivencia en la población con DSA de MFI de alta fuerza ($\geq 10,000$) y capaz de unir C1q (C1q+) (Figura 15.B), atendiendo a esta característica, nuestros resultados muestran igualmente una supervivencia similar entre los diferentes grupos analizados ($p=0,988$).

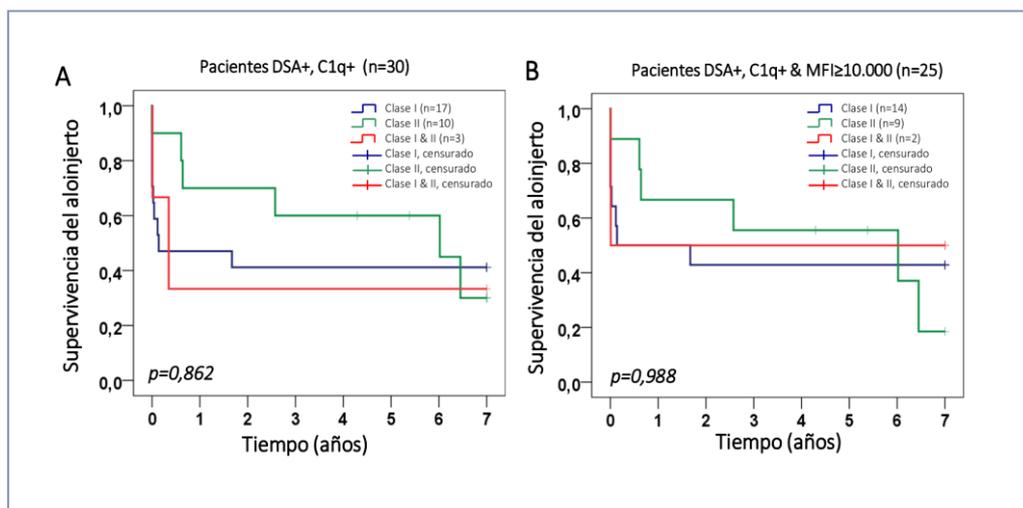


Figura 15. Curvas Kaplan-Meier para la supervivencia del aloinjerto renal hasta 7 años de los 30 pacientes con DSA fijadores de C1q (A) y de los 25 pacientes con DSA fijadores de C1q y valor de MFI elevado (B) estratificados según el tipo de molécula HLA (Clase I y/o Clase II) frente a la que los anticuerpos anti-HLA específicos de donante (DSA) fijadores de C1q estaban dirigidos. Las curvas se compararon usando el test log-rank.

7.4 RIESGO DE PÉRDIDA DEL INJERTO

Como análisis exploratorio previo para determinar el riesgo de pérdida del aloinjerto renal, evaluamos de forma independiente la asociación de múltiples factores clínicos e inmunológicos con la pérdida del injerto. Realizamos un análisis por regresión

de Cox (Tabla 4) y establecimos el riesgo (HR) de pérdida prematura para cada factor analizado de forma independiente.

Tabla 4. Factores de riesgo clínicos e inmunológicos previos al trasplante asociados a pérdida prematura del aloinjerto. Análisis de Cox (univariante).

Factor	Nº de pacientes	Hazard ratio (HR)	^a IC 95%	p
Edad Donante (por cada año de incremento)	389	1,016	1,003-1,030	0,015
Tiempo de isquemia fría (por cada hora de incremento)	389	1,055	1,028-1,082	<0,001
Edad del Receptor (por cada año de incremento)	389	0,993	0,978-1,008	0,349
Sexo Femenino				
No	248	1,00		
Sí	141	1,475	0,975-2,232	0,066
Re-trasplante				
No	332	1,00		
Sí	57	2,259	1,407-3,626	0,001
Tiempo en lista de espera (por cada año de incremento)	389	1,025	0,987-1,064	0,200
Incompatibilidades HLA-A, -B (por cada incompatibilidad de incremento)	389	1,143	0,927-1,409	0,211
Incompatibilidades HLA-DR ≥ 1				
No	119	1,00		
Sí	270	1,929	1,152-3,232	0,013
Anti-calcineurínico				
Tacrolimus	215	1,00		
Ciclosporina	174	0,962	0,636-1,456	0,856
Triple terapia inmunosupresora^b				0,219
Inhibidor de calcineurina+ MMF + Pred	263	1,00		--
Inhibidor de calcineurina + Aza + Pred	104	1,133	0,720-1,785	0,589
Inhibidor de calcineurina + Rapamicina + Pred	22	0,759	0,276-2,088	0,593
Terapia de inducción^c				
No	347	1,00		
Sí	42	1,580	0,878-2,843	0,127
cPRA^d	389	1,010	1,005-1,015	<0,001
Presencia de DSA				
No	297	1,00		
Sí	92	2,009	1,306-3,091	0,002
Presencia de DSA y habilidad de fijar C1q				
DSA -	297	1,00	--	--
DSA+, C1q-	62	1,270	0,720-2,238	0,409
DSA+, C1q+	30	4,160	2,420-7,151	<0,001

^aIC denota intervalo de confianza

^bMMF denota mofetil micofenolato, Pred denota prednisona y Aza denota azatioprina

^cEl tratamiento de inducción consistió en la administración de timoglobulina

^dValor de cPRA en el momento del trasplante. Dicho valor fue retrospectivamente calculado de acuerdo a las especificidades de antígenos no permitidas en base al análisis de anticuerpos por SAB-Luminex. Para el cálculo del valor de cPRA usamos la calculadora de cPRA de la OPTN.

Como mostramos en la Tabla 4, los factores previos al trasplante que estuvieron significativamente asociados a un incremento del riesgo de pérdida prematura del injerto fueron la edad del donante, el tiempo de isquemia fría, el número de incompatibilidades donante-receptor en HLA-DR, el antecedente de trasplante previo, el valor de PRA y la presencia de DSA preformado. Una vez tuvimos identificados los diferentes factores predictivos, el análisis de Cox (usando el método *forward conditional*) estableció finalmente un modelo multivariante donde la edad del donante, el tiempo de isquemia fría del aloinjerto, el número de incompatibilidades HLA-DR donante-receptor y la presencia de DSA, permanecieron como factores predictivos independientemente asociados a un mayor riesgo de pérdida del aloinjerto (Tabla 5.A). El antecedente de trasplante previo, así como el valor de PRA perdieron su significancia estadística tras el ajuste con el resto de las variables incluidas, siendo finalmente excluidos del modelo.

Tabla 5. Riesgo de pérdida del aloinjerto renal asignado según la presencia de DSA en el momento del trasplante (A) y la capacidad de fijar C1q del DSA (B) después de ajustar el modelo para otros factores predictivos clínicos e inmunológicos incluyendo: la edad del donante, el tiempo de isquemia fría y la presencia de incompatibilidades HLA-DR. Modelo multivariante de regresión Cox.

Regresión multivariante Cox ^a	Nº de pacientes	Hazard ratio (HR)	IC ^b 95%	p
Edad del donante (por cada año de incremento)	389	1,016	1,003-1,029	0,014
Tiempo de isquemia fría (por cada hora de incremento)	389	1,054	1,028-1,082	<0,001
Incompatibilidades en HLA-DR ≥ 1				
No	119	1,00	--	--
Sí	270	1,896	1,129-3,851	0,016
Modelo A				
Presencia de DSA (en el momento del trasplante)				
No	297	1,00		
Sí	92	2,133	1,379-3,300	0,001
Modelo B				
Presencia de DSA y capacidad de fijar C1q				
Sin DSA	297	1,00		
DSA no fijadores de C1q	62	1,389	0,784-2,461	0,260
DSA fijadores de C1q	30	4,012	2,326-6,919	<0,001

^aLos factores que resultaron ser significativamente predictivos en el análisis univariante fueron introducidos mediante el método *forward conditional* en el análisis multivariante

^bIC denota intervalo de confianza

Como mostramos en el modelo descrito, la presencia de DSA en el momento del trasplante incrementa a más del doble el riesgo de pérdida del aloinjerto en la población (HR 2,133; IC 95% 1,379-3,300; $p=0,001$). No obstante, cuando los pacientes con DSA fueron estratificados en función de la habilidad de su DSA para fijar el primer componente de la cascada del complemento (Tabla 5.B), únicamente aquellos pacientes cuyo DSA fue además capaz de unir C1q mostraron un incremento significativo en el riesgo de pérdida del aloinjerto respecto a la población sin DSA (HR 4,012; IC 95% 2,326-6,919; $p<0,001$). Es interesante resaltar, por la aparente relevancia clínica que pudiera tener a la hora de estratificar el riesgo de pérdida del aloinjerto, que en ningún punto del seguimiento encontramos diferencias en cuanto al riesgo de fallo prematuro del aloinjerto entre pacientes DSA+, C1q- y pacientes sin DSA (HR 1,389; IC 95% 0,784-2,461; $p=0,260$).

7.5 ANÁLISIS DE LOS MODELOS PREDICTIVOS

Finalmente determinamos el valor predictivo de los diferentes modelos descritos en la Tabla 5, mediante el análisis ROC y representamos los resultados en la Figura 16. El área bajo la curva (AUC) del modelo predictivo convencional, que estratifica el riesgo para la pérdida del injerto en base a la presencia o ausencia de DSA previo al trasplante fue de 0,704 (IC 95%; 0,645-0,763). Como vemos en la Figura 15, la inclusión de la habilidad de fijar C1q como propiedad del DSA preformado, mejoró el valor predictivo del modelo (AUC=0,725; IC 95%, 0,665-0,782).

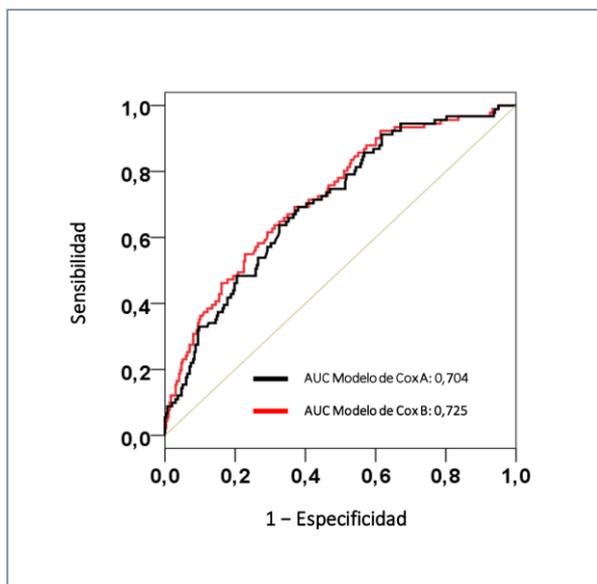


Figura 16. Curvas ROC para el análisis del valor predictivo de los dos modelos multivariantes propuestos para la predicción del riesgo de pérdida del aloinjerto. El Modelo A considera la presencia o ausencia de DSA. El Modelo B tiene en cuenta la capacidad de fijar C1q del DSA. En la gráfica se incluye el valor del área bajo la curva (AUC) para cada uno de los modelos estudiados.

7.6 CORRELACIÓN ENTRE EL VALOR MFI DE LOS ANTICUERPOS anti-HLA Y SU CAPACIDAD PARA FIJAR EL COMPONENTE C1Q HUMANO

En el presente proyecto de tesis doctoral quisimos, por último, evaluar si existía alguna asociación entre la fuerza de un anticuerpo (fuerza entendida en base al valor de MFI del anticuerpo obtenido) y su capacidad para activar vía del complemento. En la Figura 17 mostramos un gráfico de dispersión donde cada uno de los 9.898 puntos analizados representa el valor de MFI de cada bola de antígeno único (SAB Clase I/II), obtenido tanto en el análisis estándar SAB-panIgG (eje X) como en el ensayo SAB modificado para la detección del componente C1q humano (eje Y). Del total de 4.191 bolas positivas identificadas en el análisis SAB-panIgG ($MFI \geq 1.000$), 932 resultaron también positivas en el análisis SAB-C1q ($MFI \geq 500$), mientras que 3.259 bolas fueron negativas. Además, 9 bolas positivas en el test C1q presentaron un valor de MFI por debajo de 1.000 en el análisis SAB-panIgG.

Los resultados derivados del análisis de la capacidad de fijación de C1q revelaron que del total de anticuerpos anti-HLA circulantes, únicamente un 22,2% de

ellos tenían la potencial capacidad de activar la vía del complemento, siendo el 77,8% restante incapaces de unir el complejo C1q. Por otro lado, cuando analizamos la fracción de anticuerpos capaces de fijar C1q, dentro del total de anticuerpos anti-HLA detectados por SAB-panIgG, vimos cómo los anticuerpos C1q positivos no se distribuían homogéneamente dentro del panel de anticuerpos, sino que éstos aparecían con mucha más frecuencia entre aquellos anticuerpos anti-HLA con valores de MFI elevados.

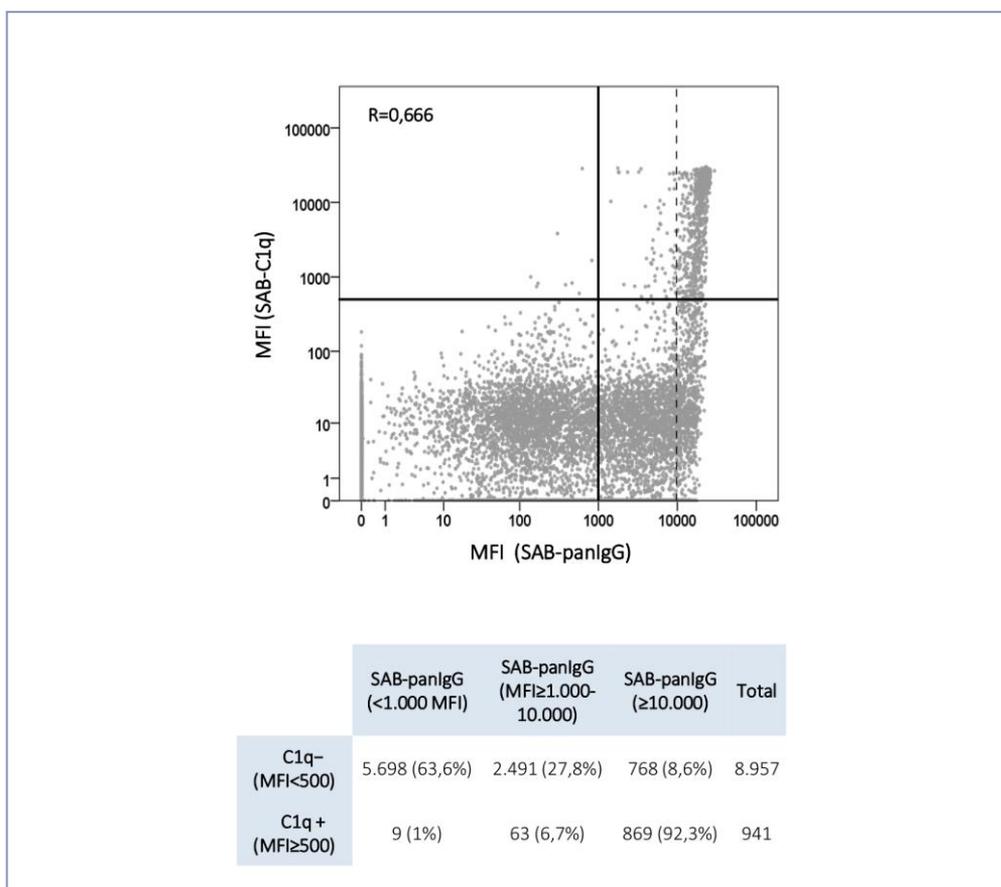


Figura 17. Correlación entre los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) del ensayo SAB-panIgG y del ensayo SAB-C1q. Los valores MFI de cada bola Luminex individual obtenidos por ambos ensayos se representan en un gráfico de dispersión de puntos con escala logarítmica. La tabla bajo el gráfico muestra el número de bolas negativas (MFI<500) y positivas (MFI≥500) en el ensayo SAB-C1q según su valor de MFI en el ensayo SAB-panIgG.

El hecho de que un anticuerpo con valor de MFI bajo presente una potencial capacidad de fijación de C1q parece ser un hecho poco común. De hecho, del total de 941 bolas positivas por SAB-C1q, 869 (92,3%) presentaron un valor de MFI elevado (≥ 10.000) en el análisis estándar SAB-panIgG, mientras que solamente 72 bolas (7,7%) C1q reactivas tuvieron un valor de MFI en el SAB-panIgG por debajo de 10.000. En la misma línea de resultados, cuando comparamos el valor de MFI medio (obtenido por SAB-panIgG) de aquellas bolas que resultaron positivas en SAB-C1q respecto del valor medio de MFI de las bolas negativas, encontramos que la media de MFI de las primeras fue significativamente superior a la de aquellas bolas que no mostraron reactividad en el test C1q (18.816 vs. 6.495; $p < 0,001$). Estos hallazgos sugieren que el valor MFI del anticuerpo parece estar asociado a su habilidad para fijar C1q. Sin embargo, esta asociación es imperfecta y cuando evaluamos la correlación entre el valor MFI de un anticuerpo y su capacidad para fijar C1q, no encontramos una fuerte asociación entre ambas variables ($R=0,666$). Finalmente, la correlación entre la presencia de un anticuerpo anti-HLA con valor de MFI elevado (≥ 10.000) y su capacidad para fijar C1q ($MFI \geq 500$) fue de 0,661 (R de Pearson) o, dicho de otro modo, la probabilidad de que un anticuerpo anti-HLA con un valor de MFI en suero de ≥ 10.000 sea capaz de unir C1q es aproximadamente 0.66.

8. DISCUSIÓN

En este estudio, caracterizamos retrospectivamente la presencia de DSA y su capacidad de fijar C1q, en muestras de suero pre-trasplante pertenecientes a un total de 389 pacientes trasplantados de riñón en el Hospital Universitario Reina Sofía entre los años 1995-2009, utilizando los test SAB-panIgG y SAB-C1q como métodos de detección de anticuerpos anti-HLA. Nuestros resultados mostraron que la tasa de supervivencia del aloinjerto renal a los 7 años en pacientes trasplantados con DSA fijadores de C1q preformados fue significativamente menor tanto a la de pacientes trasplantados con DSA no fijadores de C1q ($p=0,001$), como a la de pacientes trasplantados sin DSA ($p<0,001$), no encontrando diferencias significativas en relación a la supervivencia del aloinjerto renal entre pacientes con DSA no fijadores de C1q y pacientes sin DSA ($p=0,403$). Llama la atención, que entre los pacientes con DSA preformados y valor de MFI elevado (≥ 10.000) en el ensayo SAB-panIgG, aquellos cuyo DSA tuvo la capacidad de fijar C1q presentaron una peor supervivencia del aloinjerto ($p=0,041$). Finalmente, nuestro modelo predictivo multivariante determinó que únicamente la presencia de DSA capaces de unir C1q (HR 4,012; IC 95% 2,326-6,919; $p<0,001$), y no la de aquellos DSA incapaces de unir C1q (HR 1,389; IC 95% 0,784-2,461; $p=0,260$), constituye un factor predictivo independiente de riesgo de fallo renal, tras estratificar la población con DSA en función de su capacidad de unir C1q y ajustar el modelo por otros factores predictivos pre-trasplante incluyendo la edad del donante, el tiempo de isquemia fría y las incompatibilidades HLA-DR entre donante y receptor.

La irrupción del ensayo SAB, allá por el año 2003 (76), supuso una auténtica revolución en el ámbito del trasplante de órgano sólido y pronto se erigió como el método de referencia para la detección de anticuerpos anti-HLA en los laboratorios de histocompatibilidad de todo el mundo en detrimento de los tests basados en CDC (77). Dado que la característica fundamental radica en su enorme sensibilidad, lo que nos permite detectar anticuerpos séricos circulantes incluso cuando éstos se encuentran a muy baja concentración (55), su consolidación como test de análisis ha permitido que la incidencia del rechazo humoral temprano se sitúe en niveles por debajo del 5% (66, 78).

Si bien, como hemos descrito previamente, la principal virtud del test es su alta sensibilidad, ciertos autores han criticado su poca especificidad a la hora de predecir el riesgo de rechazo, cuestionándose si todos los anticuerpos detectados son igualmente relevantes desde un punto de vista clínico. A este respecto, algunos estudios publicados han sugerido una notoria falta de asociación entre la presencia de anticuerpos detectados por SAB-panIgG, en un contexto de CDC negativo, con el fallo de aloinjerto (63-65). No obstante, y a pesar de que la presencia de estos anticuerpos todavía suscita controversia, lo cierto es que hay una clara tendencia a considerarlos como relevantes, con un marcado efecto deletéreo sobre la función renal. Este hecho se sustenta en los múltiples estudios llevados a cabo, sobre todo en la última década, donde ha quedado demostrado que el trasplante realizado en pacientes donde pudo objetivarse la presencia de DSA por análisis SAB-panIgG, en un contexto de prueba cruzada por CDC negativa, tiene un peor pronóstico (Figuras 18 y 19) (50, 67, 79, 80).

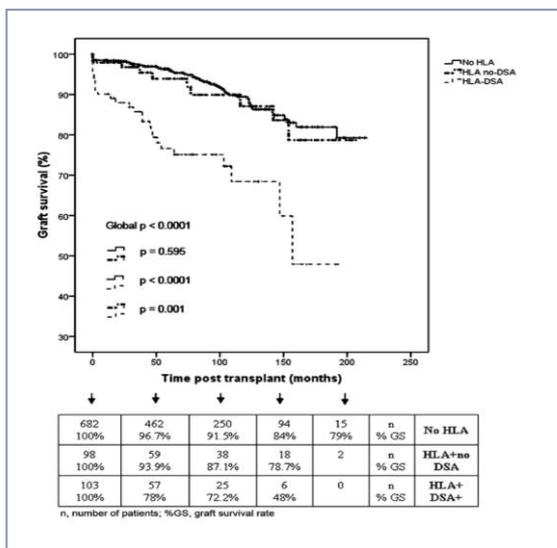


Figura 18. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier según el estatus de anticuerpos anti-HLA antes del trasplante. Todos los pacientes se trasplantaron con una prueba cruzada T+B por CDC negativa. Tomado de Caro-Oleas JL y cols. (80) Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27: 1231-1238.

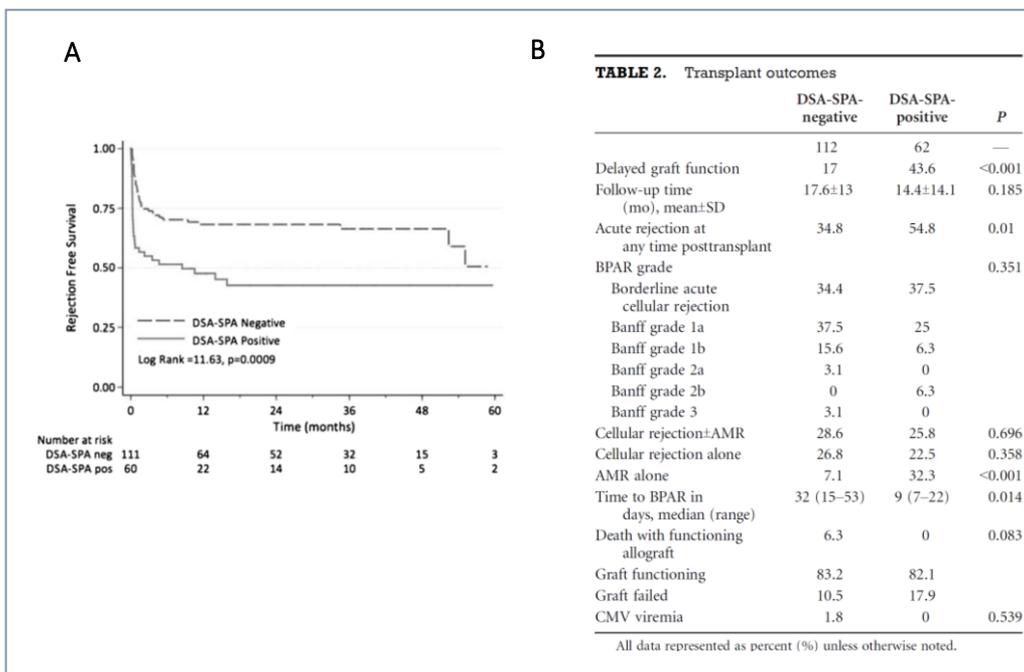


Figura 19. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier según el estatus de anticuerpos anti-HLA antes del trasplante detectados mediante técnicas de fase sólida (A). Evolución del aloinjerto renal según el estatus de anticuerpos anti-HLA pre-trasplante (B). Tomado de Tsapepas DS y cols. (50) Preformed donor-specific antibodies and risk of antibody-mediated rejection in repeat renal transplantation. *Transplantation*. 2014; 97: 642-647.

En esta línea, nuestros resultados indican cómo efectivamente, la presencia de DSA preformados incrementa el riesgo de fallo renal en la población (Figura 12.A), lo que sin duda apoya la idea de que estos anticuerpos, aun solamente siendo detectados por técnicas altamente sensibles, ejercen un daño sobre el aloinjerto, que se traduce en una disminución de su supervivencia. No obstante, nuestro estudio también revela que no todos los DSA preformados ejercen el mismo impacto sobre la función renal y sugiere que el daño sobre el aloinjerto se produce fundamentalmente en presencia de DSA capaces de fijar C1q (Figura 12.B).

El papel que juega la capacidad de unir C1q de los diferentes DSA sobre la evolución del aloinjerto ha sido evaluado por diferentes grupos, y constituye, a día de hoy, una de las principales líneas de investigación para intentar esclarecer los



mecanismos inmunológicos por los que los anticuerpos anti-HLA dañan el órgano trasplantado. Varios estudios han demostrado que la aparición de DSA *de novo* fijadores de C1q se asocia estrechamente con una peor evolución del aloinjerto. Loupy y cols. (81) mostraron, trabajando con una cohorte de 1.016 pacientes, que la presencia de DSA fijadores de C1q en el post-trasplante se asocia a una mayor tasa de eventos de AMR, a fenotipos histopatológicos de daño más severos y a un mayor riesgo de pérdida del aloinjerto (Figuras 20 y 21).

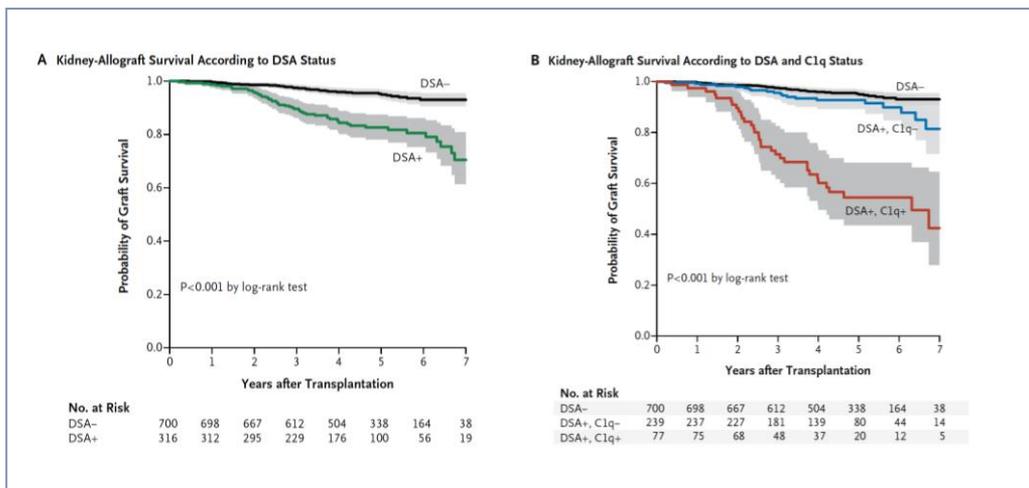


Figura 20. Curvas Kaplan-Meier para la supervivencia del aloinjerto renal según el estatus de anticuerpos anti-HLA después del trasplante Adaptado de Loupy A y cols. (81) Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med.* 2013; 369: 1215-1226.

Previamente, Sutherland y cols. (82) ya habían demostrado el mayor riesgo de pérdida del aloinjerto que supone la presencia de DSA fijadores de C1q desarrollados *de novo*. En la misma línea, Piazza y cols. (83) describieron que la presencia de *de novo* DSA fijadores de C1q, pero no así la presencia de *de novo* DSA no fijadores de C1q, constituye un biomarcador de mal pronóstico en el contexto del trasplante. Otros estudios más recientes han descrito que el desarrollo de AMR y el daño subsecuente de éste sobre el aloinjerto se produce principalmente en presencia de DSA fijadores de C1q (84, 85).

No obstante, a pesar de la creciente evidencia que indica que los DSA fijadores de C1q ejercen un daño más severo sobre la función del injerto trasplantado, hecho que se apoya en su teórica mayor capacidad para activar la cascada del complemento *in vivo*, la utilidad clínica del ensayo SAB-C1q como método para estratificar el riesgo inmunológico de los DSA circulantes, previos al trasplante, no ha sido aún convenientemente esclarecida, estando actualmente sujeta a un profundo debate.

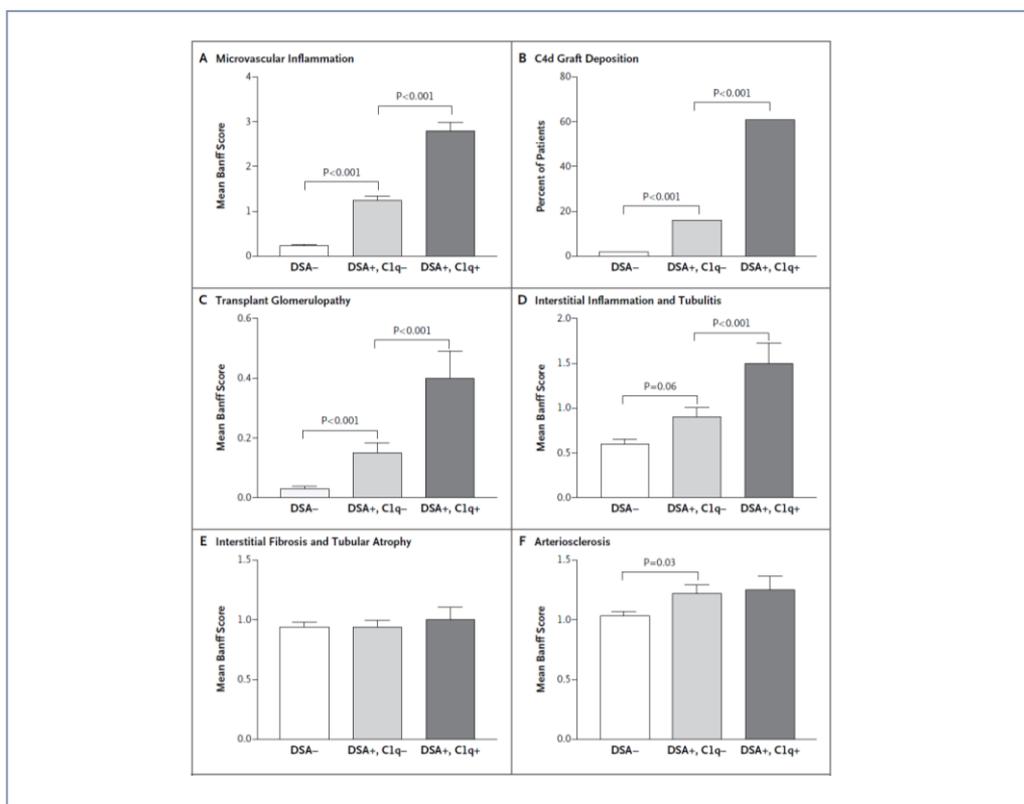


Figura 21. Características fenotípicas de daño del aloinjerto renal según el estatus de anticuerpos anti-HLA después del trasplante. Tomado de Loupy A y cols. (81) Complement-binding anti-hla antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med.* 2013; 369: 1215-1226.

Los autores que hasta ahora han analizado la relevancia clínica de la capacidad de fijar C1q en el contexto del pre-trasplante han publicado resultados controvertidos. El estudio que describe y evalúa por primera vez la utilidad del ensayo SAB-C1q como método de detección de anticuerpos fue realizado sobre una pequeña cohorte de

pacientes pediátricos trasplantados de corazón. Dicho estudio muestra una fuerte asociación entre la presencia de DSA fijadores de C1q, el riesgo de ocurrencia de AMR y la pérdida prematura del aloinjerto (73). Esta mayor relevancia clínica de los anticuerpos detectados por este novedoso ensayo (SAB-C1q) parecía estar independientemente asociada de su valor de MFI (56), dotando al test de un poder discriminatorio sin precedentes. Sin embargo, estudios posteriores han discutido la utilidad clínica del SAB-C1q como método para evaluar el riesgo de un DSA preformado. Así, Otten y cols. (86) no pudieron determinar el significado clínico de los DSA fijadores de C1q en relación a la supervivencia del aloinjerto debido a la baja prevalencia de pacientes que resultaron positivos para la presencia de anticuerpos C1q, analizando una cohorte de 837 pacientes trasplantados renales. Crespo y cols. (87) y, más recientemente, Thammanichanond y cols. (88), analizando pequeñas cohortes de pacientes trasplantados con DSA preformados (28 y 48, respectivamente) no encontraron ninguna asociación entre la evolución del aloinjerto renal y la presencia de DSA según su capacidad para fijar o no el complejo C1q (Figura 22).

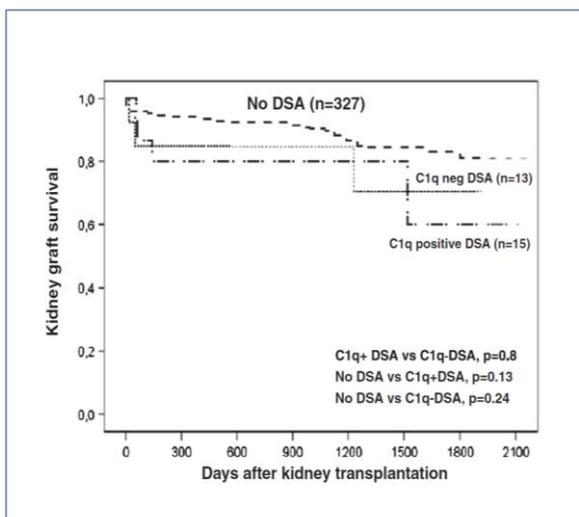


Figura 22. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier según la presencia de DSA C1q positivos pre-trasplante, DSA C1q negativos o sin DSA. Adaptado de Crespo M y cols. (87) Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: Does C1q-fixation matter? *Transpl Immunol.* 2013; 29: 28-33.

Ambos autores sugieren que el ensayo SAB-C1q, como método de detección de anticuerpos, tiene un valor predictivo limitado, y abogan por el uso del test estándar

SAB-panIgG como método para estratificar del riesgo inmunológico. Sin embargo, ninguno de estos estudios proporciona datos objetivos sobre el papel teóricamente patológico que ejercen los DSA no fijadores de C1q sobre el aloinjerto y, de hecho, los autores no comparan el impacto que estos anticuerpos (C1q negativos) ejercen en la población trasplantada con respecto, por ejemplo, a un grupo de población control sin DSA. Sus conclusiones se basan en la no existencia de diferencias significativas en la supervivencia o el riesgo de pérdida del injerto entre pacientes con DSA con independencia de su capacidad para activar la cascada del complemento, hecho que puede ser debido al pequeño tamaño muestral de ambos estudios.

En el presente trabajo de tesis doctoral, evaluamos un total de 92 pacientes trasplantados con DSA preformados, demostrando que el daño sobre la función del aloinjerto renal se produce fundamentalmente cuando los DSA preformados son capaces de unir complemento, y proporcionamos evidencias acerca del limitado impacto que ejercen estos DSA cuando son incapaces de unir C1q. El uso del ensayo SAB-C1q nos permitió definir por ejemplo, dentro de una población de riesgo definida por presentar DSA con un valor elevado de MFI (≥ 10.000) en el momento del trasplante, grupos de pacientes con diferente supervivencia del aloinjerto en función de su capacidad de fijar o no el complejo C1q (Figura 13.B). Por contra, la tasa de supervivencia del aloinjerto de pacientes con DSA no fijadores de C1q fue similar ($p=0,457$) con independencia de su valor de MFI (Figura 14). Desde nuestra perspectiva, estos datos vistos conjuntamente sugieren que el valor de MFI de los anticuerpos anti-HLA, el cual tradicionalmente se ha usado para definir su riesgo inmunológico y que, en el mejor de los casos nos proporciona una medida semi-cuantitativa de su concentración (89), no es una característica del todo fiable para predecir la evolución del trasplante, surgiendo la necesidad de explorar otras propiedades de los anticuerpos como por ejemplo, su capacidad para activar la vía del complemento, con objeto de determinar su verdadera relevancia clínica. Recientes hallazgos publicados por Malheiro y cols. (90) muestran que la capacidad de fijar C1q de un anticuerpo,

determinada por el ensayo SAB-C1q, mejora la predicción de ocurrencia de AMR respecto a su valor de MFI. Si asumimos la estrecha relación existente entre el AMR y fallo del aloinjerto (91), nuestros resultados apoyarían, sin duda, estos hallazgos. En base a lo expuesto, creemos que el uso del ensayo SAB-C1q como método de detección, dentro de una población sensibilizada, podría proporcionar un importante valor añadido a la estratificación del riesgo inmunológico de un anticuerpo, normalmente basado en su valor neto de MFI.

Parece existir un estrecho vínculo entre el valor MFI de un anticuerpo y su capacidad de fijar C1q. En general, nuestros resultados muestran como la capacidad de fijar C1q es una característica más propia de bolas que exhiben elevados valores de MFI en el ensayo SAB-panIgG (Figura 17). Esta dualidad MFI-C1q no fue un hallazgo novedoso sino más bien esperado, ya que otros autores habían descrito previamente como la capacidad de fijar C1q de un anticuerpo parece estar relacionada con su fuerza (74, 84). No obstante, cuando consideramos la fuerza del anticuerpo en base a su valor de MFI obtenido en el análisis del suero neto, esta asociación MFI-C1q es bastante imperfecta. Así, como podemos observar en el gráfico de dispersión de puntos de la Figura 17, una gran parte de los anticuerpos con valores elevados de MFI (≥ 10.000) resultaron ser C1q negativos, mientras que una proporción de anticuerpos con valores de MFI relativamente bajos mostraron una fuerte capacidad de unión por dicha molécula. Sabemos que la detección de anticuerpos con valores bajos de MFI, capaces de unir C1q puede ser una consecuencia del denominado efecto *prozona*, un fenómeno que enmascara la fuerza real de los anticuerpos cuando éstos se encuentran a concentraciones muy elevadas (74). El tratamiento previo de las muestras de suero neto con EDTA o DTT puede, de algún modo, eliminar este efecto inhibitorio (92), hecho que podría mejorar la asociación entre la capacidad de unir C1q de los anticuerpos y su valor de MFI. Por el contrario, la incapacidad de unir C1q de los anticuerpos con valores elevados de MFI podría indicar que la fuerza de dichos anticuerpos es relativamente baja, tal y como describieron Tambur y cols. (93), quienes,



mediante la realización de diluciones seriadas, lograron estimar la fuerza de los anticuerpos de forma más precisa (Figura 23).

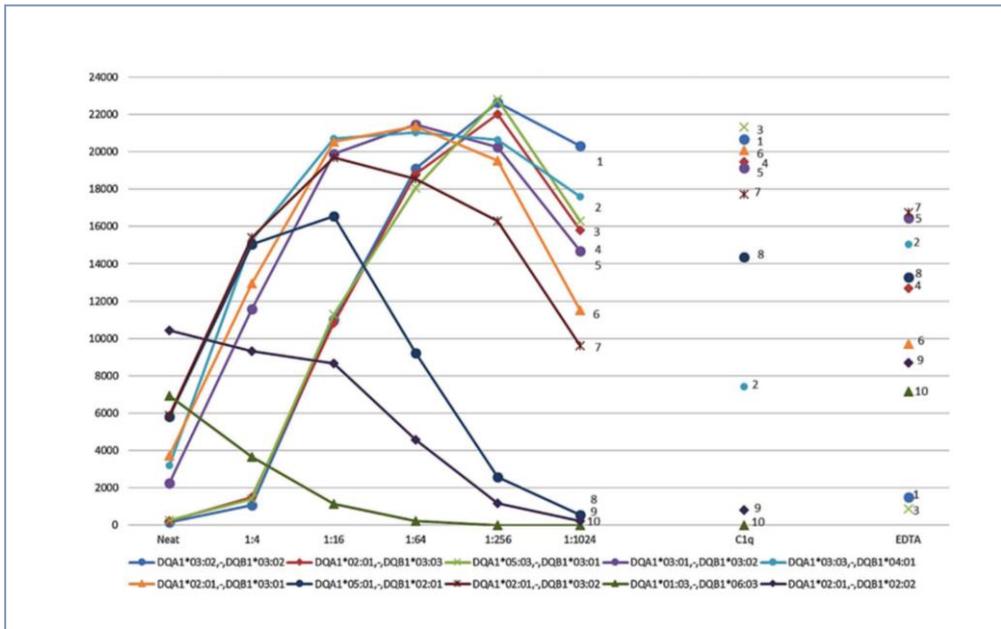


Figura 23. Valor de intensidad de fluorescencia media (MFI) de 10 bolas-Luminex en el ensayo SAB-panIgG a partir de una única muestra de suero neto y diluido a 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 y 1:1024, en el ensayo SAB-C1q y en el ensayo SAB-panIgG después de haber tratado la muestra de suero con EDTA. Tomado de Tambur AR y cols. (93) Assessing antibody strength: comparison of MFI, C1q, and titer information. *Am J Transplant.* 2015; 15: 2421-2430.

Esta *fuerza verdadera* o *título* de los anticuerpos anti-HLA se asocia mejor a su potencial capacidad para activar el complemento que la *fuerza neta*, existiendo una casi perfecta relación entre el alto o bajo título de un anticuerpo y su capacidad o incapacidad de fijación por C1q respectivamente. Al igual que mediante los estudios de titulación, el ensayo SAB-C1q resulta ser un método fiable para desenmascarar la fuerza real de los anticuerpos predefinidos por SAB-panIgG, cobrando un especial interés su uso en la estratificación del riesgo inmunológico de pacientes hiperinmunizados

(cPRA>80) donde la cuantificación del anticuerpo está comúnmente artefactada por el efecto prozona, y donde, por tanto, la relación MFI-fuerza es imprecisa (92).

Por otra parte, considerando la diferente avidez por el complejo proteico C1q, que exhiben las distintas subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4), hecho que está ampliamente demostrado y descrito en la literatura (94-96), el patrón de subclases de IgG que compone un anticuerpo particular debería, al menos *a priori*, ser determinante para definir su potencial capacidad de activación del complemento. A este respecto, parece claro que la capacidad de activar el complemento de un anticuerpo requiere necesariamente la presencia de subclases IgG1 y/o IgG3, las cuales muestran una fuerte capacidad de fijación por la molécula C1q. Sin embargo, la ausencia de dicha capacidad no parece estar tan influenciada por su composición de subclases. Hasta ahora, los diversos estudios que han analizado el perfil de subclases de IgG han revelado que la mayor parte de los anticuerpos anti-HLA no están constituidos por una única subclase de IgG, sino más bien por una mezcla variable de éstas (97), siendo IgG1 la subclase más prevalente (98-101). Posiblemente, la fuerte correlación anteriormente comentada entre la fuerza real o título de los anticuerpos, estimada por el ensayo SAB-panIgG en los sueros pretratados o diluidos, y su capacidad de unir C1q, podría ser en gran medida consecuencia de la alta prevalencia de la IgG1 como subclase inmunodominante, siendo la inmunoglobulina que aporta un peso específico mayor a la medida de MFI obtenida.

Recientes evidencias apoyan la idea de que las diferencias que determinan la capacidad de los diferentes anticuerpos anti-HLA para unir o no el componente C1q no son de tipo cualitativo, entendidas éstas como distinta composición de subclases de IgG, sino más bien son debidas a diferencias de tipo cuantitativo, en referencia a la distinta concentración de las subclases que lo componen (74, 84, 93, 100, 101). De hecho, un resultado negativo en el test SAB-C1q no tiene por qué significar que el perfil de subclases del anticuerpo investigado esté compuesto únicamente por subclases de

IgG con poca (IgG2) o incluso sin (IgG4) capacidad biológica de activar la cascada del complemento, como cabría esperar, sino que puede contener, y de hecho contiene normalmente, concentraciones limitadas de subclases de IgG potencialmente fijadoras de C1q, fundamentalmente IgG1 (100).

Únicamente adoptando una estructura hexamérica, estabilizada mediante interacciones de naturaleza no-covalente vía Fc:Fc, la IgG1 está capacitada para atraer y unir la molécula C1q y activar así la vía clásica del complemento (102). La estequiometría de dicho ensamblaje es de 1:6 (C1q:IgG1₆) (103) y requiere de forma implícita una proximidad física entre las moléculas de IgG. Este estado necesita cierta concentración de anticuerpos en el medio para alcanzar una densidad determinada de éstos unidos sobre sus antígenos diana que facilite su interacción y proporcione sitios de anclaje al complejo C1q con suficiente avidéz. Este hecho, sin duda, parece explicar la estrecha relación encontrada entre la capacidad de un anticuerpo de unir C1q y su fuerza real o título, más allá del perfil de subclases que presente. Así, la presencia de determinadas subclases de IgG (IgG1/IgG3) a bajo título en la composición de una especificidad de anticuerpo anti-HLA particular, con independencia de que éstas tengan teóricamente una gran capacidad de activar la cascada del complemento, no sería suficiente para alcanzar el umbral de anticuerpos que posibilite la interacción y conformación de los complejos hexaméricos necesarios sobre los antígenos HLA adheridos a las bolas Luminex, impidiendo el reclutamiento eficiente de la proteína C1q y su posterior detección en el test SAB-C1q. Todas las evidencias descritas, y nuestra propia experiencia, parecen indicar que la fuerza (título) de las subclases fuertemente fijadoras de C1q, fundamentalmente IgG1, son el principal factor limitante para definir el estatus C1q de un anticuerpo anti-HLA mediante el ensayo SAB-C1q. Considerando la baja prevalencia de las especificidades de anticuerpos, compuestas exclusivamente por subclases de tipo IgG2 y/o IgG4, que está descrita en la literatura, la incapacidad *per se* de un anticuerpo anti-HLA para unir C1q parece ser poco común (98-101, 104).



La cinética de la hexamerización de la inmunoglobulina IgG sobre su antígeno diana es un proceso dinámico que depende de la concentración tanto del antígeno como del anticuerpo (103). Desde nuestra perspectiva creemos que el menor impacto que ejercen los DSA no fijadores de C1q sobre la evolución del aloinjerto observado en nuestra cohorte de estudio podría ser una consecuencia de que dichos DSA estuvieran realmente compuestos por un bajo título de subclases fuertemente fijadoras de C1q. Bajo esta premisa, un DSA-IgG1 unido a sus antígenos HLA en el endotelio renal no alcanzaría el umbral crítico necesario para reclutar de forma eficiente la proteína C1q, y así disparar la cascada del complemento *in vivo* por la vía clásica, principal mecanismo de daño mediado por anticuerpos (39). De manera similar, la ausencia de subclases fuertemente fijadoras de C1q (IgG1/IgG3) en una baja proporción de anticuerpos o, más comúnmente, la presencia de IgG2 o IgG4 como subclases inmunodominantes, dentro de una especificidad no fijadora de C1q conformada también por IgG1/IgG3, podría igualmente limitar el impacto deletéreo sobre el aloinjerto, saturando los antígenos HLA endoteliales e impidiendo el acceso a subclases más lesivas.

La caracterización de los DSA como anticuerpos no fijadores de C1q no tiene que estar estrictamente asociada a una baja fuerza real del anticuerpo, puesto que una alta concentración de subclases no fijadoras de C1q también podría ser plausible. Asumiendo este hecho, podríamos explicar por qué algunas especificidades donde la MFI es elevada, incluso tras la dilución del suero, se muestran incapaces de unir C1q, y sugerimos que, a pesar de su innegable relación, la fuerza real o título de un anticuerpo no proporciona exactamente la misma información que su capacidad de fijar C1q. Asimismo, creemos que ambas características (título y capacidad de unir C1q) deberían ser integradas en estudios futuros con objeto de lograr una mejor comprensión de los mecanismos efectores por los que anticuerpos anti-HLA ejercen daño, lo que nos permitirá sin duda, definir mejor su riesgo y plantear estrategias inmunosupresoras más precisas.



Sabemos que los DSA son responsables de que se produzca daño sobre aloinjerto a través de un amplio espectro de funciones efectoras, que varían desde la activación de la vía clásica del complemento, hasta la citotoxicidad mediada por células NK y macrófagos dependientes de la unión a receptores FcγR (19). En un estudio reciente Lefaucheur y cols. (101) han asociado la presencia de DSA-IgG4 con la aparición de AMR subclínico y daño renal tardío, caracterizado por una predominancia de características histológicas, como glomerulopatía del aloinjerto y fibrosis intersticial/atrofia tubular, sugestivas de daño crónico, lo que apoya la idea de que los anticuerpos pueden lesionar el aloinjerto por vías independientes a la activación del complemento (105). Desde esta perspectiva, todos los DSA, con independencia de su capacidad para unir C1q, deberían ser evitados. Desafortunadamente, esto no es una opción plausible para una proporción creciente de pacientes altamente sensibilizados, que comienzan a colapsar las listas de espera. El desarrollo de protocolos de desensibilización para reducir la incidencia de rechazo y mantener concentraciones bajas de anticuerpos sostenidas en el tiempo, la optimización de los programas de intercambio de órganos y la mejora de nuestro entendimiento sobre la patogenicidad de los anticuerpos son retos futuros que asegurarán el éxito del trasplante, especialmente entre la población sensibilizada. Dado que nuestro estudio identifica diferentes grupos de riesgo en la población DSA positiva en base a su capacidad de fijación de C1q, nosotros planteamos aquí un nuevo y potenciado algoritmo de estratificación del riesgo inmunológico pre-trasplante. Advertimos de igual modo que este nuevo algoritmo debería ser interpretado con precaución, ya que está particularmente dirigido a aquellos pacientes cuyas posibilidades de trasplante son muy limitadas, careciendo de sentido su aplicación sobre pacientes con valores de cPRA bajos.

Como es lógico, nuestro estudio también presenta ciertas limitaciones. La primera es que se trata de un estudio observacional que no proporciona información objetiva sobre las vías de daño mediadas por los anticuerpos anti-HLA. Nosotros

sugerimos una mayor relevancia clínica de los anticuerpos C1q positivos en base a los resultados derivados del análisis de supervivencia y riesgo de fallo renal, sin llegar a profundizar en las causas subyacentes a este hecho, como por ejemplo la asociación DSA-AMR descrita en diferentes tipos de trasplante de órganos sólidos, y caracterizada en base a hallazgos histopatológicos y manifestaciones funcionales (106). Esta limitación fue consecuencia de que los criterios de diagnóstico de rechazo humoral sufrieron modificaciones a lo largo del periodo de este estudio, lo que nos impidió establecer de manera fiable la asociación entre la ocurrencia de AMR y la capacidad de unir C1q de los DSA. Así por ejemplo, los diagnósticos anatomopatológicos anteriores a 2005 carecen del análisis inmuno-histoquímico de deposición de C4d, un fragmento derivado del componente C4b del complemento sin función biológica conocida, liberado por la formación de complejos antígeno-anticuerpo durante la activación de la vía clásica del complemento, que posee en su estructura un residuo tioéster interno (107) mediante el cual se une covalentemente a elementos tisulares en el sitio local de activación, convirtiéndolo en una huella duradera que evidencia AMR (108). En segundo lugar, no pudimos evitar la heterogeneidad de los protocolos de inmunosupresión implementados a los pacientes incluidos, si bien este factor no tuvo un valor predictivo significativo en el análisis Cox univariante. La tercera limitación fue, la no-inclusión de la presencia de anticuerpos frente a los antígenos HLA-Cw y -DP, lo cual podría constituir un posible factor confundente en una determinada proporción de pacientes, teniendo en cuenta la relevancia clínica de estos anticuerpos en la evolución del aloinjerto, mostrada en algunos estudios (109). Finalmente, cuando estratificamos la población de estudio según la capacidad de unir C1q de los DSA, la prevalencia de pacientes DSA+, C1q+ fue baja (7,75%) dentro de la población analizada, si bien el tamaño de muestra fue suficiente para encontrar diferencias significativas dentro del grupo DSA+.

En resumen, nuestro trabajo demuestra que únicamente los DSA fijadores de C1q preformados representan una contraindicación absoluta para el trasplante renal,



pudiendo ser asumido el riesgo que para la función renal representa la presencia de DSA no fijadores de C1q. El uso clínico del ensayo SAB-C1q para la identificación de incompatibilidades HLA donante-receptor inaceptables nos permitiría, en algunos casos, mejorar la estratificación del riesgo de pérdida del aloinjerto. Este nuevo algoritmo podría incrementar la limitada oferta de órganos destinada a pacientes altamente sensibilizados, predefinidos por el ensayo SAB-panIgG. Este incremento en las posibilidades de trasplante reduciría el tiempo de permanencia de estos pacientes en lista de espera, lo que supondría una mejora considerable en su calidad de vida, en muchos casos mermada, por la mala condición clínica asociada a una permanencia prolongada en diálisis.

9. CONCLUSIONES



- La tasa de supervivencia del aloinjerto renal en la población trasplantada, evaluada a 7 años, disminuye únicamente en presencia de DSA con capacidad de fijar el complejo C1q. Por el contrario, la presencia de DSA C1q negativos no parece tener un impacto significativo sobre la supervivencia.
- La capacidad de fijar complemento, como característica inherente del anticuerpo, parece incidir negativamente sobre la supervivencia del aloinjerto, más allá del valor de MFI del anticuerpo preformado.
- Parece haber una clara asociación entre la fuerza de un anticuerpo y su capacidad de fijar complemento, si bien, esta asociación es imprecisa cuando consideramos la fuerza de los anticuerpos en base a su valor de MFI obtenido en suero neto. El SAB-C1q podría revelar la verdadera fuerza de algunos anticuerpos en aquellos sueros artefactados por el efecto prozona.
- La presencia de DSA C1q+ previo a trasplante incrementa más de 4 veces (HR 4,012; $p < 0,001$) el riesgo de fallo renal, en cualquier punto del seguimiento, respecto a la ausencia de D
- Hay una falta de asociación entre la presencia de DSA C1q- y el riesgo de pérdida de aloinjerto.
- Únicamente la presencia de DSA preformados capaces de unir C1q, en un contexto de CDC negativo, representan una contraindicación absoluta para llevar a cabo el trasplante.
- El ensayo SAB-C1q permite identificar grupos de anticuerpos con diferente riesgo inmunológico entre el total de anticuerpos anti-HLA predefinidos por SAB-panIgG.
- El uso clínico del ensayo SAB-C1q como método de detección de anticuerpos y la implementación de un nuevo algoritmo de exclusión antigénica en la



población HLA sensibilizada, incrementaría las opciones de trasplante de este grupo de pacientes, reduciendo su tiempo en lista de espera.

10. ABREVIATURAS



ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AMR	Rechazo mediado por anticuerpos (<i>antibody-mediated rejection</i>)
AUC	Área bajo la curva (<i>area under the curve</i>)
CDC	Citotoxicidad dependiente de complemento
CPA	Célula(s) presentadora(s) de antígenos
cPRA	Panel calculado de reactividad de anticuerpos (<i>calculated panel reactive antibody</i>)
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño (damage associated molecular patterns)
DE	Desviación estándar
DSA	Anticuerpo(s) específico(s) de donante (<i>donor-specific antibody/ies</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERC	Enfermedad renal crónica
EBV	Virus de Epstein-Barr
Fc	Fracción cristizable
HLA	Antígeno(s) leucocitario(s) humano(s) (<i>human leukocyte antigen(s)</i>)
HR	Índice de riesgo (<i>hazard ratio</i>)
IC	Intervalo de confianza
IVIG	Inmunoglobulina intravenosa
MAC	Complejo de ataque a la membrana
MFI	Intensidad de fluorescencia media (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MIC	Cadena relacionada con el MHC de Clase I (<i>MHC Class I chain related</i>)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>major histocompatibility complex</i>)
NGB	Ratio de fondo normalizada (<i>normalized background ratio</i>)
NIC	Nefropatía crónica intersticial
NK	Célula(s) asesina(s) natural(es) (<i>natural killer</i>)
OPTN	Organ Procurement Transplantation Network
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	R-ficoeritrina
PNC	Pielonefritis crónica
PRA	Panel de reactividad de anticuerpos (<i>panel reactive antibody</i>)
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones (<i>pattern recognition receptors</i>)
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
SAB	Bola(s) de antígeno único (<i>single antigen bead(s)</i>)
SSO	Sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia (<i>sequence specific oligonucleotide</i>)
TRS	Tratamiento renal sustitutivo
VXM	Prueba cruzada virtual (<i>virtual cross-match</i>)

11. REFERENCIAS



1. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012; 379: 165-180. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60178-5.
2. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD-MBDWG. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl*. 2009; 113: S1-130. doi: 10.1038/ki.2009.188.
3. Lorenzo V, Perestelo L, Barroso M, Torres A, Nazco J. [Economic evaluation of haemodialysis. Analysis of cost components based on patient-specific data]. *Nefrologia*. 2010; 30: 403-412. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2010.Jun.10264.
4. Tait BD, Hudson F, Cantwell L, Brewin G, Holdsworth R, Bennett G, et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology*. 2009; 14: 247-254. doi: 10.1111/j.1440-1797.2008.01074.x.
5. Ferrari P, Weimar W, Johnson RJ, Lim WH, Tinckam KJ. Kidney paired donation: principles, protocols and programs. *Nephrol Dial Transplant*. 2015; 30: 1276-1285. doi: 10.1093/ndt/gfu309.
6. Perez Albacete M. [Chronological evolution of the renal transplant in Spain]. *Actas Urol Esp*. 2006; 30: 735-748.
7. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol*. 1958; 20: 156-166.
8. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 2004; 5: 889-899. doi: 10.1038/nrg1489.
9. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J*. 2005; 19: 681-693. doi: 10.1096/fj.04-2078rev.
10. Collins RW. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *Eur J Immunogenet*. 2004; 31: 105-114. doi: 10.1111/j.1365-2370.2004.00457.x.

11. Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11: 823-836. doi: 10.1038/nri3084.
12. Howell WM, Carter V, Clark B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *J Clin Pathol*. 2010; 63: 387-390. doi: 10.1136/jcp.2009.072371.
13. Kobayashi KS, van den Elsen PJ. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12: 813-820. doi: 10.1038/nri3339.
14. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SG. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43: D423-431. doi: 10.1093/nar/gku1161.
15. Little AM, Parham P. Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Rev Immunogenet*. 1999; 1: 105-123.
16. Ayala Garcia MA, Gonzalez Yebra B, Lopez Flores AL, Guani Guerra E. The major histocompatibility complex in transplantation. *J Transplant*. 2012; 2012: 842141. doi: 10.1155/2012/842141.
17. Moreau A, Varey E, Anegón I, Cuturi MC. Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3(11). doi: 10.1101/cshperspect.a015461.
18. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med*. 2010; 363: 1451-1462. doi: 10.1056/NEJMra0902927.
19. Thomas KA, Valenzuela NM, Reed EF. The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcγR3, and endothelium in transplant rejection. *Trends Mol Med*. 2015; 21: 319-329. doi: 10.1016/j.molmed.2015.02.004.
20. Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int*. 2005; 68: 1-13. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00376.x.

21. El Ters M, Grande JP, Keddiss MT, Rodrigo E, Chopra B, Dean PG, et al. Kidney allograft survival after acute rejection, the value of follow-up biopsies. *Am J Transplant.* 2013; 13: 2334-2341. doi: 10.1111/ajt.12370.
22. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014; 14: 272-283. doi: 10.1111/ajt.12590.
23. Lamarche C, Cote JM, Senecal L, Cardinal H. Efficacy of Acute Cellular Rejection Treatment According to Banff Score in Kidney Transplant Recipients: A Systematic Review. *Transplant Direct.* 2016; 2: e115. doi: 10.1097/TXD.0000000000000626.
24. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant.* 2014; 14: 255-271. doi: 10.1111/ajt.12589.
25. Eskandary F, Wahrmann M, Muhlbacher J, Bohmig GA. Complement inhibition as potential new therapy for antibody-mediated rejection. *Transpl Int.* 2016; 29: 392-402. doi: 10.1111/tri.12706.
26. Riella LV, Djamali A, Pascual J. Chronic allograft injury: Mechanisms and potential treatment targets. *Transplant Rev (Orlando).* 2017; 31: 1-9. doi: 10.1016/j.trre.2016.10.005.
27. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 807-817. doi: 10.1038/nri1702.
28. Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25: 61-74. doi: 10.1007/s00467-008-1020-x.
29. Chong AS, Alegre ML. The impact of infection and tissue damage in solid-organ transplantation. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12: 459-471. doi: 10.1038/nri3215.
30. LaRosa DF, Rahman AH, Turka LA. The innate immune system in allograft rejection and tolerance. *J Immunol.* 2007; 178: 7503-7509.



31. Pratschke J, Stauch D, Kotsch K. Role of NK and NKT cells in solid organ transplantation. *Transpl Int.* 2009; 22: 859-868. doi: 10.1111/j.1432-2277.2009.00884.x.
32. Castellano G, Melchiorre R, Loverre A, Ditunno P, Montinaro V, Rossini M, et al. Therapeutic targeting of classical and lectin pathways of complement protects from ischemia-reperfusion-induced renal damage. *Am J Pathol.* 2010; 176: 1648-1659. doi: 10.2353/ajpath.2010.090276.
33. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI. Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. *Curr Opin Organ Transplant.* 2008; 13: 438-444. doi: 10.1097/MOT.0b013e328309ee31.
34. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. *Front Immunol.* 2016; 7: 582. doi: 10.3389/fimmu.2016.00582.
35. Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation.* 2013; 96: 681-688. doi: 10.1097/TP.0b013e31829853ce.
36. Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation.* 2012; 93: 1-10. doi: 10.1097/TP.0b013e31823cab44.
37. Zakrzewski JL, van den Brink MR, Hubbell JA. Overcoming immunological barriers in regenerative medicine. *Nat Biotechnol.* 2014; 32: 786-794. doi: 10.1038/nbt.2960.
38. Mehra NK, Baranwal AK. Clinical and immunological relevance of antibodies in solid organ transplantation. *Int J Immunogenet.* 2016; 43: 351-368. doi: 10.1111/iji.12294.
39. Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 2012; 8: 670-678. doi: 10.1038/nrneph.2012.212.
40. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet.* 1966; 2: 662-665.



41. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969; 280: 735-739. doi: 10.1056/NEJM196904032801401.
42. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant*. 2003; 3: 665-673.
43. Valenzuela NM, Reed EF. Antibodies in transplantation: the effects of HLA and non-HLA antibody binding and mechanisms of injury. *Methods Mol Biol*. 2013; 1034: 41-70. doi: 10.1007/978-1-62703-493-7_2.
44. Michielsen LA, van Zuilen AD, Krebber MM, Verhaar MC, Otten HG. Clinical value of non-HLA antibodies in kidney transplantation: Still an enigma? *Transplant Rev (Orlando)*. 2016; 30: 195-202. doi: 10.1016/j.trre.2016.06.001.
45. Cardinal H, Dieude M, Brassard N, Qi S, Patey N, Soulez M, et al. Antiperlecan antibodies are novel accelerators of immune-mediated vascular injury. *Am J Transplant*. 2013; 13: 861-874. doi: 10.1111/ajt.12168.
46. Taniguchi M, Rebellato LM, Cai J, Hopfield J, Briley KP, Haisch CE, et al. Higher risk of kidney graft failure in the presence of anti-angiotensin II type-1 receptor antibodies. *Am J Transplant*. 2013; 13: 2577-2589. doi: 10.1111/ajt.12395.
47. Rees L, Kim JJ. HLA sensitisation: can it be prevented? *Pediatr Nephrol*. 2015; 30: 577-587. doi: 10.1007/s00467-014-2868-6.
48. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Nochy D, Andrade J, Antoine C, et al. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2008; 8: 324-331. doi: 10.1111/j.1600-6143.2007.02072.x.
49. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Lefaucheur C, Anglicheau D, Zuber J, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant*. 2009; 9: 2561-2570. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02813.x.

50. Tsapepas DS, Vasilescu R, Tanriover B, Coppleson Y, Rekhman Y, Hardy MA, et al. Preformed donor-specific antibodies and risk of antibody-mediated rejection in repeat renal transplantation. *Transplantation*. 2014; 97: 642-647. doi: 10.1097/01.TP.0000440954.14510.6a.
51. Susal C, Roelen DL, Fischer G, Campos EF, Gerbase-DeLima M, Honger G, et al. Algorithms for the determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients. *Tissue Antigens*. 2013; 82: 83-92. doi: 10.1111/tan.12137.
52. Lavee J, Kormos RL, Duquesnoy RJ, Zerbe TR, Armitage JM, Vanek M, et al. Influence of panel-reactive antibody and lymphocytotoxic crossmatch on survival after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1991; 10: 921-929.
53. Singh D, Kiberd BA, West KA, Kamal K, Balbontin F, Belitsky P, et al. Importance of peak PRA in predicting the kidney transplant survival in highly sensitized patients. *Transplant Proc*. 2003; 35: 2395-2397.
54. Hadjiliadis D, Chaparro C, Reinsmoen NL, Gutierrez C, Singer LG, Steele MP, et al. Pre-transplant panel reactive antibody in lung transplant recipients is associated with significantly worse post-transplant survival in a multicenter study. *J Heart Lung Transplant*. 2005; 24: S249-254. doi: 10.1016/j.healun.2004.06.022.
55. Tait BD. Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients - Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. *Front Immunol*. 2016; 7: 570. doi: 10.3389/fimmu.2016.00570.
56. Chen G, Sequeira F, Tyan DB. 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: 849-858. doi: 10.1016/j.humimm.2011.07.001.
57. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schonemann C. Luminex((R)) and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfus Med Hemother*. 2013; 40: 182-189. doi: 10.1159/000351459.
58. Cecka JM. Calculated PRA (CPRA): the new measure of sensitization for transplant candidates. *Am J Transplant*. 2010; 10: 26-29. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02927.x.

59. Bostock IC, Alberu J, Arvizu A, Hernandez-Mendez EA, De-Santiago A, Gonzalez-Tableros N, et al. Probability of deceased donor kidney transplantation based on % PRA. *Transpl Immunol.* 2013; 28: 154-158. doi: 10.1016/j.trim.2013.05.002.
60. Marfo K, Lu A, Ling M, Akalin E. Desensitization protocols and their outcome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6: 922-936. doi: 10.2215/CJN.08140910.
61. Wongsaroj P, Kahwaji J, Vo A, Jordan SC. Modern approaches to incompatible kidney transplantation. *World J Nephrol.* 2015; 4: 354-362. doi: 10.5527/wjn.v4.i3.354.
62. Abu Jawdeh BG, Cuffy MC, Alloway RR, Shields AR, Woodle ES. Desensitization in kidney transplantation: review and future perspectives. *Clin Transplant.* 2014; 28: 494-507. doi: 10.1111/ctr.12335.
63. van den Berg-Loonen EM, Billen EV, Voorter CE, van Heurn LW, Claas FH, van Hooff JP, et al. Clinical relevance of pretransplant donor-directed antibodies detected by single antigen beads in highly sensitized renal transplant patients. *Transplantation.* 2008; 85: 1086-1090. doi: 10.1097/TP.0b013e31816b3ed1.
64. Phelan D, Mohanakumar T, Ramachandran S, Jendrisak MD. Living donor renal transplantation in the presence of donor-specific human leukocyte antigen antibody detected by solid-phase assay. *Hum Immunol.* 2009; 70: 584-588. doi: 10.1016/j.humimm.2009.05.007.
65. Susal C, Ovens J, Mahmoud K, Dohler B, Scherer S, Ruhstroth A, et al. No association of kidney graft loss with human leukocyte antigen antibodies detected exclusively by sensitive Luminex single-antigen testing: a Collaborative Transplant Study report. *Transplantation.* 2011; 91: 883-887. doi: 10.1097/TP.0b013e3182100f77.
66. Amico P, Hirt-Minkowski P, Honger G, Gurke L, Mihatsch MJ, Steiger J, et al. Risk stratification by the virtual crossmatch: a prospective study in 233 renal transplantations. *Transpl Int.* 2011; 24: 560-569. doi: 10.1111/j.1432-2277.2011.01235.x.
67. Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, Tanriover B, Crew RJ, Dube G, et al. Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23: 2061-2071. doi: 10.1681/ASN.2012070664.

68. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins LS, Fonseca I, Beirao I, et al. Analysis of preformed donor-specific anti-HLA antibodies characteristics for prediction of antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transpl Immunol.* 2015; 32: 66-71. doi: 10.1016/j.trim.2015.01.002.
69. Farrar CA, Sacks SH. Mechanisms of rejection: role of complement. *Curr Opin Organ Transplant.* 2014; 19: 8-13. doi: 10.1097/MOT.000000000000037.
70. Cernoch M, Viklicky O. Complement in Kidney Transplantation. *Frontiers in Medicine.* 2017; 4(66). doi: 10.3389/fmed.2017.00066.
71. Tyan DB. New approaches for detecting complement-fixing antibodies. *Curr Opin Organ Transplant.* 2012; 17: 409-415. doi: 10.1097/MOT.0b013e328355fb9b.
72. Lawrence C, Willicombe M, Brookes PA, Santos-Nunez E, Bajaj R, Cook T, et al. Preformed complement-activating low-level donor-specific antibody predicts early antibody-mediated rejection in renal allografts. *Transplantation.* 2013; 95: 341-346. doi: 10.1097/TP.0b013e3182743cfa.
73. Chin C, Chen G, Sequeria F, Berry G, Siehr S, Bernstein D, et al. Clinical usefulness of a novel C1q assay to detect immunoglobulin G antibodies capable of fixing complement in sensitized pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant.* 2011; 30: 158-163. doi: 10.1016/j.healun.2010.08.020.
74. Zeevi A, Lunz J, Feingold B, Shullo M, Bermudez C, Teuteberg J, et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2013; 32: 98-105. doi: 10.1016/j.healun.2012.09.021.
75. Lopes D, Barra T, Malheiro J, Tafulo S, Martins L, Almeida M, et al. Effect of Different Sensitization Events on HLA Alloimmunization in Kidney Transplantation Candidates. *Transplant Proc.* 2015; 47: 894-897. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.03.014.
76. Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation.* 2003; 75: 43-49. doi: 10.1097/01.TP.0000040431.80510.98.

77. Tait BD, Susal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*. 2013; 95: 19-47. doi: 10.1097/TP.0b013e31827a19cc.
78. Amico P, Honger G, Steiger J, Schaub S. Utility of the virtual crossmatch in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009; 14: 656-661. doi: 10.1097/MOT.0b013e328331c169.
79. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: 1398-1406. doi: 10.1681/ASN.2009101065.
80. Caro-Oleas JL, Gonzalez-Escribano MF, Gonzalez-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chaves V, Gentil-Govantes MA, et al. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27: 1231-1238. doi: 10.1093/ndt/gfr429.
81. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med*. 2013; 369: 1215-1226. doi: 10.1056/NEJMoa1302506.
82. Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB. Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant*. 2012; 16: 12-17. doi: 10.1111/j.1399-3046.2011.01599.x.
83. Piazza A, Poggi E, Ozzella G, Adorno D. Post-transplant development of C1q-positive HLA antibodies and kidney graft survival. *Clin Transpl*. 2013; 2013: 367-375.
84. Yell M, Muth BL, Kaufman DB, Djamali A, Ellis TM. C1q Binding Activity of De Novo Donor-specific HLA Antibodies in Renal Transplant Recipients With and Without Antibody-mediated Rejection. *Transplantation*. 2015; 99: 1151-1155. doi: 10.1097/TP.0000000000000699.

85. Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, Savchik C, Masiakos P, Colovai A, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. *Kidney Int.* 2016; 89: 209-216. doi: 10.1038/ki.2015.275.
86. Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, Hene RJ, van Zuilen AD. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant.* 2012; 12: 1618-1623. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03985.x.
87. Crespo M, Torio A, Mas V, Redondo D, Perez-Saez MJ, Mir M, et al. Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: does C1q-fixation matter? *Transpl Immunol.* 2013; 29: 28-33. doi: 10.1016/j.trim.2013.07.002.
88. Thammanichanond D, Wiwattanathum P, Mongkolsuk T, Kantachuvesiri S, Worawichawong S, Vallipakorn SA, et al. Role of Pretransplant Complement-fixing Donor-specific Antibodies Identified by C1q Assay in Kidney Transplantation. *Transplant Proc.* 2016; 48: 756-760. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.12.116.
89. Gebel HM, Bray RA. HLA antibody detection with solid phase assays: great expectations or expectations too great? *Am J Transplant.* 2014; 14: 1964-1975. doi: 10.1111/ajt.12807.
90. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins S, Fonseca I, Beirao I, et al. Determining donor-specific antibody C1q-binding ability improves the prediction of antibody-mediated rejection in human leucocyte antigen-incompatible kidney transplantation. *Transpl Int.* 2017; 30: 347-359. doi: 10.1111/tri.12873.
91. Puttarajappa C, Shapiro R, Tan HP. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. *J Transplant.* 2012; 2012: 193724. doi: 10.1155/2012/193724.
92. Schinstock CA, Gandhi MJ, Stegall MD. Interpreting Anti-HLA Antibody Testing Data: A Practical Guide for Physicians. *Transplantation.* 2016; 100: 1619-1628. doi: 10.1097/TP.0000000000001203.
93. Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KM, Cusick MF, Gordon RA, Leventhal JR, et al. Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. *Am J Transplant.* 2015; 15: 2421-2430. doi: 10.1111/ajt.13295.

94. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009; 113: 3716-3725. doi: 10.1182/blood-2008-09-179754.
95. Hickey MJ, Valenzuela NM, Reed EF. Alloantibody Generation and Effector Function Following Sensitization to Human Leukocyte Antigen. *Front Immunol*. 2016; 7: 30. doi: 10.3389/fimmu.2016.00030.
96. Valenzuela NM, Hickey MJ, Reed EF. Antibody Subclass Repertoire and Graft Outcome Following Solid Organ Transplantation. *Front Immunol*. 2016; 7: 433. doi: 10.3389/fimmu.2016.00433.
97. Schaub S, Honger G, Amico P. The complexity of the humoral immune response against HLA antigens. *Transpl Int*. 2014; 27: 249-250.
98. Honger G, Hopfer H, Arnold ML, Spriewald BM, Schaub S, Amico P. Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 2011; 92: 41-47. doi: 10.1097/TP.0b013e31821cdf0d.
99. Lowe D, Higgins R, Zehnder D, Briggs DC. Significant IgG subclass heterogeneity in HLA-specific antibodies: Implications for pathogenicity, prognosis, and the rejection response. *Hum Immunol*. 2013; 74: 666-672. doi: 10.1016/j.humimm.2013.01.008.
100. Schaub S, Honger G, Koller MT, Liwski R, Amico P. Determinants of C1q binding in the single antigen bead assay. *Transplantation*. 2014; 98: 387-393. doi: 10.1097/TP.000000000000203.
101. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen JP, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27: 293-304. doi: 10.1681/ASN.2014111120.
102. Diebold CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science*. 2014; 343: 1260-1263. doi: 10.1126/science.1248943.

103. Wang G, de Jong RN, van den Bremer ET, Beurskens FJ, Labrijn AF, Ugurlar D, et al. Molecular Basis of Assembly and Activation of Complement Component C1 in Complex with Immunoglobulin G1 and Antigen. *Mol Cell*. 2016; 63: 135-145. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.016.
104. Arnold ML, Ntokou IS, Doxiadis II, Spriewald BM, Boletis JN, Iniotaki AG. 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: 253-261. doi: 10.1111/tri.12206.
105. Viglietti D, Lefaucheur C, Glotz D. Evidence for an important role of both complement-binding and noncomplement-binding donor-specific antibodies in renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016; 21: 433-440. doi: 10.1097/MOT.0000000000000324.
106. Matsuda Y, Sarwal MM. Unraveling the Role of Allo-Antibodies and Transplant Injury. *Front Immunol*. 2016; 7: 432. doi: 10.3389/fimmu.2016.00432.
107. van den Elsen JM, Martin A, Wong V, Clemenza L, Rose DR, Isenman DE. X-ray crystal structure of the C4d fragment of human complement component C4. *J Mol Biol*. 2002; 322: 1103-1115.
108. Cohen D, Colvin RB, Daha MR, Drachenberg CB, Haas M, Nickleit V, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int*. 2012; 81: 628-639. doi: 10.1038/ki.2011.497.
109. Bachelet T, Martinez C, Del Bello A, Couzi L, Keiji S, Guidicelli G, et al. Deleterious Impact of Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Toward HLA-Cw and HLA-DP in Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2016; 100: 159-166. doi: 10.1097/TP.0000000000000821.

12. ANEXOS



PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-HLA: CRIBADO (MIXED I/II) Y ESPECIFICIDADES (SAB)

Preparación de las muestras de suero

1. Alicuotar 40 μL de suero de cada una de las muestras a analizar en tubos eppendorf de 1,5 mL.
2. Centrifugar a 8.000-10.000 g durante 10 minutos.

Incubación de las muestras de suero con las bolas Luminex

1. Añadir 20 μL de cada muestra de suero a cada uno de los pocillos de la placa, previamente diseñada.
2. Añadir 2,5 μL de bolas Luminex con una mezcla de Ag-HLA (Mixed I/II) a cada uno de los pocillos de la placa, en caso de realizar el cribado, o 2,5 μL de las bolas Luminex con antígeno único (single antigen beads o SAB) Clase I o Clase II según corresponda, en caso de determinar las especificidades de anticuerpos anti-HLA de un suero problema.
3. Vortexar para mezclar.
4. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación.

Preparación del buffer de lavado o wash buffer (WB)

El WB está a una concentración 10x. Para preparar un $V_f=100 \mu\text{L}$ de WB diluiremos:

$$10 \mu\text{L WB (10x)} + 90 \mu\text{L de H}_2\text{O destilada} = 100 \mu\text{L}$$

Por cada pocillo realizaremos 1 lavado con un $V=150 \mu\text{L}$ de WB y 4 lavados con un $V=200 \mu\text{L}$ de WB.



Si aproximadamente utilizamos media placa (48 pocillos), prepararemos la siguiente dilución (en exceso, puesto que el anticuerpo secundario hay que diluirlo también en WB):

$$Vf = 50 \text{ mL (45 mL de H}_2\text{O destilada + 5 mL de WB)}$$

Lavado de las muestras

Para retirar el exceso de anticuerpo no unido a los antígenos HLA sobre las bolas Luminex, realizaremos 3 lavados.

1. Añadir 150 μL de WB (1x) a cada pocillo, pipeteando arriba y abajo para mezclar bien. Centrifugar 5 min 1.300 g.
2. Eliminar sobrenadante (inversión de la placa). Resuspender el pellet (vortex).
3. Añadir 200 μL de WB (1x) a cada pocillo, pipeteando arriba y abajo para mezclar bien. Centrifugar 5 min 1.300 g.
4. Eliminar sobrenadante (inversión de la placa). Resuspender el pellet (vortex).
5. Repetir los pasos 3 y 4.

Preparación del anti-panIgG PE

El anticuerpo secundario anti-panIgG conjugado con PE está a una concentración 100x. Para cada pocillo, diluiremos el IgG anti-panIgG-PE en WB:

$$\text{Vol IgG anti-panIgG-PE total} = 1 \mu\text{L IgG anti-panIgG-PE} \times \text{número de muestras}$$

$$\text{Vol WB total} = 99 \mu\text{L WB} \times \text{número de muestras}$$

Nota: este paso lo realizaremos al mismo tiempo que el tercero de los lavados, para evitar al máximo la exposición a la luz del anticuerpo secundario.



Incubación con IgG anti-panIgG-PE

1. Añadir 100 μ L de IgG anti-panIgG-PE (1x) a cada uno de los pocillos. Pipetear arriba y abajo para mezclar bien.
2. Incubar 30 min en oscuridad, agitación y a temperatura ambiente.

Lavado de las muestras y preparación para adquisición en plataforma Luminex

1. Centrifugar la placa 1.300 g durante 5 min y eliminar el sobrenadante por inversión de la placa (exceso de IgG anti-panIgG-PE no unida al anticuerpo primario).
2. Repetir pasos 3 y 4 del *Lavado de las muestras* dos veces.
3. Añadir 80 μ L de líquido de sistema para adquirir. Vortexar. Proceder a la lectura de la placa.



PROCOLO PARA LA DETERINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA FIJADORES DE C1q EN SUERO (SAB-C1q ASSAY)

Preparación del suero a analizar

1. Añadir 40 μ L de suero en un eppendorf de 1,5 mL. Repetir con cada muestra.
2. Calentar los sueros para descomplementar en un bloque térmico a 56 $^{\circ}$ C durante 30 minutos.
3. Centrifugar los sueros a 8.000-10.000 g durante 10 minutos.
4. Transferir 30 μ L del sobrenadante a otro eppendorf de 1,5 mL. Mantener en hielo.

Preparación de C1q humano

1. Calcular el volumen de C1q necesario.

$$\text{Vol C1q total } (\mu\text{L}) = [N \text{ (número de muestras)} \times 1 \mu\text{L C1q/test}]$$

2. Elaborar una dilución 1:5 de C1q en buffer HEPES (10 Mm).

$$\text{Vol HEPES total } (\mu\text{L}) = 4 \times \text{Vol C1q total}$$

3. Vortexar la dilución y mantener en hielo.

Incubación de las muestras

1. Enriquecer el suero con C1q:
 - a. Añadir 0,5 μ L de control positivo a cada uno de los pocillos de la placa, previamente diseñada según el número de muestras que se van a testar.
 - b. Añadir 5 μ L de C1q humano previamente diluido en buffer HEPES en cada uno de los pocillos de la placa.



- c. Añadir 5 μ L de cada suero descomplementado a testar al pocillo correspondiente de la placa.
 - d. Mezclar.
2. Añadir 2,5 μ L de bolas magnéticas Luminex recubiertas de Ag-HLA único (SAB) a cada pocillo según corresponda (Clase I o Clase II). Vortexar para mezclar.
3. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente en un agitador y en oscuridad.
4. Añadir 5 μ L de IgG anti-C1q conjugada con PE. Incubar durante 20 minutos en agitación y oscuridad a temperatura ambiente.
5. Realizar un lavado, añadiendo 80 μ L de PBS a cada pocillo. Centrifugar 5 minutos a 1.300 g. Eliminar sobrenadante (inversión de la placa).
6. Añadir 80 μ L de líquido de sistema. Vortexar. Proceder a la lectura de la placa en plataforma Luminex.

13. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS



Impact of Preformed Donor-Specific Anti-Human Leukocyte Antigen Antibody C1q-Binding Ability on Kidney Allograft Outcome

Juan Molina¹, Ana Navas^{1*}, María-Luisa Agüera^{1,2}, Cristian Rodelo-Haad¹, Corona Alonso^{1,3}, Alberto Rodríguez-Benot^{1,2}, Pedro Aljama^{1,2} and Rafael Solana^{1,4}

¹Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Cordoba, Spain, ²Department of Nephrology, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain, ³Department of Allergy and Immunology, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain, ⁴Department of Immunology, Infanta Cristina University Hospital, Badajoz, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Zhenhua Dai,
Guangdong Provincial Academy of
Chinese Medical Sciences, China

Reviewed by:

Brian Duncan Tait,
Australian Red Cross Blood Service,
Australia

Christophe Picard,

Établissement Français du Sang,
France

*Correspondence:

Ana Navas
ananavasromo@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Alloimmunity and Transplantation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 23 June 2017

Accepted: 28 September 2017

Published: 31 October 2017

Citation:

Molina J, Navas A, Agüera M-L,
Rodelo-Haad C, Alonso C,
Rodríguez-Benot A, Aljama P and
Solana R (2017) Impact of Preformed
Donor-Specific Anti-Human
Leukocyte Antigen Antibody
C1q-Binding Ability on Kidney
Allograft Outcome.
Front. Immunol. 8:1310.
doi: 10.3389/fimmu.2017.01310

The consolidation of single antigen beads (SAB-panIgG) assay in the detection of preformed anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies has improved transplantation success. However, its high sensitivity has limited the allograft allocation for sensitized patients, increasing their waiting time. A modification of the standard SAB-panIgG assay allows the detection of that subset of antibodies capable of binding C1q (SAB-C1q assay). However, the clinical usefulness of SAB-C1q assay for determining the unacceptable mismatches is under discussion. We retrospectively analyzed the impact of preformed donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) according to the C1q-binding ability on allograft outcome, examining 389 single-kidney transplanted patients from deceased donors. Recipients with preformed C1q-binding DSA showed the lowest allograft survival up to 7 years (40.7%) compared to patients with preformed non-C1q-binding DSA (73.4%; $p = 0.001$) and without DSA (79.1%; $p < 0.001$). Allograft survival rate was similar between patients with preformed non-C1q-binding DSA and patients without preformed DSA ($p = 0.403$). Interestingly, among the high-mean fluorescence intensity DSA ($\geq 10,000$) population ($n = 46$), those patients whose DSA were further capable of binding C1q showed a poorer allograft outcome (38.4 vs. 68.9%; $p = 0.041$). Moreover, in our multivariate predictive model for assessing the risk of allograft loss, the presence of C1q-binding DSA (HR 4.012; CI 95% 2.326–6.919; $p < 0.001$) but not of non-C1q-binding DSA (HR 1.389; CI 95% 0.784–2.461; $p = 0.260$) remained an independent predictor after stratifying the DSA population according to the C1q-binding ability and adjusting the model for other pre-transplantation predictive factors including donor age, cold-ischemia time, and HLA-DR mismatches. In conclusion, the unacceptable mismatch definition according to the SAB-C1q assay would improve the risk stratification of allograft loss and increase the limited allograft allocation of highly sensitized patients, shortening their waiting time.

Keywords: allograft-loss risk, C1q-binding antibodies, kidney allograft survival, kidney transplantation, preformed anti-HLA antibodies, single antigen beads assay

Abbreviations: AMR, antibody-mediated rejection; AUC, area under the curve; CDC, complement-dependent cytotoxicity; CI, confidence interval; DSA, donor-specific anti-HLA antibody; HLA, human leukocyte antigen; HR, hazard ratio(s); MFI, mean fluorescence intensity; PRA, panel reactive antibody; SAB, single antigen beads; VXM, virtual cross-match.

INTRODUCTION

The presence of preformed antibodies against human leukocyte antigen (HLA), and specifically against those antigens expressed by the organ donor (donor-specific anti-HLA antibodies, DSA), is strongly associated with an increased risk of rejection and premature allograft failure (1). Against this background, the identification of antibody specificities in recipients awaiting solid organ transplantation has become a worldwide indispensable clinical practice to accurately assign their unacceptable HLA-antigen mismatches (2).

The complement-dependent cytotoxicity (CDC) assay has been considered the gold-standard method to detect circulating alloantibodies, since Patel and Terasaki demonstrated its usefulness for allograft allocation (3). Nowadays, despite the fact that CDC assay detects the presence of anti-HLA antibodies, solid-phase assays, like single antigen bead (SAB-panIgG) by Luminex technology, have been consolidated as the main standard methods, given their higher sensitivity to detect lower level of alloantibodies (4). Therefore, the actual definition of unacceptable alleles and the introduction of the non-invasive virtual cross-match (VXM) according to SAB-panIgG assay have improved the transplantation success, avoiding the allograft damage of anti-HLA antibodies not detectable by CDC. However, the higher sensitivity of SAB-panIgG assay has also increased the number of highly sensitized patients in transplantation waiting lists, making the graft allocation for these recipient candidates more difficult (5). As a result, many highly sensitized patients, with poor clinical prognosis, could die while waiting for a suitable donor.

Desensitization protocols emerged as an approach to reduce the levels of anti-HLA antibodies and expand transplantation possibilities of highly sensitized patients by immunomodulating the immune response (6). These strategies range from the use of plasmapheresis or intravenous immunoglobulin to monoclonal antibodies directed against CD20⁺ cells or against the C5 complement factor (7). Although desensitization to HLA may enable short-term success in incompatible transplantation, preventing the high rates of rejection and obtaining a durable reduction of anti-HLA antibody level remain a challenge (8). Hence, many efforts have been concurrently focused on understanding the true pathogenicity of anti-HLA antibodies.

Accordingly, the presence of preformed anti-HLA antibodies has been evaluated by the different available methods of detection, being the clinical relevance of anti-HLA antibodies detected by highly sensitive tests in a negative CDC context under discussion. The studies published to date have been controversial. Some groups have found no correlation between allograft failure and the presence of preformed DSA detected by SAB-panIgG assay (9–11). Other studies, however, have shown that the presence of these antibodies, undetected by other less sensitive tests, are associated with an increased risk of rejection and lower allograft survival (12–14).

The major pathway of antibody-induced cytotoxicity occurs subsequent to the antibody-antigen interaction, resulting in the activation of the classical complement pathway. The ability to activate the complement cascade is likely to be the key determinant

of the pathogenic potential of many DSA (15). Hypothetically, antibodies with the ability to activate the complement cascade, among all antibodies detected by SAB-panIgG assay, could be more injurious to the allograft than those incapable of activating it (16, 17).

A new highly sensitive test has been developed to detect only the subset of anti-HLA antibodies capable of binding the first component of the human complement cascade, C1q (SAB-C1q assay) (18). Although information regarding SAB-C1q test results is still scarce, initial studies showed a high correlation between the presence of preformed C1q-binding DSA with early acute antibody-mediated rejection (AMR) and C4d staining in allograft biopsies (19, 20), thus supporting the general principle that antibodies capable of activating the complement cascade are the main antibodies involved in humoral rejection and allograft failure.

Given this possibility, our aim was to evaluate the clinical usefulness of SAB-C1q in the definition of immunological risk groups before transplantation. For this purpose, we retrospectively analyzed the impact of preformed DSA on allograft survival and allograft-loss risk in a single-kidney transplanted cohort, according to the C1q-binding ability.

MATERIALS AND METHODS

Patient Selection

A total of 389 local single-kidney transplanted patients from local-deceased donors between January 1995 and October 2009 at Reina Sofia University Hospital (Cordoba, Spain) with available serum samples adequate for Luminex analysis were included in this study. All transplants were ABO group compatible. A negative T-cell and B-cell CDC cross-match in pre-transplantation neat-serum was required for all recipients. Triple maintenance immunosuppression was variable, but all transplanted recipients received a calcineurine inhibitor (cyclosporine or tacrolimus) combined with a DNA synthesis inhibitor (azathioprine or mycophenolate mofetil) and low-dose of steroids. Exceptionally, some included patients were treated with rapamycin combined with tacrolimus and prednisone. Since 1998, high immunological risk patients [panel reactive antibody (PRA) >80%, re-transplant with rejection as failure of the first graft] were induced with a polyclonal anti-human thymocyte immunoglobulin (thymoglobulin) for the first 4–7 days. Acute rejections were treated with steroids bolus for three consecutive days; steroid-resistant rejections were usually treated with OKT3 and since 1998, with thymoglobulin. No desensitization protocols were implemented to any recipients, since they are only offered to patients receiving a living-donor transplant according to guidelines followed by our center. The follow-up time was 7 years. The study was approved by the Ethics Committee of the Reina Sofia University Hospital (ref. 2465).

Donor HLA Typing

All local donors were genotyped for the HLA-A, -B, -DRB1, and -DRB3/4/5 loci using a polymerase chain reaction sequence-specific oligonucleotide system (Dynal Reli SSO Test, Invitrogen

Corporation). For all kidney transplanted patients with preformed anti-HLA-DQ antibodies detected by SAB-panIgG assay, donor's HLA-DQB1 locus was retrospectively typed by molecular biology (Innolipa HLA-DQB1 typing kit; Innogenetics, Belgium).

Detection and Characterization of Donor-Specific Antibodies

Neat pre-transplant serum samples from the 389 patients included, preserved at -20°C , were retrospectively screened using first the Luminex Mixed Screen assay (LABScreen Mixed I/II One Lambda Inc.). Then, patients with a positive screen (normalized background ratio ≥ 1.5) were characterized for anti-HLA antibody specificities (Class I and/or Class II) using SAB-panIgG assay (LABScreen single antigen beads, One Lambda Inc.). Samples were analyzed on a Luminex platform (LABScan 100) using Luminex 100 IS version 2.3 as data acquisition software and Fusion 3.0 program (One Lambda) as analysis software. Then, using the information on donor HLA typing, a VXI was performed. Positive VXI was considered when detecting an antibody in the recipient's neat-serum against HLA-A, -B, -DRB1, -DRB3/4/5, or DQB1 donor's molecules. This antibody was defined as DSA. Since no data for donors' HLA-Cw and HLA-DP were available, anti-Cw and anti-DP antibodies were not considered in this study. In addition, patients' sera with positive VXI by SAB-panIgG assay were analyzed by SAB-C1q assay (One Lambda Inc.) to detect complement-binding antibodies. Positive antibodies against a donor HLA antigen detected in this last test were considered C1q-binding DSA.

A cutoff for positive reactions was set at a baseline mean fluorescence intensity (MFI) value of $\geq 1,000$ in the standard SAB-panIgG and at a baseline MFI value of ≥ 500 in the SAB-C1q assay. Antibodies with a baseline MFI value of $\geq 10,000$ were considered high-MFI antibodies. All assays were performed according to the manufacturer's instructions. The methodology of this study is illustrated in Figure S1 in Supplementary Material.

Statistical Analysis

Patients' characteristics were summarized using mean and SDs for the description of continuous variables, and total number and percentage for the description of non-continuous variables. The Student's *t*-test was used to compare parametric quantitative data, while the Mann-Whitney *U* test was used to compare non-parametric quantitative data. The χ^2 test, or Fisher's *F* when required, was used to compare qualitative data. The Kolmogorov-Smirnov test was used as normality test. Pearson's correlation was used to determine the association between high-strength antibodies and C1q-binding ability.

Allograft survival was analyzed since the time of transplantation up to 7 years with kidney allograft loss as the event of interest. Allograft loss was defined as return to dialysis. Data on graft survival were censored at the time of death. Kidney allograft survivals were plotted on Kaplan-Meier curves and compared according to the preformed anti-HLA antibody status using the log-rank test. The rejection incidence was not evaluated due to the heterogeneity in the diagnostic criteria throughout the study period.

Multivariate Cox regression was used to quantify hazard ratio(s) (HR) and 95% confidence intervals (CI) for kidney allograft loss. Collinearity tests were performed to ensure the independence of predictive and confounding variables. Receiver operator characteristic curves and area under the curve (AUC) were used to study models' characteristics.

p Values lower than 0.05 were regarded as statistically significant.

RESULTS

Patients' Characteristics

The entire population ($n = 389$) was stratified into two groups according to the presence or absence of preformed DSA retrospectively detected by the standard SAB-panIgG assay. The DSA+ group comprised 92 (23.7%) patients who tested positive for the presence of preformed DSA, whereas the DSA- group included 297 (76.3%) patients who were negative. The clinical and immunological characteristics of both groups are shown in **Table 1**. When analyzing classical sensitization pathways against HLA molecules, a higher percentage of females (58.7 vs. 29.3%; $p < 0.001$), blood-transfused patients (71.7 vs. 38.7%; $p < 0.001$), and re-transplanted patients (41.3 vs. 6.4%; $p < 0.001$) were found in the DSA+ group compared to the DSA- group. Regarding the increased risk for developing anti-HLA antibodies, patients belonging to the DSA+ group had a higher PRA by CDC at time of transplantation (21.7 vs. 2.2; $p < 0.001$). Moreover, probably due to the difficulty of finding a suitable donor for these patients, their waiting time (years) was longer (8.0 vs. 3.8; $p < 0.001$). No statistically significant differences were found with regard to the other studied characteristics shown in **Table 1**.

The 92 patients with preformed DSA were further stratified according to the DSA C1q-binding ability. Sixty-two (67.4%) DSA+ patients tested negative in SAB-C1q assay. These patients comprised the non-C1q-binding DSA group (DSA+/C1q-). The other 30 (32.6%) patients testing positive in SAB-C1q assay comprised the C1q-binding-DSA group (DSA+/C1q+). **Table 1** also shows the clinical and immunological characteristics of both groups. We found a higher percentage of re-transplanted patients in the DSA+/C1q+ group compared to the DSA+/C1q- group (56.7 vs. 33.9%; $p = 0.037$). Probably as a consequence of previous transplants, which is the main sensitization pathway against HLA molecules (21), those patients had a significantly higher PRA by CDC and calculated PRA by SAB-panIgG assay (36.3 vs. 14.5; $p = 0.005$ and 97.7 vs. 81.1; $p < 0.001$). No statistically significant differences were found with regard to the other studied characteristics.

Kidney Allograft Survival

Kaplan-Meier curves for kidney allograft survival according to the presence or absence of preformed DSA at time of transplantation are shown in **Figure 1A**. Patients with preformed DSA had significantly worse 7-year allograft survival than patients without preformed DSA (62.9 vs. 79.1%; $p = 0.001$). However, when the population with preformed DSA was categorized according to the DSA C1q-binding ability (**Figure 1B**), patients with preformed C1q-binding DSA had significantly the worst allograft survival

TABLE 1 | Clinical and immunological patient characteristics according to the donor-specific anti-HLA antibody (DSA) status at time of transplantation.

	Pre-transplantation anti-human leukocyte antigen (HLA) antibody status						Total cohort (n = 92)	p ^a
	DSA–		Total cohort (n = 297)	DSA+		p ^b		
	Anti-HLA– (n = 238)	Anti-HLA+/non-DSA (n = 59)		DSA+/C1q– (n = 62)	DSA+/C1q+ (n = 30)			
Donors								
Age, mean (SD)	50.6 (17.1)	45.9 (17.3)	49.7 (17.2)	44.3 (17.9)	49.7 (20.2)	0.197	46.1 (18.8)	0.084
Cold-ischemia time (h), mean (SD)	17.8 (7.2)	17.2 (7.3)	17.7 (7.2)	17.2 (7.7)	18.9 (7.0)	0.307	17.8 (7.5)	0.927
Recipients								
Age, mean (SD)	49.1 (13.7)	47.1 (12.6)	48.7 (13.5)	45.6 (13.3)	48.8 (15.3)	0.305	46.7 (14.0)	0.219
Females, n (%)	67 (28.2)	20 (33.9)	87 (29.3)	35 (56.5)	19 (63.3)	0.530	54 (58.7)	<0.001
Re-transplanted patients, n (%)	8 (3.4)	11 (18.6)	19 (6.4)	21 (33.9)	17 (56.7)	0.037	38 (41.3)	<0.001
Blood-transfused patients, n (%)	82 (34.4)	34 (57.6)	115 (38.7)	46 (74.2)	20 (66.7)	0.452	66 (71.7)	<0.001
Time on waiting list (years), mean (SD)	3.3 (3.6)	5.6 (4.7)	3.8 (4.0)	8.5 (7.0)	7.0 (5.3)	0.317	8.0 (6.5)	<0.001
HLA-A, -B, -DR mismatches, mean (SD)	3.2 (1.3)	2.9 (1.0)	3.2 (1.2)	3.1 (1.1)	3.6 (1.1)	0.089	3.2 (1.1)	0.474
Anti-calcineurin drugs						0.869		0.971
Tacrolimus	132 (55.5)	32 (54.2)	164 (55.2)	34 (54.8)	17 (56.7)		51 (55.4)	
Cyclosporine	106 (44.5)	27 (45.8)	133 (44.8)	28 (45.2)	13 (43.3)		41 (44.6)	
Maintenance immunosuppressant triple therapy ^c						0.874		0.979
A, n (%)	164 (68.9)	36 (61.0)	200 (67.3)	42 (67.7)	21 (70.0)		63 (68.5)	
B, n (%)	59 (24.8)	21 (35.6)	80 (26.9)	17 (27.4)	7 (23.3)		24 (26.1)	
C, n (%)	15 (6.3)	2 (3.4)	17 (5.7)	3 (4.8)	2 (6.7)		5 (5.4)	
Pre-transplantation anti-HLA antibodies						n/c ^d		n/c ^d
Non-antibodies, n (%)	238		238 (80.1)	–	–			
Class I, n (%)	–	42 (71.2)	42 (14.1)	24 (38.7)	3 (10.0)		27 (29.3)	
Class II, n (%)	–	3 (5.1)	3 (1.0)	12 (19.4)	3 (10.0)		15 (16.3)	
Class I and II, n (%)	–	14 (23.7)	14 (4.7)	26 (41.9)	24 (80.0)		50 (54.3)	
Pre-transplantation ^e PRA by CDC, mean (SD)	–	5.5 (13.4)	2.2 (9.6)	14.5 (24.2)	36.3 (36.9)	0.005	21.7 (30.5)	<0.001
Pre-transplantation ^f cPRA, mean (SD)	–	39.4 (31.3)	7.8 (21.0)	81.1 (26.4)	97.7 (3.3)	<0.001	86.5 (23.1)	<0.001
Preformed DSA						0.253		
Against Class I, n (%)	–	–	–	42 (67.7)	16 (63.0)			
Against Class II, n (%)	–	–	–	18 (29.0)	11 (31.5)			
Against Class I and II, n (%)	–	–	–	2 (3.3)	3 (5.4)			

^ap value calculated for the comparison between DSA– (n = 297) and DSA+ (n = 92) groups.

^bp value calculated for the comparison between DSA+/C1q– (n = 62) and DSA+/C1q+ (n = 30) groups.

^cTriple immunosuppressant therapy consisted of calcineurine inhibitor + mycophenolate mofetil + corticosteroids (A); calcineurine inhibitor + azathioprine + corticosteroids (B); calcineurine inhibitor + mTor inhibitor + corticosteroids (C).

^dNon-compared characteristics.

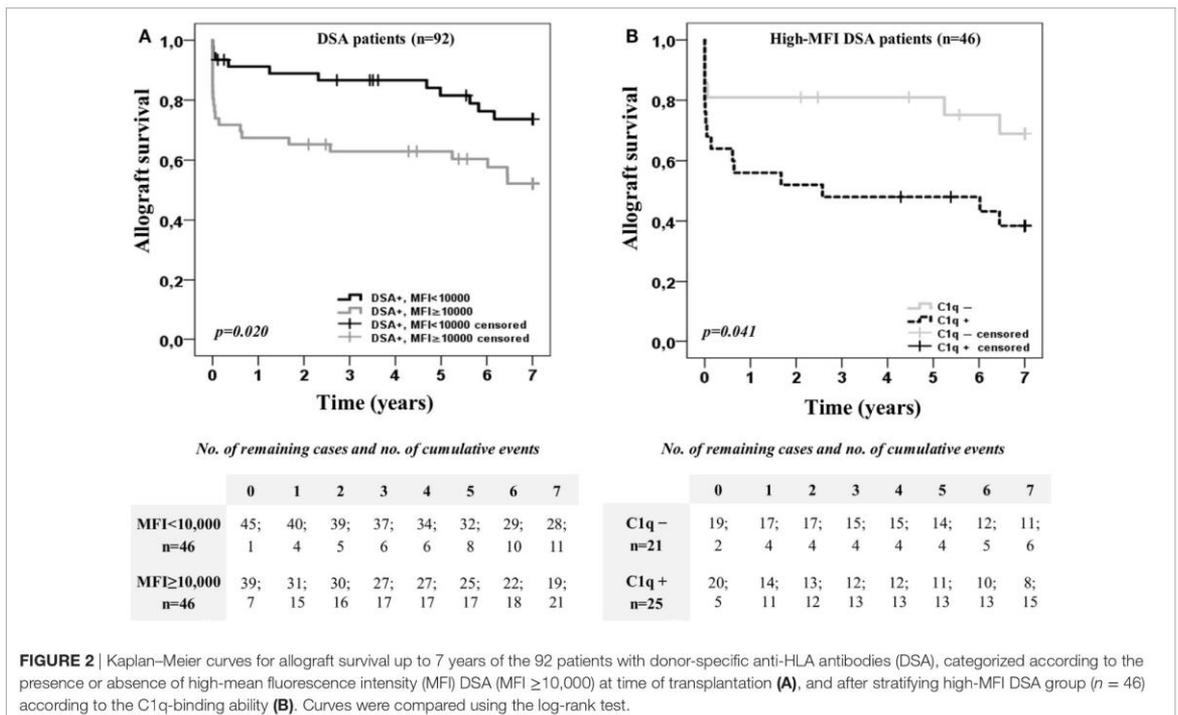
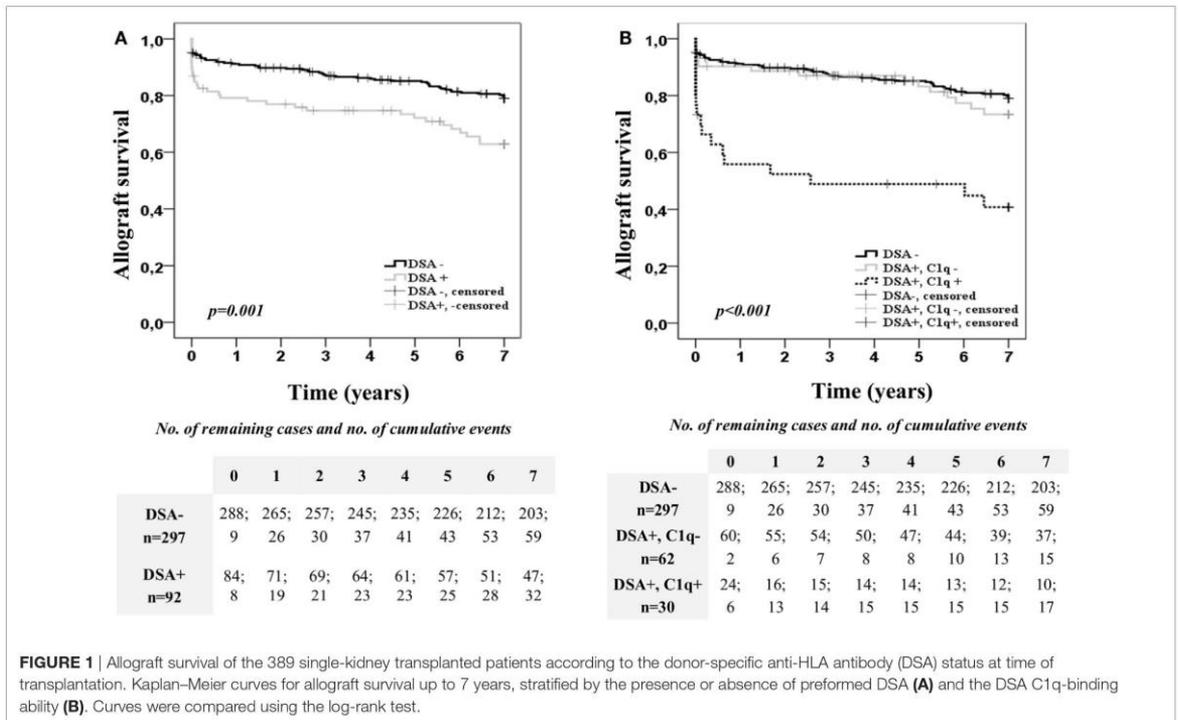
^ePre-transplantation panel reactive antibody (PRA) value at time of transplantation, calculated by complement-dependent cytotoxicity (CDC) assay.

^fCalculated panel reactive antibody (cPRA) value at time of transplantation, retrospectively calculated according to unacceptable antigens detected by SAB-panIgG assay using OPTN database.

among the study population. Thus, at the end of the follow-up time, only the 40.7% of patients with preformed C1q-binding DSA maintained their allograft functioning, whereas allograft function was maintained in the 73.4% of patients with preformed non-C1q-binding DSA ($p = 0.001$) and in the 79.1% of patients without preformed DSA ($p < 0.001$). Interestingly, 7-year allograft survival rate was similar between patients with preformed non-C1q-binding DSA and patients without preformed DSA ($p = 0.403$). When we examined allograft survival in the C1q-binding DSA population according to the presence of preformed DSA against Class I and/or Class II HLA molecules (Figure S2A in Supplementary Material), we did not find differences ($p = 0.862$).

Furthermore, we explored the impact on allograft outcome of the C1q-binding ability considering also the DSA MFI value obtained by the standard SAB-panIgG (Figure 2). For this

purpose, the DSA population was first categorized according to the presence or absence of high-MFI DSA (MFI $\geq 10,000$) at time of transplantation. Kaplan–Meier curves for allograft survival according to the presence or absence of high-MFI DSA are plotted in Figure 2A. As expected, patients with preformed high-MFI DSA had lower allograft survival rate than the other DSA recipients (52.1 vs. 73.7%; $p < 0.020$). Then, we analyzed allograft survival up to 7 years of the high-MFI DSA group ($n = 46$), which was stratified according to the DSA C1q-binding ability (Figure 2B). Interestingly, patients with C1q-binding DSA showed a poorer allograft survival compared to patients with non-C1q-binding DSA (38.4 vs. 68.9%; $p = 0.041$), despite the fact that preformed DSA of both groups had a high-MFI value. No differences were found ($p = 0.988$) when high-MFI C1q-binding DSA were stratified according to the type of HLA



molecules (Class I and/or Class II) against which they were directed (Figure S2B in Supplementary Material).

Risk of Allograft Loss

We studied the association of clinical and immunological factors with allograft loss in a univariate analysis by Cox regression (Table 2). The significant pre-transplantation predictive factors identified were then introduced by *forward conditional* method in a multivariate Cox model (Table 3). Donor age, cold-ischemia time, HLA-DR mismatches ≥ 1 , and the presence of DSA remained independent predictive variables in the multivariate analysis (Table 3, A). The adjusted-risk of allograft failure was more than double in recipients with DSA at time of transplantation (HR 2.133; CI 95% 1.379–3.300; $p = 0.001$). However, when the DSA population was subsequently stratified according to the DSA C1q-binding ability (Table 3, B), only the subset of patients with preformed C1q-binding DSA showed a significantly increased adjusted-risk of allograft loss compared to patients without DSA (HR 4.012; CI 95% 2.326–6.919; $p < 0.001$). Interestingly, we did not find significant differences at any point throughout the follow-up time between patients with preformed non-C1q-binding DSA and patients without DSA, regarding allograft loss adjusted-risk (HR 1.389; CI 95% 0.784–2.461; $p = 0.260$).

Both multivariate predictive models were explored by receiver operator characteristic analysis. AUC was 0.704 (CI 95%, 0.645–0.763) for the conventional predictive model based on the presence of DSA detected by the standard SAB-panIgG assay (Table 3, A). The AUC of the model which included the DSA C1q-binding ability (Table 3, B) became enhanced (AUC = 0.725; CI 95%, 0.665–0.782). In addition, we explored the predictive value of a multivariate model considering the presence of high-MFI DSA (MFI $\geq 10,000$) at time of transplantation (Table S1 in Supplementary Material). The AUC of this model was lower than the model based on the presence of C1q-binding DSA (AUC = 0.711; CI 95%, 0.652–0.770).

Antibody MFI Value and C1q Reactivity

A total of 9,898 data points, from neat-serum sample analyses belonging to the 92 patients with preformed DSA and representing single Luminex beads, were displayed in a log-scale scatter plot according to their MFI value (baseline) obtained by SAB-panIgG assay and their respective MFI value obtained by SAB-C1q assay (Figure 3). Among 4,191 positive beads detected by SAB-panIgG, 932 (22.2%) were also positive in SAB-C1q assay, whereas 3,259 (77.8%) tested negative. Nine out of 941 positive beads in SAB-C1q assay were not detectable as positive in the standard SAB-panIgG assay. The MFI average of positive antibodies capable of binding C1q was significantly higher than that of positive antibodies incapable of binding C1q (18,816 vs. 6,495; $p < 0.001$). Among 941 C1q-binding antibodies, 869 (92.3%) showed a neat-serum MFI value of $\geq 10,000$ in the standard SAB-panIgG assay and only 72 of them (7.7%) showed a neat-serum MFI value below 10,000. The correlation between MFI values of each bead obtained using both tests was of 0.666 (Pearson's correlation). In addition, the correlation between the presence of antibodies with high-MFI value (MFI $\geq 10,000$) in SAB-panIgG assay and their positivity in SAB-C1q assay (MFI ≥ 500) was of 0.661 (Pearson's correlation).

TABLE 2 | Pre-transplantation clinical and immunological risk factors associated with allograft loss.

Factor	No. of patients	Hazard ratio(s) (HR)	CI 95%	p
Donor age (per 1 year of increment)	389	1.016	1.003–1.030	0.015
Cold-ischemia time (per 1 h of increment)	389	1.055	1.028–1.082	<0.001
Recipient age (per 1 year of increment)	389	0.993	0.978–1.008	0.349
Sex female				
No	248	1.00		
Yes	141	1.475	0.975–2.232	0.066
Re-transplantation				
No	332	1.00		
Yes	57	2.259	1.407–3.626	0.001
Time on waiting list (per 1 year of increment)	389	1.025	0.987–1.064	0.200
Human leukocyte antigen (HLA)-A, -B mismatches (per 1 mismatch of increment)	389	1.143	0.927–1.409	0.211
HLA-DR mismatches ≥ 1				
No	119	1.00		
Yes	270	1.929	1.152–3.232	0.013
Anti-calcineurin drugs				
Tacrolimus	215	1.00		
Cyclosporine	174	0.962	0.636–1.456	0.856
Triple maintenance immunosuppressant therapy				
Calcineurine inhibitor + MMF + Pred	263	1.00		–
Calcineurine inhibitor + Aza + Pred	104	1.133	0.720–1.785	0.589
Calcineurine inhibitor + Rapamycin + Pred	22	0.759	0.276–2.088	0.593
Induction therapy*				
No	347	1.00		
Yes	42	1.580	0.878–2.843	0.127
cPRA^b	389	1.010	1.005–1.015	<0.001
Presence of DSA				
No	297	1.00		
Yes	92	2.009	1.306–3.091	0.002
Presence of DSA and C1q-binding ability				
No-DSA	297	1.00	–	–
Non-C1q-binding DSA	62	1.270	0.720–2.238	0.409
C1q-binding DSA	30	4.160	2.420–7.151	<0.001

Univariate Cox analysis.

CI, confidence interval; MMF, mycophenolate mofetil, Pred, prednisone; Aza, azathioprine.

*Induction treatment consisted of thymoglobulin.

^bCalculated panel reactive antibody (cPRA) value at time of transplantation, retrospectively calculated according to unacceptable antigens detected by SAB-panIgG assay using OPTN database.

DISCUSSION

In this retrospective study, 389 single-kidney transplanted patients were carefully characterized according to the presence of preformed DSA and the DSA C1q-binding ability, using SAB-panIgG and SAB-C1q assays as antibody detection tests. Our results showed that patients with preformed C1q-binding DSA had worse 7-year allograft survival than patients with non-C1q-binding DSA or without DSA. Interestingly, among the high-MFI

TABLE 3 | Risk allograft-loss assignment according to the presence of DSA at time of transplantation (A) and the DSA C1q-binding ability (B) after the adjustment for other clinical and immunological pre-transplantation predictive factors including donor age, cold-ischemia time, and human leukocyte antigen (HLA)-DR mismatches.

Multivariate Cox regression*	No. of patients	Hazard ratio(s) (HR)	CI 95%	p
Donor age (per 1 year of increment)	389	1.016	1.003–1.029	0.014
Cold-ischemia time (per 1 h of increment)	389	1.054	1.028–1.082	<0.001
HLA-DR mismatches \geq1				
No	119	1.00	–	–
Yes	270	1.896	1.129–3.851	0.016
Model A				
Presence of DSA (at time of transplantation)				
No	297	1.00		
Yes	92	2.133	1.379–3.300	0.001
Model B				
Presence of DSA and C1q-binding ability				
No-DSA	297	1.00		
Non-C1q-binding DSA	62	1.389	0.784–2.461	0.260
C1q-binding DSA	30	4.012	2.326–6.919	<0.001

Multivariate model by Cox regression.

*The significant predictive factors in the univariate analysis were introduced by forward conditional method in the multivariate analysis.

CI, confidence interval.

DSA population, those patients whose DSA were further capable of binding C1q showed a poorer outcome. Moreover, in our multivariate predictive model for assessing the risk of allograft loss, only the presence of the C1q-binding DSA subset remained an independent predictor after stratifying the DSA population according to the C1q-binding ability and adjusting the model for other pre-transplantation predictive factors, including donor age, cold-ischemia time, and HLA-DR mismatches.

Since the development of highly sensitive solid-phase tests, the presence of DSA detected by SAB-panIgG assay, under a negative CDC cross-match context, has been associated with poor transplant prognoses (22–24). Consistent with these findings, our results indicate that the presence of preformed DSA increases the risk of allograft loss, supporting the theory that these antibodies damage the allograft. In addition, our study also reveals that not all preformed DSA detected by SAB-panIgG assay are equally pathogenic, suggesting that the significant injury on allograft occurs mainly when preformed C1q-binding DSA are present.

The role of DSA according to the C1-binding ability has previously been evaluated, remaining one of the main investigation lines of humoral response against transplanted allografts. Several studies have demonstrated that the *de novo* appearance of C1q-binding DSA after transplantation is strongly associated with worse allograft outcome. Loupy et al. (25) reported that the presence of C1q-binding DSA was associated with an increased rate of AMR, more severe graft injury phenotypes and an increased risk of allograft loss. Previously, Sutherland et al. (26) had already demonstrated the greater risk of allograft loss of *de novo* C1q-binding DSA. In the same line, Piazza et al. (27) showed that the presence of C1q-binding, but not non-C1q-binding *de novo* DSA was a biomarker of worse transplant outcome. More recent studies have found that the development of AMR and the subsequent allograft injury occurs mainly in the presence of C1q-binding DSA (28, 29). However, despite the growing evidence about the harmful role that C1q-binding DSA play on transplant outcome, supported by the theoretical

higher ability of these antibodies to activate the *in vivo* complement cascade, the clinical usefulness of SAB-C1q assay in the pre-transplantation allograft allocation has not been accurately determined.

Authors analyzing the clinical relevance of the pre-transplant C1q-binding ability have reported controversial results. While initial studies evaluating the usefulness of SAB-C1q assay in heart-transplanted recipients showed a strong association between preformed C1q-binding DSA and the risk of AMR and premature allograft loss (19, 20), subsequent studies discussed its clinical use for allograft allocation. Otten et al. (30) could not assess the clinical significance of C1q-binding DSA regarding allograft survival due to the low prevalence of sera scoring DSA-positive in the SAB-C1q assay. Crespo et al. (31), and more recently, Thammanichanond et al. (32) in small cohorts of patients with DSA (28 and 48, respectively) did not find any association between allograft outcome and the presence of C1q-binding or non-C1q-binding DSA, suggesting a limited predictive value for SAB-C1q assay. However, these studies did not provide any data about the theoretically pathological role caused by non-C1q-binding DSA with regard to a control population without DSA.

The present report, evaluating 92 transplanted patients with preformed DSA, demonstrates that the severe effect on allograft function is caused when preformed DSA are able to bind complement and provides evidence of their limited impact when they are non-C1q-binding DSA. Interestingly, SAB-C1q assay allowed us to define groups of patients with different allograft survival among those with preformed high-MFI DSA (**Figure 2B**), whereas allograft survival of non-C1q-binding DSA recipients was similar ($p = 0.457$) regardless of the MFI value (Figure S3 in Supplementary Material). Taken together, these data suggest that the neat-serum MFI value alone, which only offers a semi-quantitative measured of antibody level at best (33), is not entirely reliable for predicting transplant outcome, thus other antibody properties, such as the C1q-binding ability, should be considered. Moreover, our results support recent findings

showing that SAB-C1q assay improves the AMR prediction with regard to the MFI value (34), assuming the strong association between AMR and allograft failure (35). The use of SAB-C1q assay within a sensitized population could provide added value to the conventional immunological risk stratification based on the MFI value of DSA.

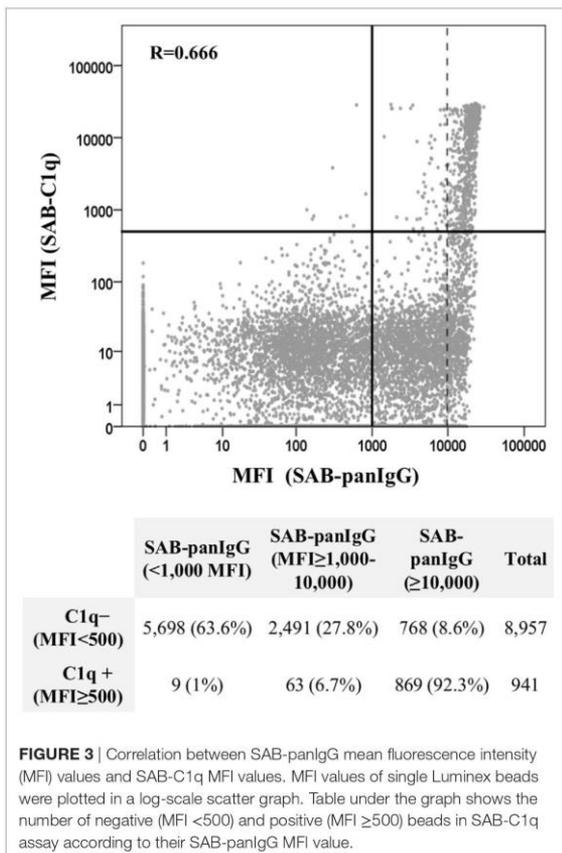
Not surprisingly, the C1q-binding ability was a characteristic mainly found in beads showing high MFI values in the standard SAB-panIgG assay (Figure 3). In this regard, other authors have already shown that the ability to bind C1q is linked to the antibody strength (20, 28). However, this association is far from perfect when the antibody strength is assigned using the neat-serum MFI value and either low-MFI but C1q-binding antibodies or high-MFI but non-C1q-binding antibodies may be detected, as depicted in Figure 3. The detection of low-MFI antibodies capable of binding C1q is commonly a consequence of a prozone effect, a phenomenon that hides the real strength of antibodies (20). The treatment of neat-samples with EDTA or dithiothreitol may somewhat eliminate this inhibitory effect (36), which would enhance the relationship between the antibody C1q-binding ability and its MFI value. Conversely, high-MFI antibodies incapable of binding C1q could denote low antibody strength, as reported by Tambur et al. (37), who using serum serial dilutions for

anti-HLA antibody detection provided a more reliable estimation of their real strength (titer) and demonstrated a strong association between low antibody titers and the inability to bind C1q. The SAB-C1q assay, as well as titration studies, enables the real strength of antibodies to be unmasked.

Otherwise, given the different avidity for the C1q protein complex exhibited by the four IgG subclasses (38), the IgG isotype pattern of a particular antibody is determinant for its potential C1q-binding ability. Until now, IgG subclass studies showed that anti-HLA antibodies are not usually comprised of a unique IgG subclass but of a variable mixture of them, IgG1 being by far the most common (39–42). Arguably, the direct correlation between the antibody real strength (titer) detected by SAB-panIgG assay and their C1q-binding ability could be largely explained by the high prevalence of IgG1, as the immunodominant subclass. Emerging evidence supports that the differences between C1q- and non-C1q-binding antibodies are not usually due to the quality but to the quantity (titer) of the IgG subclasses comprising them (20, 28, 37, 41, 42). Indeed, a negative SAB-C1q assay result does not mean that the antibody investigated was composed of isotypes without the biological capacity to activate the complement, as would be expected, but that it may contain a certain amount of strong C1q-binding IgG subclasses (41).

Only in the form of hexamers *via* Fc:Fc non-covalent interactions, IgG is endowed to bind the C1q component and assemble C1q:IgG₆ complexes (43, 44). This status implies that a critical antibody density bound to its target antigen is needed to provide a sufficiently avid C1q-binding site, what supports the close relationship between C1q-binding ability and antibody strength (titer). A low titer of specific IgG subclasses (IgG1/IgG3) comprising a particular anti-HLA antibody would not be enough to conform the hexameric complexes on the antigens of Luminex beads, preventing the efficient recruitment of C1q and its subsequent detection by SAB-C1q assay. All evidence described seems to indicate that the strength (titer) of strong C1q-binding subclasses, mainly IgG1, is the major limiting factor for the anti-HLA antibody C1q-binding status assignment. Considering the low prevalence of isolated IgG2 and/or IgG4 subclasses described in previous reports, the *per se* anti-HLA antibody inability to bind C1q seems to be uncommon (39, 41, 42).

The kinetics of IgG hexamerization is a concentration-dependent dynamic process (44). Thus, we hypothesize that the lower impact on allograft outcome of non-C1q-binding DSA observed in our cohort could be a consequence of the low titer of strong C1q-binding isotypes comprising them, which would not reach the critical threshold to efficiently recruit the C1q protein and trigger the complement cascade *in vivo*, the major pathway of antibody-mediated injury (15). Similarly, the absence of strong C1q-binding subclasses in a low proportion of non-C1q-binding antibodies could also limit their harmful impact on the allograft. The characterization of DSA as non-C1q-binding antibodies is not strictly associated with low antibody strength, because a high level of non-C1q-binding subclasses may be present. This fact explains the not completely perfect correlation between the C1q-binding ability and the antibody titer and suggests that the real strength (titer) does not provide exactly the same information as



the ability to bind C1q. Both properties (titer and C1q-binding ability) should be integrated in future analyses to provide more valuable insights into the assessment of the immunological risk of anti-HLA antibodies.

It is well established that DSA are responsible for allograft damage through a wide spectrum of effector functions, which range from complement activation to FcγR-dependent macrophage and NK cell functions (45). Recent findings have associated the presence of circulating DSA-IgG4 with subclinical AMR and later allograft injury characterized by a predominance of chronic histological features (42), which supports that even in the absence of complement activation, antibodies may lead to non-complement-mediated chronic allograft damage (46). From this perspective, all DSA, regardless of their C1q-binding ability, should ideally be avoided, but unfortunately, this is not a plausible option for an increasing proportion of highly sensitized patients. Developing desensitization protocols to reduce the incidence of rejection and maintain low levels of antibodies for long periods of time, optimizing the allograft exchange programs and improving our understanding of the pathogenicity of antibodies are future challenges to ensure the success of transplantation in highly sensitized patients. Since our study identifies different groups of risk based on the C1q-binding ability of DSA, we postulate a new pre-transplantation and enhanced stratification algorithm. This new algorithm should be cautiously interpreted and should be particularly addressed to those patients whose transplantation possibilities are considerably limited.

Our study has limitations. First, it is observational and consequently does not provide complete information about the damaging pathways caused by anti-HLA antibodies, given the close relationship between preformed DSA and AMR revealed in different organ transplants by histopathological findings and functional manifestations (47). Since diagnostic criteria for allograft rejection varied over the time course of the study, the association between AMR and the C1q-binding ability could not be accurately ascertained. Second, we could not avoid the heterogeneity in the immunosuppressant treatments implemented, although this factor did not have a significant predictive value. Third, the non-inclusion of the presence of antibodies against HLA-Cw and -DP antigens could be a possible confounding factor in a proportion of patients, assuming their clinical relevance for allograft outcome (48). Finally, when we stratified the

study population according to the DSA C1q-binding status, the prevalence of patients with preformed C1q-binding DSA was low within the population analyzed. However, sample size was enough to find differences within the DSA group.

In conclusion, our report demonstrates that only preformed C1q-binding DSA represent a total contraindication to kidney transplantation. The clinical use of SAB-C1q assay for the identification of unacceptable mismatches would permit us to better stratify the risk of allograft loss. This new algorithm might increase the limited allograft allocation of highly sensitized patients, predefined by the standard SAB-panIgG assay, shortening the waiting time for these patients, many of them with poor prognosis due to severe associated clinical conditions.

ETHICS STATEMENT

This study was approved by the Ethics Committee of the Reina Sofia University Hospital (ref. 2465).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RS and JM performed the study design. M-LA, CR-H, and CA provided and acquired clinical data. JM and AN conducted the laboratory analysis and interpreted the results. JM performed the statistical analysis. JM and AN wrote the draft. AR-B, PA, and RS reviewed the final version. All authors: provided intellectual content, contributed to the article writing, and approved the final version.

ACKNOWLEDGMENTS

The publication of this work was co-financed by the PI16/01615 (to RS) from the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III) and by European Regional Development Funds (FEDER).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01310/full#supplementary-material>.

REFERENCES

1. Kismeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* (1966) 2(7465):662–5. doi:10.1016/S0140-6736(66)92829-7
2. Susal C, Roelen DL, Fischer G, Campos EF, Gerbase-DeLima M, Honger G, et al. Algorithms for the determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients. *Tissue Antigens* (2013) 82(2):83–92. doi:10.1111/tan.12137
3. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* (1969) 280(14):735–9. doi:10.1056/NEJM196904032801401
4. Tait BD. Detection of HLA antibodies in organ transplant recipients – triumphs and challenges of the solid phase bead assay. *Front Immunol* (2016) 7:570. doi:10.3389/fimmu.2016.00570
5. Bostock IC, Alberu J, Arvizu A, Hernandez-Mendez EA, De-Santiago A, Gonzalez-Tableros N, et al. Probability of deceased donor kidney transplantation based on % PRA. *Transpl Immunol* (2013) 28(4):154–8. doi:10.1016/j.trim.2013.05.002
6. Marfo K, Lu A, Ling M, Akalin E. Desensitization protocols and their outcome. *Clin J Am Soc Nephrol* (2011) 6(4):922–36. doi:10.2215/CJN.08140910
7. Wongsaraj P, Kahwaji J, Vo A, Jordan SC. Modern approaches to incompatible kidney transplantation. *World J Nephrol* (2015) 4(3):354–62. doi:10.5527/wjn.v4.i3.354
8. Abu Jawdeh BG, Cuffy MC, Alloway RR, Shields AR, Woodle ES. Desensitization in kidney transplantation: review and future perspectives. *Clin Transplant* (2014) 28(4):494–507. doi:10.1111/ctr.12335
9. van den Berg-Loonen EM, Billen EV, Voorter CE, van Heurn LW, Claas FH, van Hooff JP, et al. Clinical relevance of pretransplant donor-directed antibodies

- detected by single antigen beads in highly sensitized renal transplant patients. *Transplantation* (2008) 85(8):1086–90. doi:10.1097/TP.0b013e31816b3e1d
10. Phelan D, Mohanakumar T, Ramachandran S, Jendrisak MD. Living donor renal transplantation in the presence of donor-specific human leukocyte antigen antibody detected by solid-phase assay. *Hum Immunol* (2009) 70(8):584–8. doi:10.1016/j.humimm.2009.05.007
 11. Susal C, Ovens J, Mahmoud K, Dohler B, Scherer S, Ruhlenstroth A, et al. No association of kidney graft loss with human leukocyte antigen antibodies detected exclusively by sensitive Luminex single-antigen testing: a Collaborative Transplant Study report. *Transplantation* (2011) 91(8):883–7. doi:10.1097/TP.0b013e3182100f77
 12. Amico P, Hirt-Minkowski P, Honger G, Gurke L, Mihatsch MJ, Steiger J, et al. Risk stratification by the virtual crossmatch: a prospective study in 233 renal transplantations. *Transpl Int* (2011) 24(6):560–9. doi:10.1111/j.1432-2277.2011.01235.x
 13. Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, Tanriover B, Crew RJ, Dube G, et al. Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol* (2012) 23(12):2061–71. doi:10.1681/ASN.2012070664
 14. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins LS, Fonseca I, Beirao I, et al. Analysis of preformed donor-specific anti-HLA antibodies characteristics for prediction of antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transpl Immunol* (2015) 32(2):66–71. doi:10.1016/j.trim.2015.01.002
 15. Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nat Rev Nephrol* (2012) 8(11):670–8. doi:10.1038/nrneph.2012.212
 16. Tyan DB. New approaches for detecting complement-fixing antibodies. *Curr Opin Organ Transplant* (2012) 17(4):409–15. doi:10.1097/MOT.0b013e328355fb9b
 17. Lawrence C, Willcombe M, Brookes PA, Santos-Nunez E, Bajaj R, Cook T, et al. Preformed complement-activating low-level donor-specific antibody predicts early antibody-mediated rejection in renal allografts. *Transplantation* (2013) 95(2):341–6. doi:10.1097/TP.0b013e3182743cfa
 18. Chen G, Sequeira F, Tyan DB. 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):849–58. doi:10.1016/j.humimm.2011.07.001
 19. Chin C, Chen G, Sequeira F, Berry G, Siehr S, Bernstein D, et al. Clinical usefulness of a novel C1q assay to detect immunoglobulin G antibodies capable of fixing complement in sensitized pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* (2011) 30(2):158–63. doi:10.1016/j.healun.2010.08.020
 20. Zeevi A, Lunz J, Feingold B, Shullo M, Bermudez C, Teuteberg J, et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* (2013) 32(1):98–105. doi:10.1016/j.healun.2012.09.021
 21. Lopes D, Barra T, Malheiro J, Tafulo S, Martins L, Almeida M, et al. Effect of different sensitization events on HLA alloimmunization in kidney transplantation candidates. *Transplant Proc* (2015) 47(4):894–7. doi:10.1016/j.transproceed.2015.03.014
 22. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* (2010) 21(8):1398–406. doi:10.1681/ASN.2009101065
 23. Caro-Oleas JL, Gonzalez-Escribano MF, Gonzalez-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chaves V, Gentil-Govantes MA, et al. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* (2012) 27(3):1231–8. doi:10.1093/ndt/gfr429
 24. Tsapepas DS, Vasilescu R, Tanriover B, Coppleson Y, Rekhtman Y, Hardy MA, et al. Preformed donor-specific antibodies and risk of antibody-mediated rejection in repeat renal transplantation. *Transplantation* (2014) 97(6):642–7. doi:10.1097/TP.0000440954.14510.6a
 25. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* (2013) 369(13):1215–26. doi:10.1056/NEJMoa1302506
 26. Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB. Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant* (2012) 16(1):12–7. doi:10.1111/j.1399-3046.2011.01599.x
 27. Piazza A, Poggi E, Ozzella G, Adorno D. Post-transplant development of C1q-positive HLA antibodies and kidney graft survival. *Clin Transpl* (2013):367–75.
 28. Yell M, Muth BL, Kaufman DB, Djamali A, Ellis TM. C1q binding activity of de novo donor-specific HLA antibodies in renal transplant recipients with and without antibody-mediated rejection. *Transplantation* (2015) 99(6):1151–5. doi:10.1097/TP.0000000000000699
 29. Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, Savchik C, Masiakos P, Colovai A, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. *Kidney Int* (2016) 89(1):209–16. doi:10.1038/ki.2015.275
 30. Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, Hene RJ, van Zuielen AD. 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):1618–23. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03985.x
 31. Crespo M, Torio A, Mas V, Redondo D, Perez-Saez MJ, Mir M, et al. Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: does C1q-fixation matter? *Transpl Immunol* (2013) 29(1–4):28–33. doi:10.1016/j.trim.2013.07.002
 32. Thammanichanon D, Wiwatanathum P, Mongkolsuk T, Kantachuesiri S, Worawichawong S, Vallipakorn SA, et al. Role of pretransplant complement-fixing donor-specific antibodies identified by C1q assay in kidney transplantation. *Transplant Proc* (2016) 48(3):756–60. doi:10.1016/j.transproceed.2015.12.116
 33. Gebel HM, Bray RA. HLA antibody detection with solid phase assays: great expectations or expectations too great? *Am J Transplant* (2014) 14(9):1964–75. doi:10.1111/ajt.12807
 34. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins S, Fonseca I, Beirao I, et al. Determining donor-specific antibody C1q-binding ability improves the prediction of antibody-mediated rejection in human leukocyte antigen-incompatible kidney transplantation. *Transpl Int* (2017) 30(4):347–59. doi:10.1111/tri.12873
 35. Puttarajappa C, Shapiro R, Tan HP. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. *J Transplant* (2012) 2012:193724. doi:10.1155/2012/193724
 36. Schinstock CA, Gandhi MJ, Stegall MD. Interpreting anti-HLA antibody testing data: a practical guide for physicians. *Transplantation* (2016) 100(8):1619–28. doi:10.1097/TP.0000000000001203
 37. Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KM, Cusick MF, Gordon RA, Leventhal JR, et al. Assessing antibody strength: comparison of MFI, C1q, and titer information. *Am J Transplant* (2015) 15(9):2421–30. doi:10.1111/ajt.13295
 38. Valenzuela NM, Hickey MJ, Reed EF. Antibody subclass repertoire and graft outcome following solid organ transplantation. *Front Immunol* (2016) 7:433. doi:10.3389/fimmu.2016.00433
 39. Honger G, Hopfer H, Arnold ML, Spriewald BM, Schaub S, Amico P. Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection. *Transplantation* (2011) 92(1):41–7. doi:10.1097/TP.0b013e31821cd0fd
 40. Lowe D, Higgins R, Zehnder D, Briggs DC. Significant IgG subclass heterogeneity in HLA-specific antibodies: implications for pathogenicity, prognosis, and the rejection response. *Hum Immunol* (2013) 74(5):666–72. doi:10.1016/j.humimm.2013.01.008
 41. Schaub S, Honger G, Koller MT, Liwski R, Amico P. Determinants of C1q binding in the single antigen bead assay. *Transplantation* (2014) 98(4):387–93. doi:10.1097/TP.0000000000000203
 42. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentlejewski C, Duong van Huyen JP, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG donor-specific anti-human HLA antibody subclasses and kidney allograft antibody-mediated injury. *J Am Soc Nephrol* (2016) 27(1):293–304. doi:10.1681/ASN.2014111120
 43. Diebold CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* (2014) 343(6176):1260–3. doi:10.1126/science.1248943
 44. Wang G, de Jong RN, van den Bremer ET, Beurskens FJ, Labrijn AF, Ugurlar D, et al. Molecular basis of assembly and activation of complement component C1 in complex with immunoglobulin G1 and antigen. *Mol Cell* (2016) 63(1):135–45. doi:10.1016/j.molcel.2016.05.016
 45. Thomas KA, Valenzuela NM, Reed EF. The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcγmabRs, and endothelium in transplant rejection. *Trends Mol Med* (2015) 21(5):319–29. doi:10.1016/j.molmed.2015.02.004

46. Viglietti D, Lefaucheur C, Glotz D. Evidence for an important role of both complement-binding and noncomplement-binding donor-specific antibodies in renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* (2016) 21(4):433–40. doi:10.1097/MOT.0000000000000324
47. Matsuda Y, Sarwal MM. Unraveling the role of allo-antibodies and transplant injury. *Front Immunol* (2016) 7:432. doi:10.3389/fimmu.2016.00432
48. Bachelet T, Martinez C, Del Bello A, Couzi L, Keiji S, Guidicelli G, et al. Deleterious impact of donor-specific anti-HLA antibodies toward HLA-Cw and HLA-DP in kidney transplantation. *Transplantation* (2016) 100(1): 159–66. doi:10.1097/TP.0000000000000821

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Molina, Navas, Agüera, Rodelo-Haad, Alonso, Rodríguez-Benot, Aljama and Solana. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





