

Estudio de factores serológicos y de activación celular como biomarcadores precoces del rechazo mediado por anticuerpos en trasplante renal



TESIS DOCTORAL

Realizada por

JUAN IRURE VENTURA

Dirigida por

Marcos López Hoyos

David San Segundo Arribas

Escuela de Doctorado de la Universidad de Cantabria

Santander 2020



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL

**Estudio de factores serológicos y de activación
celular como biomarcadores precoces del
rechazo mediado por anticuerpos en
trasplante renal**

Realizada por

JUAN IRURE VENTURA

Dirigida por

Marcos López Hoyos

David San Segundo Arribas

Santander 2020



INFORME FAVORABLE DE LOS DIRECTORES PARA EL DEPÓSITO DE LA TESIS DOCTORAL

D. **Marcos López Hoyos**, Doctor en Medicina y Cirugía y Jefe de Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla,

D. **David San Segundo Arribas**, Doctor en Biología y Facultativo Especialista de Área de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla,

CERTIFICAMOS como Director y Tutor, y Co-Director, respectivamente que la Tesis Doctoral que lleva por título: “ESTUDIO DE FACTORES SEROLÓGICOS Y DE ACTIVACIÓN CELULAR COMO BIOMARCADORES PRECOCES DEL RECHAZO MEDIADO POR ANTICUERPOS EN TRASPLANTE RENAL”, realizada por D. **JUAN IRURE VENTURA**, reúne los requisitos de originalidad y calidad necesarios para ser presentada y defendida ante un tribunal con el fin de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente.

A handwritten signature in dark blue ink, consisting of a large, stylized 'M' followed by a smaller 'L' and 'H'.

Fdo. Marcos López Hoyos

A handwritten signature in light blue ink, featuring a large, stylized 'D' and 'S' followed by a smaller 'A' and 'R'.

Fdo. David San Segundo Arribas

En Santander, 2020

“Todo parece imposible hasta que se hace”

Nelson Mandela



AGRADECIMIENTOS



Todo en la vida son etapas, unas más fáciles y otras más difíciles, unas más largas y otras más cortas, pero lo importante es seguir adelante y ser capaz de superar todas ellas. La etapa de la Tesis Doctoral parece que llega a su fin y aunque no es sencilla, ya que requiere un esfuerzo importante, he de decir que es enriquecedora, puesto que te pone a prueba y hace sacar lo mejor de uno mismo.

Para no olvidarme de nadie, quiero empezar agradeciendo a todas aquellas personas que en algún momento a lo largo de estos años se han preocupado por mí y han tratado de darme ánimos para seguir y poder concluir este trabajo. Así mismo, quiero dar las gracias a todos los pacientes que han formado parte de esto, ya que aunque en ocasiones no somos conscientes, sin ellos la investigación tampoco es posible.

En particular, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, los Dres. **Marcos López Hoyos** y **David San Segundo Arribas**, por haberme permitido no sólo realizar la tesis doctoral, sino formarme como inmunólogo y crecer como persona. Hace ya unos años que entré por la puerta del Servicio de Inmunología diciendo que quería hacer la residencia y hoy en día puedo decir que lo he conseguido y gracias a vosotros he podido adentrarme, además, con rigor en el mundo de la investigación. Gracias por haber confiado en mí y haberme ofrecido vuestro apoyo a lo largo de todo este camino.

Gracias también a todas las personas que han formado y forman parte del **Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla** y del **Grupo de Investigación de Trasplante y Autoinmunidad del IDIVAL**, incluyendo todas las categorías profesionales, por crear un gran ambiente de trabajo que facilita la consecución de los retos que uno se propone y en especial a **Esther Asensio Montañés**, porque aunque los años pasen siempre seguirás siendo mi R mayor.

Gracias al Dr. **Emilio Rodrigo Calabia** por su inestimable ayuda con la recogida de datos clínicos y por hacerme ver que aunque haya cosas que no salgan a la primera, hay que buscar el enfoque correcto que permite obtener resultados.

Me gustaría continuar agradeciendo a **David Merino Fernández** con quien he compartido horas de análisis en busca de la negativización previa a la positivización anterior, y a **M^a Consuelo Agüeros Blanco (Chelo)** quien me ha tratado como a un hijo desde el primer día que nos conocimos.

Por último, quiero terminar agradeciendo a toda mi familia y especialmente a mi abuela **Maxi**, quién a pesar de que nos dejó años antes de todo esto, siempre ha estado muy presente y me ha dado la energía necesaria para alcanzar todos los objetivos que me he propuesto. **Mamá** y **papá**, muchísimas gracias porque soy consciente de que estos meses no he podido estar con vosotros todo el tiempo que os merecéis, pero siempre lo habéis comprendido y me habéis apoyado. Gracias por la educación que me habéis dado y por enseñarme desde pequeño que con trabajo y dedicación todo se consigue. Gracias **Lara** por apoyarme en todo momento, en las situaciones de estrés, de agobio y hasta casi de desesperación. Siempre has estado ahí, siempre has tenido una palabra, un gesto, una mirada, que me ha ayudado y me ha permitido seguir adelante. Gracias por el cariño que me has dado, porque verdaderamente me has cambiado la vida. Y como siempre decimos, ésta es una de las muchas etapas que nos quedan por vivir juntos. Siempre juntos.



ÍNDICE DE CONTENIDOS



I. INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedad renal crónica	3
1.1. Prevalencia, incidencia e importancia económica	3
1.2. Clasificación de ERC: Guías KDIGO.....	6
1.3. Trasplante renal	6
2. Inmunología del trasplante	7
2.1. Respuesta inmunitaria frente al órgano trasplantado	7
2.2. Terapia inmunosupresora en el trasplante renal	11
2.3. Rechazo en el trasplante renal	15
2.3.1. Rechazo mediado por anticuerpos y su tratamiento	19
3. Ontogenia de los linfocitos B	25
4. Factores implicados en el desarrollo y la homeostasis de los linfocitos B	28
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
III. MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. Aspectos ético-legales	39
2. Estudios realizados	39
2.1. Estudio prospectivo	39
2.2. Estudio retrospectivo.....	41
3. Muestras recogidas	41
3.1. Estudio prospectivo	41
3.1.1. Muestras de los receptores	41
3.1.2. Muestras de los sujetos sanos.....	42
3.1.3. Muestras de los donantes	42
3.2. Estudio retrospectivo.....	43
3.2.1. Muestras de los receptores	43
3.2.2. Muestras de los donantes	43

4. Inmunofenotipado de subpoblaciones de linfocitos B y T mediante citometría de flujo multiparamétrica	43
5. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)	49
5.1. ELISA para la determinación de niveles de BAFF en suero.....	49
5.2. ELISA para la determinación de niveles de APRIL en suero.....	51
6. Tipaje HLA de donantes y receptores de trasplante renal	52
6.1. Tipaje HLA mediante PCR-SSO	52
6.2. Tipaje mediante PCR-SSP	52
7. Detección de anticuerpos anti-HLA y test de C1q mediante Luminex	52
8. Estudio de <i>eplets</i>	55
9. Prueba cruzada	56
9.1. Prueba cruzada mediante citotoxicidad dependiente de complemento.....	56
9.2. Prueba cruzada mediante citometría de flujo	57
10. Análisis estadístico	58
IV. RESULTADOS	61
1. Bloque I: Estudio Prospectivo	63
1.1. Características de la cohorte	63
1.2. Estudio de biomarcadores pretrasplante	67
1.2.1. Análisis de los niveles séricos de BAFF y APRIL pretrasplante en pacientes trasplantados renales.....	67
1.2.2. Análisis de la distribución de subpoblaciones de linfocitos B pretrasplante en pacientes con AbMR clínico	70
1.2.3. Análisis de la distribución de subpoblaciones de linfocitos T pretrasplante en pacientes con AbMR clínico	76
1.3. Estudio prospectivo de biomarcadores	77
1.3.1. Análisis de los niveles séricos de BAFF y APRIL a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante renal en pacientes con AbMR subclínico	77

1.3.2.	Análisis de la distribución de subpoblaciones de linfocitos B y T a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante en pacientes con AbMR subclínico.....	82
1.4.	Estudio de incompatibilidades HLA y de <i>eplets</i> verificados por anticuerpos..	87
1.5.	Efecto de la terapia de inducción en las poblaciones celulares	88
2.	Bloque II: Estudio Retrospectivo	93
2.1.	Características de la cohorte	93
2.2.	Perfiles de anticuerpos anti-HLA de clase I en pacientes hipersensibilizados	94
2.3.	Clasificación de los pacientes hipersensibilizados en función del perfil de anticuerpos anti-HLA de clase I	97
2.4.	Evaluación del riesgo clínico de la presencia de anticuerpos anti-HLA pretrasplante en pacientes trasplantados con prueba cruzada positiva por citometría de flujo	100
V.	DISCUSIÓN	103
VI.	CONCLUSIONES	117
VII.	BIBLIOGRAFÍA	121
VIII.	ANEXOS	151



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS



Figura 1. Prevalencia anual de pacientes con enfermedad renal crónica terminal en España.....	5
Figura 2. Pronóstico de la enfermedad renal crónica en función de filtrado glomerular y albuminuria (cociente albúmina/creatinina)	6
Figura 3. Evolución de la lista de espera de trasplante renal. España 2009-2018.....	7
Figura 4. Incompatibilidades HLA y edad del donante en la supervivencia del injerto .	10
Figura 5. Fármacos inmunosupresores	12
Figura 6. Terapias de inducción.....	14
Figura 7. Distribución de los diagnósticos histológicos renales de acuerdo al tiempo transcurrido tras el trasplante.....	16
Figura 8. Historia natural de la disfunción del injerto mediada por anticuerpos	21
Figura 9. Ontogenia de los linfocitos B.....	27
Figura 10. Papel de BAFF en las señales de coestimulación necesarias para la activación de los linfocitos B.....	30
Figura 11. Cronograma de la extracción de muestras	40
Figura 12. Estrategia de selección de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B y T mediante citometría de flujo.....	49
Figura 13. Concentración final de los distintos calibradores empleados en la recta de calibrado	50
Figura 14. Detección de anticuerpos anti-HLA mediante Luminex.....	54
Figura 15. Prueba cruzada mediante citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)	56
Figura 16. Prueba cruzada mediante citometría de flujo	58
Figura 17. Distribución de los niveles séricos de BAFF pretrasplante.....	68
Figura 18. Análisis de curva ROC y de supervivencia libre de AbMR en función de los niveles de BAFF pretrasplante.....	69
Figura 19. Distribución de los niveles de linfocitos B pretrasplante.....	71
Figura 20. Distribución de los niveles de células B transicionales tipo 2 pretrasplante	72
Figura 21. Distribución anormal de células B naïve y memoria	73
Figura 22. Clasificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B de acuerdo a los marcadores IgD y CD38.....	74
Figura 23. Distribución del ratio de células (Bm2+Bm2')/(Bm5+eBm5) pretrasplante .	75

Figura 24. Distribución del ratio de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ naïve/TEMRA pretrasplante	77
Figura 25. Niveles de BAFF a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante	78
Figura 26. Análisis de curva ROC de los niveles de BAFF a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante.....	80
Figura 27. Correlación de los niveles solubles de BAFF en los distintos puntos de control (6, 12 y 24 meses post-trasplante)	82
Figura 28. Efecto de la terapia de inducción en los linfocitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ y en los linfocitos B CD19 ⁺	83
Figura 29. Distribución de las células B transicionales tipo 2 a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante.....	85
Figura 30. Distribución del ratio de células B naïve/memoria y (Bm2+Bm2')/(Bm5+eBm5) a los 12 y 24 meses post-trasplante	86
Figura 31. Distribución del ratio de linfocitos T CD4 ⁺ naïve/TEMRA a los 6 meses post-trasplante.....	87
Figura 32. Efecto de la terapia de inducción en la dinámica de las poblaciones celulares	90
Figura 33. Efecto de la terapia de inducción en los niveles de células B memoria con cambio de isotipo.	91
Figura 34. Efecto de la terapia de inducción en los niveles de células plasmáticas	92
Figura 35. Valores de MFI de los anticuerpos anti-HLA de clase I en suero neto, diluido y test de C1q	95
Figura 36. Escala de riesgo	96
Figura 37. Microesferas positivas.....	97
Figura 38. Diagramas de dispersión tridimensionales	99
Tabla 1. Clasificación revisada Banff 2017	17
Tabla 2. Panel de anticuerpos monoclonales empleado para el estudio de las subpoblaciones de linfocitos B y T mediante citometría de flujo	44
Tabla 3. Inmunofenotipado para la identificación de subpoblaciones de linfocitos B..	45
Tabla 4. Inmunofenotipado para la identificación de subpoblaciones de linfocitos T..	45

Tabla 5. Panel de anticuerpos monoclonales empleado en la prueba cruzada mediante citometría de flujo	57
Tabla 6. Características demográficas, clínicas e inmunológicas de los pacientes sometidos a trasplante de riñón	64
Tabla 7. Parámetros demográficos, clínicos e inmunológicos de los pacientes con rechazo clínico mediado por anticuerpos (AbMR; n = 11) respecto a los pacientes sin rechazo (n = 87).	66
Tabla 8. Correlación entre los niveles de BAFF y el cociente albúmina/creatinina en orina a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante.....	81
Tabla 9. Correlación entre el número de incompatibilidades HLA y de <i>eplets</i> verificados por anticuerpos	87
Tabla 10. Características clínico-demográficas de los pacientes hipersensibilizados ...	94
Tabla 11. Evaluación del perfil de anticuerpos anti-HLA en pacientes hipersensibilizados trasplantados con resultado de CDC negativo y de FCXM positivo	102
Tabla Anexo 1. Frecuencia pretrasplante de las subpoblaciones de linfocitos B y T en pacientes trasplantados renales y controles sanos.....	153
Tabla Anexo 2. Frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos B y T a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante	154
Tabla Anexo 3. Evaluación de los distintos perfiles de anticuerpos anti-HLA en pacientes hipersensibilizados	156





ABREVIATURAS



A

AbMR	Rechazo mediado por anticuerpos
ACVA	Accidente cerebrovascular agudo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Aloficocianina
APCs	Células presentadoras de antígeno
APRIL	Ligando inductor de la proliferación
AT1R	Receptor de angiotensina II tipo 1

B

BAFF	Factor activador de células B
BAFFR	Receptor de BAFF
BCMA	Antígeno de maduración de células B
BCR	Receptor del linfocito B
BLyS	Estimulador de linfocitos B
Bregs	Células B reguladoras

C

CD	<i>Cluster</i> de diferenciación
CDC	Citotoxicidad dependiente de complemento
CDR	Regiones determinantes de complementariedad
CI	Intervalo de confianza
CIT	Tiempo de isquemia fría
CMV	Citomegalovirus
cPRA	Panel reactivo de anticuerpos calculado
Cy	Cianina

D

DAMPs	Patrones moleculares asociados a peligro
DGF	Función retrasada del injerto
DM	Diabetes mellitus
DSA	Anticuerpos donante específicos

E

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzimoimmunoanálisis
ENDATs	Transcritos asociados al endotelio
ERC	Enfermedad renal crónica
ERCA	Enfermedad renal crónica avanzada
ERT	Enfermedad renal terminal

F

Fc	Fragmento cristalizable
FCXM	Prueba cruzada por citometría de flujo
FG	Filtrado glomerular
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward scatter</i>

G

GSTT1	Glutation S-transferasa 1
g+ptc	Glomerulitis + capilaritis peritubular

H

HLA	Antígeno leucocitario humano
------------	------------------------------

HR	<i>Hazard ratio</i>
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HTA	Hipertensión arterial
HUMV	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla

I

IFN-γ	Interferón gamma
IFTA	Fibrosis intersticial y atrofia tubular
Ig	Inmunoglobulina
IGIVs	Inmunoglobulinas intravenosas
ILCs	Células linfoides innatas
IL-2	Interleucina 2
IL-10	Interleucina 10
IQR	Rango intercuartílico

L

LG3	Fragmento C-terminal del perlecano
------------	------------------------------------

M

MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MICA	Cadena A relacionada con el MHC de clase I
MM	<i>Mismatch</i> (incompatibilidad)
MMF	Micofenolato de mofetilo

N

NK	Células natural killer
-----------	------------------------

O

ONT Organización Nacional de Trasplantes

P

PAMPs Patrones moleculares asociados a patógenos

PBMCs Células mononucleares de sangre periférica

PBS Tampón fosfato salino

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PCR-SSO PCR con oligonucleótidos específicos de secuencia

PCR-SSP PCR con primers específicos de secuencia

PCv Prueba cruzada virtual

PE Ficoeritrina

Pmp Pacientes por millón de población

PostTx Post-trasplante

PRA Panel reactivo de anticuerpos

PreTx Pretrasplante

PRRs Receptores de reconocimiento de patrones

R

REER Registro Español de Enfermos Renales

ROC *Receiver operating characteristic*

Rpm Revoluciones por minuto

RPMI *Roswell Park Memorial Institute*

RTR Receptor de trasplante renal

Rx Rechazo

S

SD	Desviación estándar
SEN	Sociedad Española de Nefrología
SSC	<i>Side scatter</i>

T

TA	Temperatura ambiente
TACI	<i>T cell activator and calcium modulating ligand interactor</i>
TCE	Traumatismo craneoencefálico
TCMR	Rechazo mediado por células T
TCR	Receptor del linfocito T
Tfh	Linfocitos T foliculares cooperadores
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFSF13B	Factor de la superfamilia de ligandos del TNF 13B
Tregs	Células T reguladoras
TRS	Tratamiento renal sustitutivo
Tx	Trasplante

V

VerEp	<i>Eplets verificados por anticuerpos</i>
--------------	---



I. INTRODUCCIÓN



1. Enfermedad renal crónica

1.1. Prevalencia, incidencia e importancia económica

La enfermedad renal crónica (ERC) puede definirse como una alteración estructural o funcional renal (sedimento, imagen, histología) persistente durante al menos tres meses, con o sin deterioro de la función renal; o un filtrado glomerular (FG) inferior a 60 mL/min/1,73m² sin otros signos de enfermedad renal. Es por tanto, una entidad con una gran variabilidad como lo muestran las diversas estructuras renales que pueden verse afectadas (glomérulo, túbulo, intersticio, vasculatura), así como por su gravedad y progresión.

Entre las principales causas de enfermedad renal crónica avanzada (ERCA) destacan la nefropatía diabética, la enfermedad vascular arterioesclerótica, la nefroangioesclerosis, la nefropatía isquémica, la enfermedad glomerular primaria o secundaria a enfermedad sistémica, las nefropatías congénitas y hereditarias, las nefropatías intersticiales, la obstrucción prolongada del tracto urinario y las infecciones urinarias de repetición.

En base a los datos publicados en una revisión sistemática, basada en estudios poblacionales llevados a cabo en países desarrollados, la prevalencia de ERC en población mayor de 30 años es del 7,2%, llegando a un 35,8% en personas mayores de 64 años (1).

Los datos del estudio EPIRCE (Estudio Epidemiológico de la Prevalencia de Insuficiencia Renal Crónica en España) mostraron que la ERC afecta aproximadamente al 10% de la población adulta española y a más del 20% de las personas mayores de 60 años, siendo, a pesar de ello, una patología infradiagnosticada (2). Por su parte, el estudio ENRICA (Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España) concluyó que la prevalencia de ERC es del 15,1%, alcanzando un 37,3% en varones mayores de 65 años. Por consiguiente, puede afirmarse que la ERC afecta a 1 de cada 7 adultos en España, es más frecuente en varones y, además, su prevalencia aumenta conforme lo hace la edad (3).

Se han descrito gran cantidad de factores de riesgo de ERC, algunos de ellos no modificables como la edad avanzada, el sexo masculino, la raza negra y el bajo peso al nacer, así como factores de riesgo modificables entre los que destacan la hipertensión

I. Introducción

arterial (HTA), la diabetes mellitus (DM), la obesidad, la dislipemia, el tabaquismo y la hiperuricemia. Es un hecho que la prevalencia de ERC aumenta de forma considerable conforme aumenta el número de factores de riesgo cardiovascular, lo cual sugiere que puede ser considerada como un trastorno cardiovascular.

Según datos del Registro Español de Enfermos Renales (REER) junto a la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) y a la Sociedad Española de Nefrología (SEN), la incidencia de ERC terminal en España ha aumentado en los últimos años, pasando de 141 pacientes por millón de población (pmp) en el año 2017 a más de 147 pmp en el año 2018, lo cual indica que más de 6500 nuevas personas han precisado de tratamiento renal sustitutivo (TRS). Concretamente, un 78,9% de los nuevos pacientes se encuentran en hemodiálisis, seguido de un 16% en diálisis peritoneal y un 4,8% han sido sometidos a un trasplante renal anticipado. La DM se mantiene como causa principal de ERC en el 25% de las ocasiones. A pesar de que la mayoría de pacientes en TRS se encuentra en hemodiálisis, se mantiene la tendencia descendente de ésta como primer tratamiento, con el consiguiente aumento progresivo de la diálisis peritoneal como opción terapéutica inicial.

En términos de prevalencia, la ERCA ha experimentado un aumento exponencial en la última década, superando las 1320 personas por millón de población, o lo que es lo mismo, alrededor de 61000 personas se encuentran ya en TRS en nuestro país (Figura 1). Al igual que observamos cuando hablamos de incidencia, la DM también se mantiene como la causa más prevalente de ERC en un 16% de las ocasiones (4).

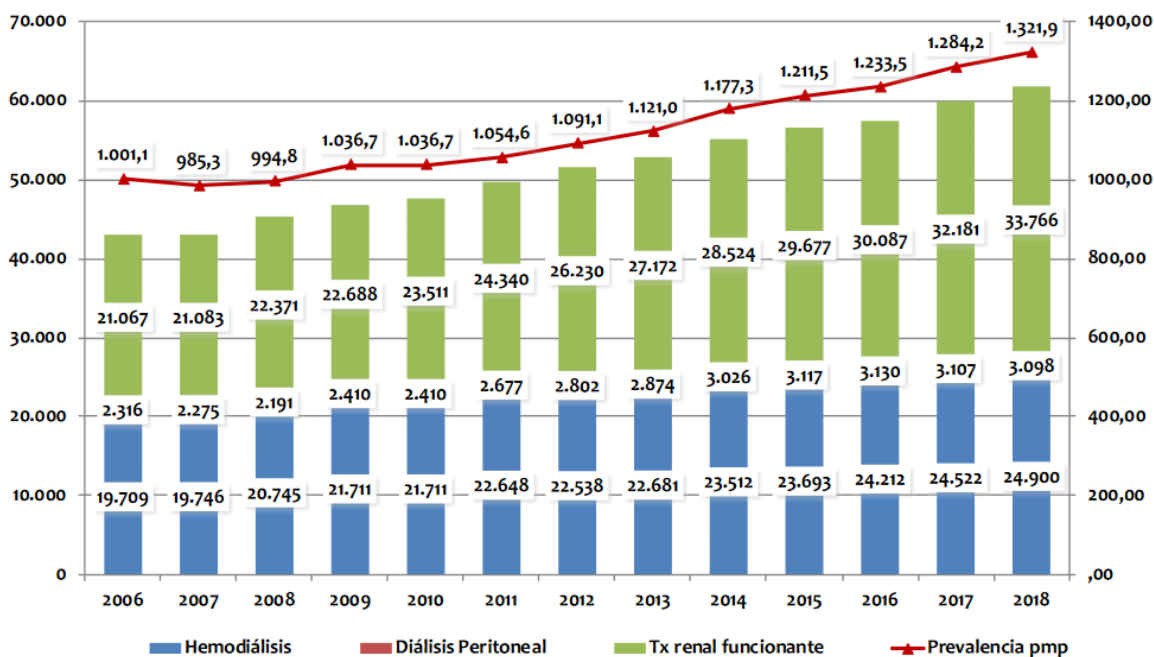


Figura 1. Prevalencia anual de pacientes con enfermedad renal crónica terminal en España. pmp: pacientes por millón de población; Tx: trasplante. Registro Español de Enfermos Renales (4).

Por todo ello, podemos afirmar que la ERC es uno de los principales problemas de salud pública de las últimas décadas, debido en gran medida al importante gasto de recursos que supone. Esto se debe en parte a que el TRS de la ERC, bien sea mediante diálisis o trasplante, a pesar de ser requerido por un bajo porcentaje de pacientes con ERC (1%), conlleva una reducción significativa de la expectativa de vida y se trata de uno de los tratamientos de mayor coste de las enfermedades crónicas, puesto que consume alrededor del 5% del presupuesto sanitario. Concretamente, en términos de coste/paciente/año, la diálisis supone un coste de 45000-50000€ y el trasplante renal de alrededor de 11000€ (5). Además, la ERC causa desde estadios iniciales, un aumento muy significativo del riesgo de morbilidad cardiovascular y de mortalidad total, tanto en la población general como en los grupos que poseen un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular, por lo que se ven afectados gran cantidad de individuos (3,6).

1.2. Clasificación de ERC: Guías KDIGO

La concienciación del gran problema de salud pública que supone la ERC en la población ha hecho que las sociedades científicas de Nefrología hayan desarrollado gran número de recomendaciones y guías clínicas acerca de la ERC. Ya en 2002 se publicaron las guías K/DOQI (Kidney Disease Outcome Quality Initiative), estableciéndose la definición de ERC, su clasificación en grados y los métodos básicos para su evaluación. Posteriormente, en 2003 se fundó la organización KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) con el objetivo de desarrollar iniciativas para la prevención y el manejo de la ERC. Las últimas guías KDIGO datan ya de 2012 pero en ellas se recoge la clasificación en grados de la ERC. Una vez diagnosticada la ERC, ésta se clasifica en función de los valores de FG (G1 a G5) y albuminuria (A1 a A3) (7,8) (Figura 2).

KDIGO 2012			Albuminuria		
			Categorías, descripción y rangos		
Filtrado glomerular Categorías, descripción y rangos (ml/min/1,73 m ²)			A1	A2	A3
			Normal a ligeramente elevada < 30 mg/g	Moderadamente elevada 30-300 mg/g	Gravemente elevada > 300 mg/g
G1	Normal o elevado	≥ 90			
G2	Ligeramente disminuido	60-89			
G3a	Ligera a moderadamente disminuido	45-59			
G3b	Moderada a gravemente disminuido	30-44			
G4	Gravemente disminuido	15-29			
G5	Fallo renal	< 15			

Figura 2. Pronóstico de la enfermedad renal crónica en función de filtrado glomerular y albuminuria (cociente albúmina/creatinina). Código de colores: verde, riesgo de referencia, no hay enfermedad renal si no existen otros marcadores definitorios; amarillo, riesgo moderado; naranja, riesgo alto; rojo, riesgo muy alto. KDIGO: Kidney Diseases Improving Global Outcomes.

1.3. Trasplante renal

Tal y como demuestra el último informe de la ONT, España se mantiene a la cabeza como líder mundial en donación y trasplante de órganos, llegando a realizar 3313 trasplantes de riñón en 2018. Sin embargo, esto no evitó que en ese mismo año, 3933 pacientes continuasen en lista de espera de trasplante renal, requiriendo por tanto otro tipo de TRS (9) (Figura 3).

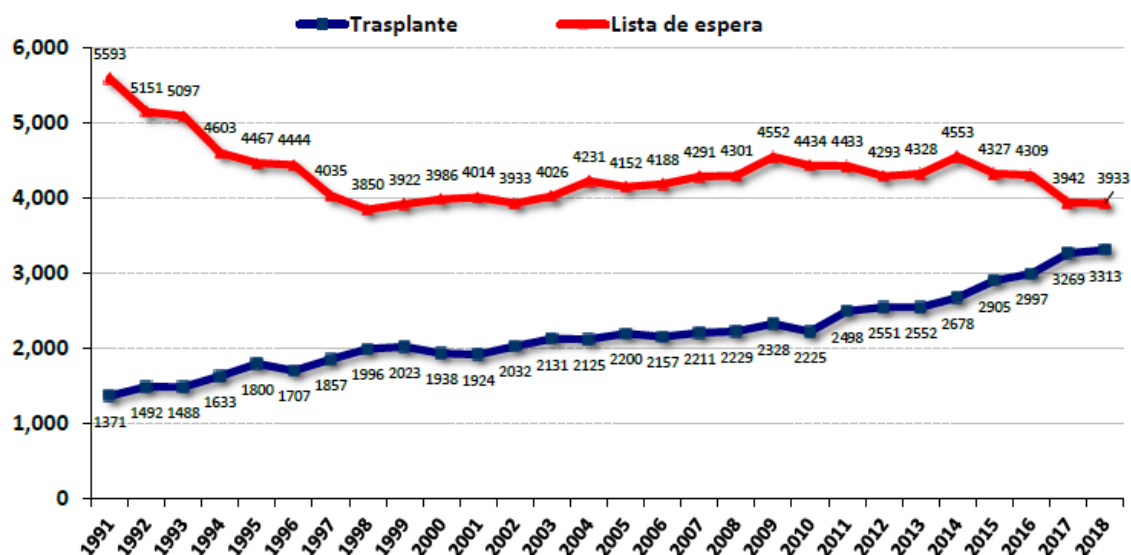


Figura 3. Evolución de la lista de espera de trasplante renal. España 2009-2018. Memoria de Actividad de donación y trasplante renal de la Organización Nacional de Trasplantes 2018 (9).

Los avances en el conocimiento de la respuesta inmunitaria, así como en los protocolos de inmunosupresión, manejo quirúrgico y manejo integral del paciente, han hecho que el trasplante renal sea mejor tratamiento en pacientes con ERCA cuando se compara con el resto de técnicas de TRS, tanto en supervivencia como en calidad de vida, tratándose además de la técnica de mayor coste-efectividad (10). Las principales limitaciones de este tratamiento vienen determinadas por las características de los receptores y como ya se ha comentado, por la disponibilidad de órganos.

En España, según datos del REER de 2018 el 54% de los pacientes con ERCA son portadores de un injerto renal funcional (11). A pesar de estos datos esperanzadores, los pacientes trasplantados necesitan recibir un régimen farmacológico inmunosupresor para evitar la aparición del rechazo del injerto.

2. Inmunología del trasplante

2.1. Respuesta inmunitaria frente al órgano trasplantado

El éxito del trasplante está limitado en gran medida por la respuesta inmunitaria que se genera en el receptor frente al injerto del donante. Esta respuesta está integrada por

1. Introducción

dos sistemas: el sistema inmunitario innato y el sistema inmunitario adaptativo, los cuales no actúan de manera aislada sino que están interrelacionados.

La importancia del sistema inmunitario innato en el trasplante no ha sido tenida en cuenta durante muchos años. Sin embargo, actualmente se considera que representa el primer paso en los mecanismos de rechazo, guiando el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa. El sistema innato está integrado por una serie de células y de componentes solubles, tales como los neutrófilos, monocitos, macrófagos, células “natural killer” (NK), células dendríticas, células linfoides innatas (ILCs), así como citocinas y diversos componentes del sistema del complemento, entre otros (12). Su papel fue descrito por Janeway en 1989, quien postuló la existencia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) capaces de reconocer diferentes moléculas presentes en bacterias y virus, a las que denominó patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Como consecuencia de este reconocimiento, se generan diversos mediadores proinflamatorios, esenciales para el desarrollo de la respuesta inmunitaria adaptativa (13). Sin embargo, esto no es suficiente para explicar la activación de la respuesta inmunitaria en el ámbito del trasplante, ya que es un proceso que se lleva a cabo bajo condiciones de esterilidad. Fue Polly Matzinger quien evidenció que la inmunidad innata también puede activarse como consecuencia de estímulos no infecciosos, a los que denominó patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs), integrados por diferentes moléculas que se producen tras la muerte celular (14).

A diferencia del sistema inmunitario innato, el adaptativo se caracteriza por el reconocimiento específico de los antígenos, así como por la presencia de memoria inmunológica, gracias a la cual se consigue una respuesta más rápida y potente frente a antígenos conocidos (15). No obstante, la memoria inmunológica parece que no es una propiedad exclusiva de las células del sistema inmunitario adaptativo, comenzando a utilizarse el concepto de inmunidad entrenada a la hora de referirse a la inmunidad innata (16). Las principales células del sistema adaptativo son los linfocitos T y los linfocitos B.

El reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T tiene lugar a través del receptor del linfocito T (TCR), el cual es capaz de reconocer péptidos antigénicos presentados por las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la

superficie de células presentadoras de antígeno (APCs) (17). Las principales APCs profesionales son las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B. Este reconocimiento del antígeno en el contexto del trasplante puede producirse a través de dos mecanismos diferentes: una presentación antigénica directa e indirecta. La vía directa consiste en el reconocimiento por parte de los linfocitos T del receptor de péptido presentados por moléculas MHC del donante en APCs del propio donante. En la vía indirecta, las moléculas MHC del donante son fagocitadas y procesadas para su presentación a los linfocitos T del receptor por medio de moléculas MHC y APCs del propio receptor (18). El reconocimiento antigénico directo es especialmente importante en la generación del rechazo agudo temprano, debido a la presencia de leucocitos del donante en el órgano trasplantado (19). Por consiguiente, las moléculas MHC son las principales dianas del sistema inmunitario adaptativo en el trasplante (20,21). Existen dos tipos de moléculas MHC, MHC clase I y II, las cuales se caracterizan por su elevado grado de polimorfismo y se diferencian en su estructura, función, así como en los compartimentos celulares de los que obtienen los péptidos antigénicos para su presentación a los linfocitos T. Las moléculas MHC de clase I están presentes en todas las células nucleadas del organismo e incluyen a las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C (antígeno leucocitario humano). Son las encargadas del procesamiento de antígenos presentes en el citoplasma celular para su presentación a los linfocitos T CD8+, con capacidad citotóxica. Las moléculas MHC de clase II, por su parte se expresan principalmente en las APCs (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B), e incluyen a las moléculas HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Se encargan del procesamiento de antígenos extracelulares que son interiorizados en la APC mediante vesículas para su presentación a los linfocitos T CD4+ (22).

Como consecuencia de ello, la compatibilidad HLA entre donante y receptor debe tenerse en cuenta a la hora del trasplante, ya que el riesgo de pérdida del injerto es mayor en aquellos trasplantes con una mayor incompatibilidad HLA, tanto en el caso de donantes cadáver como de donantes vivos (23–25) (Figura 4). Concretamente, incompatibilidades en el locus HLA-DR son las que tienen un mayor impacto en la supervivencia del injerto (26). Esta gran variabilidad HLA, consecuencia de la gran cantidad de alelos existentes para cada uno de los genes en la población, constituye la

I. Introducción

base molecular del rechazo, de tal manera que el sistema inmunitario del receptor es capaz de reconocer las diferencias existentes en las moléculas HLA entre donante y receptor, promoviendo una respuesta aloespecífica que tiene como objetivo la destrucción del injerto. Además de las incompatibilidades existentes a nivel alélico, cada día cobra más importancia el estudio de los residuos polimórficos de aminoácidos presentes en la superficie de las moléculas HLA, conocidos como *epitets*, con capacidad inmunogénica y que pueden dar lugar a una respuesta humoral frente al injerto (27).

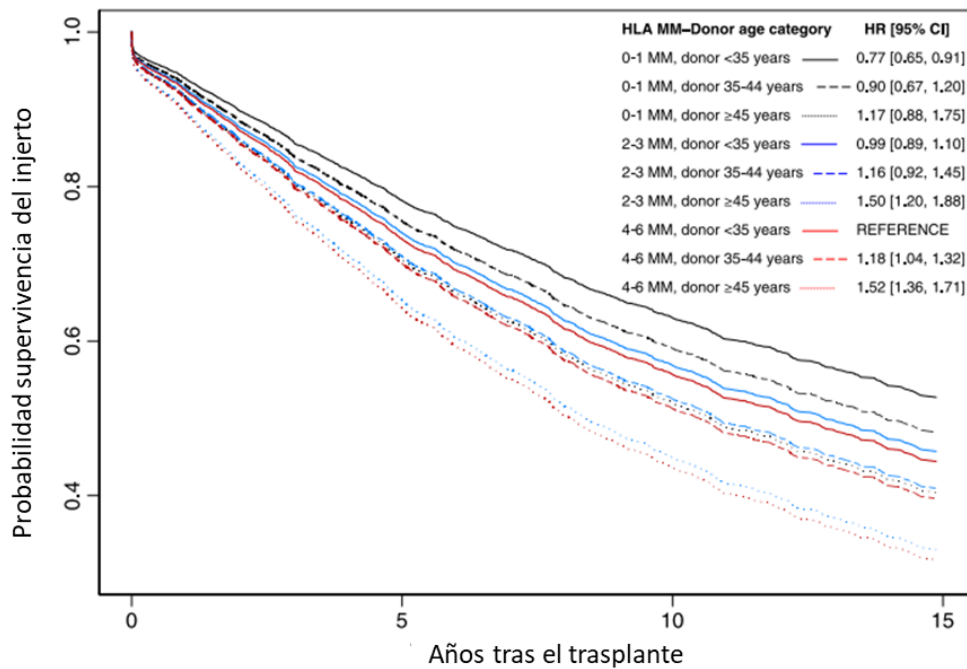


Figura 4. Incompatibilidades HLA y edad del donante en la supervivencia del injerto. Probabilidad de supervivencia del injerto tras el trasplante en función del número de incompatibilidades HLA entre donante y receptor, así como de la edad del donante. MM: mismatch; HR: hazard ratio; CI: intervalo de confianza. [Adaptado de Foster BJ. et al. 2013 (23)].

Para la activación de los linfocitos T, además de este reconocimiento del antígeno presentado por moléculas MHC, es necesaria la presencia de moléculas coestimuladoras como CD28 presente en la superficie de los linfocitos T y que interacciona con sus ligandos CD80/CD86 presentes en las APCs (28). Así mismo, CD80/CD86 son capaces de interaccionar con la molécula inhibidora CTLA-4, presente en la superficie de linfocitos T activados, poniendo fin a la señal de activación del linfocito T (29).

Los linfocitos B, por el contrario, son capaces de reconocer antígenos intactos a través de su receptor del linfocito B (BCR). Al igual que en el caso de los linfocitos T, este reconocimiento antigénico es necesario pero no suficiente para la activación de las células B. Para ello, son necesarias, además, señales de coestimulación como la interacción entre CD40 y CD40L presentes en la membrana de los linfocitos B y T, respectivamente. Tras esta activación, los linfocitos B pueden dar lugar a células plasmáticas productoras de anticuerpos o a linfocitos B memoria (30). Además, los linfocitos B son capaces de procesar y presentar aloantígenos a los linfocitos T y modular la respuesta de éstos mediante la secreción de diversas citocinas.

De la misma manera que la activación de la inmunidad innata conduce a una activación de la inmunidad adaptativa, esto también puede ocurrir en sentido contrario, ya que la activación de los linfocitos T conduce a la producción de citocinas y quimiocinas capaces de reclutar a componentes de la inmunidad innata. Del mismo modo, para la activación de la vía clásica del complemento es necesaria la interacción con anticuerpos producidos por los linfocitos B. Todo ello lleva a concluir en la estrecha relación existente entre ambos sistemas.

2.2. Terapia inmunosupresora en el trasplante renal

El uso de fármacos inmunosupresores tiene como objetivo un aumento de la supervivencia del injerto mediante una modulación del sistema inmunitario del receptor, disminuyendo así la capacidad de respuesta frente a las células del órgano trasplantado, y promoviendo mecanismos de tolerancia inmunológica (31,32). Existen distintos tipos de tratamientos inmunosupresores cada uno con su mecanismo de acción, entre los que destacan: corticoesteroides, anticuerpos antilinfocitarios mono y policlonales (OKT3, timoglobulina, basiliximab, daclizumab, alemtuzumab, rituximab), inhibidores de la calcineurina (ciclosporina A y tacrolimus), inhibidores de mTOR (sirolimus y everolimus), inhibidores de la síntesis de nucleótidos (azatioprina, micofenolato de mofetilo y micofenolato de sodio), entre otros. El principio básico de todos ellos consiste en la capacidad de supresión del reconocimiento alógeno,

I. Introducción

mediante la inhibición de los mecanismos de activación de los linfocitos T (33,34) (Figura 5).

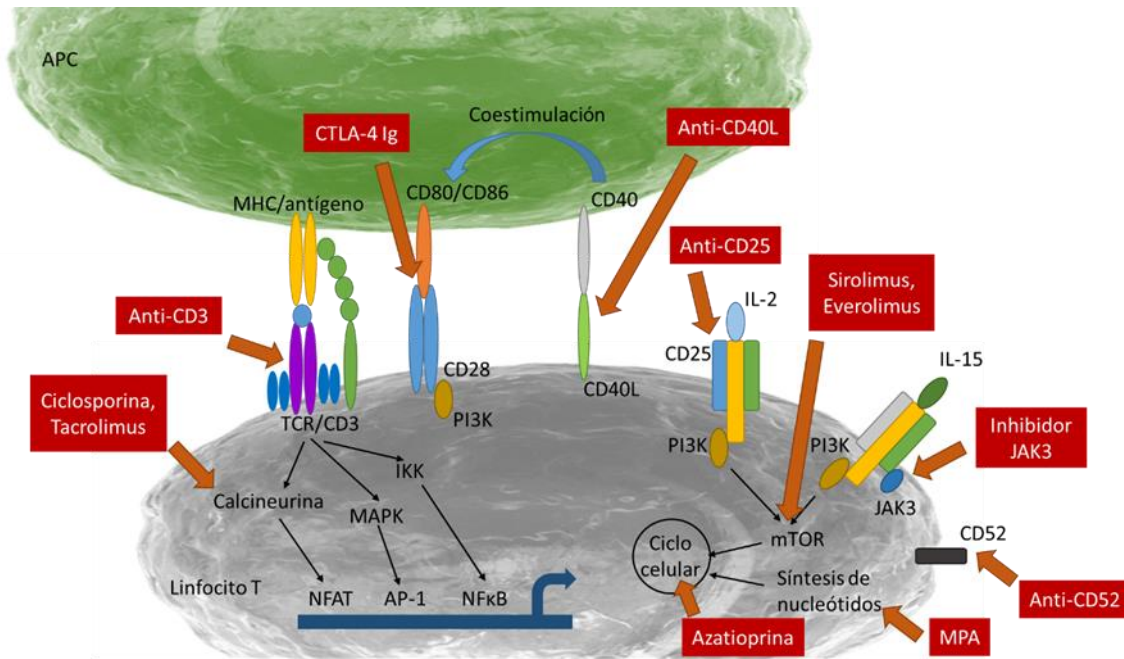


Figura 5. Fármacos inmunosupresores. Mecanismos de acción de los diferentes fármacos inmunosupresores en trasplante renal y cómo actúan en las distintas rutas de activación del linfocito T.

Gracias a estos tratamientos inmunosupresores, especialmente a los avances logrados a partir de finales de los años 90 con la aprobación de fármacos como tacrolimus, micofenolato de mofetilo (MMF), timoglobulina y basiliximab, se ha conseguido que las tasas de rechazo y de supervivencia del injerto en el primer año post-trasplante (PostTx) se sitúen alrededor del 10-15% y 95%, respectivamente, cuando a principio de los años 80, en la etapa de la ciclosporina, la tasa de rechazo era del 50% y la supervivencia del injerto del 80-85% en el primer año tras el trasplante (35). No obstante, estos resultados no se mantienen en el tiempo, ya que se observa que a los 10 años tras el trasplante, la tasa de supervivencia del injerto ronda el 65-75% (una pérdida aproximada del 5%/año), lo cual indica que un 25-35% de los pacientes trasplantados deben regresar a TRS (36,37). La inducción de inmunosupresión, sin embargo, hace que estos pacientes tengan una mayor predisposición a la infección por patógenos oportunistas, así como al desarrollo de neoplasias a largo plazo.

Desafortunadamente, son excepcionales los pacientes trasplantados capaces de aceptar de forma prolongada el injerto renal sin el uso de fármacos inmunosupresores, por lo que la mayoría de los pacientes precisan de su uso previo al trasplante (terapia de inducción) y a lo largo de toda su vida (terapia de mantenimiento).

La terapia de inducción consiste en una terapia de inmunosupresión llevada a cabo de manera simultánea al trasplante con el objetivo de minimizar el riesgo de rechazo agudo del órgano trasplantado. Actualmente, no existe un protocolo estandarizado sobre la estrategia a emplear ni en cuanto a la duración de la misma. Habitualmente se utiliza como terapia de inducción una combinación de dosis altas de anticuerpos frente a antígenos presentes en los linfocitos T (timoglobulina o basiliximab), junto con dosis más bajas de fármacos inmunosupresores convencionales (corticoesteroides, tacrolimus y MMF), los cuales se utilizan como terapia inmunosupresora de mantenimiento (38). El principal objetivo de la terapia de mantenimiento sigue siendo evitar el rechazo del injerto pero sin poner en peligro la vida del paciente como consecuencia del desarrollo de infecciones o de neoplasias (39–41). Los tratamientos inmunosupresores también se utilizan como terapia de rescate cuando se produce un fallo del injerto (42).

Los principales aspectos que se deben tener en cuenta a la hora de utilizar o no tratamiento de inducción, así como el tipo de inducción necesaria en función del riesgo inmunológico del paciente se representan en la Figura 6 (38).

Terapia de inducción

No inducción < Basiliximab < Alemtuzumab < Timoglobulina



Riesgo bajo

- No incompatibilidades HLA
- Donante vivo
- Caucásico
- Bajo PRA
- Ausencia de DSA
- Compatibilidad de grupo sanguíneo
- Función inmediata del injerto
- Tiempo de isquemia fría reducido
- Primer trasplante

Riesgo alto

- Presencia de incompatibilidades HLA
- Receptor joven y donante de edad avanzada
- Afroamericano
- Alto PRA
- Presencia de DSA
- Incompatibilidad de grupo sanguíneo
- Función retardada del injerto
- Tiempo de isquemia fría prolongado
- Retrasplante

Figura 6. Terapias de inducción. Criterios para la elección de la terapia de inducción en función del riesgo inmunológico del paciente. HLA: antígeno leucocitario humano; PRA: panel reactivo de anticuerpos; DSA: anticuerpos donante específicos.

El uso de timoglobulina como agente de inducción lleva consigo una importante depleción celular (43), la cual es duradera en el tiempo. La terapia con basiliximab, por el contrario, a pesar de inhibir la proliferación de los linfocitos T, al tratarse de un anticuerpo monoclonal anti-CD25, no causa tal depleción celular. Cuando se comparan ambas terapias de inducción, se ha observado que en pacientes de alto riesgo inmunológico, el uso de timoglobulina se traduce en una menor incidencia de rechazo agudo, así como en un mejor resultado en cuanto a pérdida del injerto y esperanza de vida a los 5 años tras el trasplante (44–46). Por ello, y dado que la terapia con basiliximab se asocia con una mayor incidencia de anticuerpos anti-HLA donante específicos (DSA) de aparición *de novo* en pacientes sensibilizados (47), las guías KDIGO recomiendan el uso de timoglobulina como agente de inducción en pacientes de alto riesgo inmunológico. No obstante, existe cierta controversia en cuanto a la terapia de inducción a utilizar en los pacientes de bajo riesgo inmunológico. Sin embargo, debido a que el uso de timoglobulina se asocia con un mayor riesgo de infecciones, como consecuencia de la prolongada linfopenia que provoca (48,49), así como con el

desarrollo de diversos efectos adversos (síndrome de liberación de citocinas (50), fiebre, dolor de cabeza, diarrea, hipertensión, trombocitopenia, neoplasias) (51,52), las guías KDIGO recomiendan el uso de basiliximab como terapia de inducción en pacientes de bajo riesgo inmunológico.

En pacientes hipersensibilizados sometidos a trasplante renal la combinación de plasmaféresis e inmunoglobulinas intravenosas (IGIVs) como terapia desensibilizante ha demostrado resultados satisfactorios en lo que respecta a las tasas de rechazo y de supervivencia del injerto (53–55).

A pesar de todo ello, no existe una pauta de inmunosupresión ideal y estándar para todos los pacientes, por lo que la búsqueda de nuevos biomarcadores que ayuden a la individualización de la inmunosupresión, consiguiendo así un equilibrio entre eficacia y baja toxicidad, es necesaria.

2.3. Rechazo en el trasplante renal

La disfunción del injerto puede conducir al fallo y a la pérdida del mismo, siendo la biopsia renal la herramienta de elección para el diagnóstico y pronóstico de la patología del injerto. Los resultados anatomopatológicos revelan la existencia de rechazo, bien sea mediado por células T, mediado por anticuerpos o mixto, en alrededor de un 10-15% de los casos, siendo también frecuente el diagnóstico de procesos infecciosos (nefropatía por virus BK, citomegalovirus -CMV- o por agentes bacterianos), así como la recidiva de la glomerulopatía de base sobre el injerto (Figura 7) (56,57).

I. Introducción

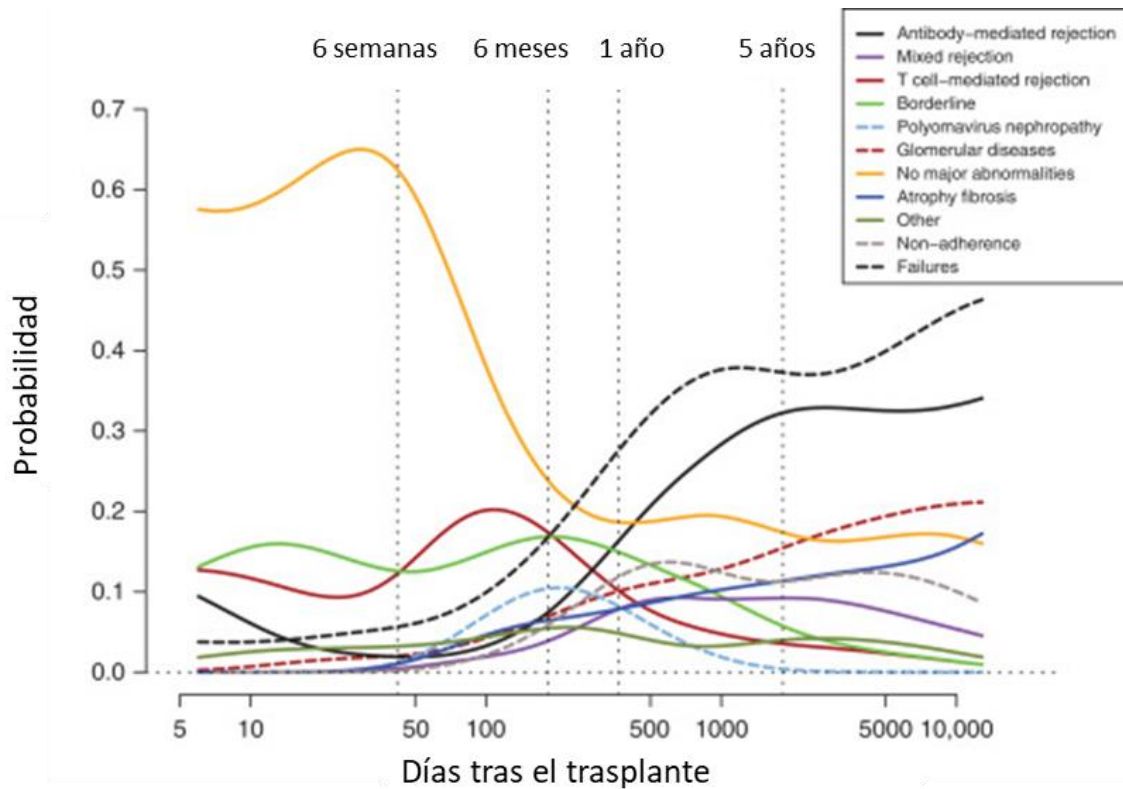


Figura 7. Distribución de los diagnósticos histológicos renales de acuerdo al tiempo transcurrido tras el trasplante. [Adaptado de Halloran PF. et al. 2014 (57)].

A partir de los años 80 comenzaron a realizarse biopsias del injerto renal en pacientes clínicamente estables, sin deterioro de la función renal ni aparición de proteinuria, a las cuales se denominó biopsias de protocolo. En un primer momento, el objetivo de estas biopsias fue básicamente la búsqueda de lesiones histológicas que precedieran a la aparición del rechazo clínico (58), lo cual dio lugar al denominado rechazo subclínico, en el que destaca la presencia de infiltrado inflamatorio intersticial y tubulitis en injertos estables (59). Actualmente, la biopsia de protocolo está establecida como una herramienta segura y de utilidad para el seguimiento y monitorización del injerto renal (60).

Fue en 1991 cuando un grupo de patólogos, nefrólogos y cirujanos dedicados al trasplante se reunieron en la ciudad canadiense de Banff con el objetivo de desarrollar un esquema para la estandarización internacional de la nomenclatura, así como de los criterios para el diagnóstico histológico del rechazo del injerto renal (61). Este grupo se conoce como grupo de Banff y se reúne de manera bianual con el objetivo de tratar las

últimas investigaciones en esta materia, cuyas conclusiones son aceptadas por la comunidad científica. En 2001 tuvo lugar una revisión importante, ya que fue entonces cuando se establecieron los criterios para el diagnóstico del rechazo mediado por anticuerpos (AbMR), también conocido como rechazo humoral (62), los cuales han sido modificados en las reuniones posteriores.

La última clasificación de los criterios para el diagnóstico tanto del AbMR como del rechazo mediado por células T (TCMR) en trasplante renal, fue llevada a cabo por el grupo de Banff en 2017 (Tabla 1) (63).

Tabla 1. Clasificación revisada Banff 2017. Criterios Banff 2017 para la clasificación del rechazo mediado por anticuerpos (AbMR) y del rechazo mediado por células T (TCMR) en el trasplante renal. [Adaptado de Haas M. et al. 2018 (63)].

<i>Categoría 1: Biopsia normal o cambios inespecíficos</i>
<i>Categoría 2: Cambios mediados por anticuerpos</i>
AbMR activo (se deben cumplir los 3 criterios para su diagnóstico):
1. Evidencia histológica de daño tisular agudo (1 o más de los siguientes criterios):
<ul style="list-style-type: none"> • Inflamación microvascular • Microangiopatía trombótica aguda, en ausencia de cualquier otra causa • Daño tubular agudo, en ausencia de otra causa aparente
2. Evidencia de interacción actual o reciente de anticuerpos con el endotelio vascular (1 o más de los siguientes criterios):
<ul style="list-style-type: none"> • Tinción C4d en capilares peritubulares • Inflamación microvascular moderada • Expresión aumentada de genes fuertemente asociados con AbMR en la biopsia
3. Evidencia serológica de DSA. La tinción C4d o la expresión de genes validados mencionados en el punto 2 pueden sustituir a los DSA. Sin embargo, la determinación de DSA, incluyendo anticuerpos anti-HLA y no HLA es recomendable cuando se cumplen los criterios 1 y 2
AbMR crónico activo (se deben cumplir los 3 criterios para su diagnóstico):
1. Evidencia morfológica de daño tisular crónico (1 o más de los siguientes criterios):
<ul style="list-style-type: none"> • Glomerulopatía del trasplante • Severa multilaminación de la membrana basal de los capilares peritubulares • Fibrosis intimal arterial excluyendo otras causas
2. Criterios idénticos a los del punto 2 para AbMR activo
3. Criterios idénticos a los del punto 3 para AbMR activo
Tinción C4d sin evidencia de rechazo (se deben cumplir los 4 criterios para su diagnóstico):
1. Tinción C4d en capilares peritubulares
2. Incumplimiento del criterio 1 para AbMR activo o AbMR crónico activo
3. No evidencia molecular para AbMR activo o AbMR crónico activo

I. Introducción

4. No TCMR agudo ni TCMR crónico activo, ni cambios <i>borderline</i>
<i>Categoría 3: Cambios borderline</i>
Sospecha de TCMR agudo:
<ul style="list-style-type: none">• Focos de tubulitis con ligera inflamación intersticial o severa inflamación intersticial con ligera tubulitis• Ausencia de arteritis intimal o transmural
<i>Categoría 4: TCMR</i>
TCMR agudo:
<ul style="list-style-type: none">• Grado IA: inflamación intersticial > 25% con tubulitis moderada• Grado IB: inflamación intersticial > 25% con tubulitis severa• Grado IIA: ligera arteritis intimal con o sin inflamación intersticial y/o tubulitis• Grado IIB: severa arteritis intimal con o sin inflamación intersticial y/o tubulitis• Grado III: arteritis transmural y/o necrosis fibrinoide arterial acompañada de arteritis intimal con o sin inflamación intersticial y/o tubulitis
TCMR crónico activo:
<ul style="list-style-type: none">• Grado IA: inflamación intersticial > 25% del total de la corteza y > 25% de las áreas con fibrosis intersticial con tubulitis moderada, excluyendo otras patologías que pueden asociarse a i-IFTA• Grado IB: inflamación intersticial > 25% del total de la corteza y > 25% de las áreas con fibrosis intersticial con tubulitis severa, excluyendo otras patologías que pueden asociarse a i-IFTA• Grado II: arteriopatía crónica del injerto

AbMR: rechazo mediado por anticuerpos; TCMR: rechazo mediado por células T; IFTA: fibrosis intersticial y atrofia tubular.

En ella, se revisaron los criterios diagnósticos para el TCMR crónico, lo cual ha dado lugar a la inclusión de un nuevo subtipo de rechazo, el denominado TCMR crónico activo. Este rechazo se ha denominado así debido a la presencia de inflamación moderada o severa en zonas de fibrosis intersticial (IF) asociada a una atrofia tubular (TA) también moderada o severa (i-IFTA). La presencia de este hallazgo histológico se correlaciona con una peor supervivencia del injerto y frecuentemente, con niveles bajos de inmunosupresión. Así mismo, se llevó a cabo una actualización de los criterios para la evaluación de las características moleculares relacionadas con el daño tisular mediado por anticuerpos como una potencial alternativa complementaria a los DSA para el diagnóstico de AbMR.

2.3.1. Rechazo mediado por anticuerpos y su tratamiento

En los últimos años, gracias en gran medida al desarrollo farmacológico (34), el TCMR ha dejado de ser una de las causas directas de pérdida del injerto a medio plazo. Sin embargo, no se puede descartar su repercusión sobre la formación de anticuerpos anti-HLA y el desarrollo de AbMR. Actualmente, el AbMR, y concretamente el AbMR crónico, es una de las principales causas de pérdida del injerto (64). A pesar de los avances en este campo, los mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo de AbMR no se conocen a la perfección, aunque existen evidencias científicas que sostienen que su generación se produce como consecuencia de la activación de los linfocitos B, los cuales se diferencian y dan lugar a células plasmáticas productoras de anticuerpos, entre los que destacan los anticuerpos anti-HLA DSA (65), así como otros anticuerpos dirigidos frente a moléculas no HLA como los anti-MICA (cadena A relacionada con el MHC de clase I), anti-GSTT1 (glutathion S-transferasa 1), anti-LG3 (fragmento C-terminal del perlecano) o anti-AT1R (receptor de angiotensina II tipo 1) (66–69).

Existen diferentes tipos de AbMR de acuerdo al periodo de tiempo tras el trasplante en el que se desencadenan (70).

El AbMR hiperagudo se produce de manera inmediata, a los pocos minutos o primeras horas, tras el trasplante, como consecuencia de la presencia en el receptor de DSA preformados antes del trasplante con capacidad de activación del complemento. Estos DSA se unen a las células endoteliales del órgano trasplantado, provocando la activación del sistema del complemento y desencadenando una trombosis arterial y venosa con el consiguiente infarto y pérdida del injerto. Sin embargo, gracias a las técnicas de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), el rechazo hiperagudo es un evento que prácticamente ha desaparecido en la actualidad y, de hecho, la clasificación de Banff considera que no debe producirse (71).

El AbMR agudo suele iniciarse después de la primera semana tras el trasplante y tal y como se ha comentado, se definió por primera vez en la reunión de Banff de 2001. Entre los criterios para su diagnóstico destacan la presencia de anticuerpos capaces de unirse al endotelio vascular causando la activación de mecanismos dependientes e independientes del complemento que permiten el reclutamiento de distintos tipos

I. Introducción

celulares responsables del daño tisular agudo, definido como glomerulitis y capilaritis peritubular, y de los depósitos de C4d en el tejido. Sin embargo, la presencia de C4d no es un marcador lo suficientemente específico y sensible para basar en él el diagnóstico del AbMR, puesto que existen casos en los que se demuestra la presencia de inflamación microvascular y de DSA, sin depósitos de C4d (72,73).

La fisiopatología del AbMR crónico, el cual puede producirse en cualquier momento de la evolución del trasplante aunque con mayor frecuencia a partir del primer año postTx, se basa en la presencia de eventos trombóticos e inflamatorios que dan lugar a daño endotelial y remodelado de la matriz tisular del injerto renal. Actualmente, es la principal causa de pérdida del injerto y está fuertemente asociado a una mala adherencia al tratamiento inmunosupresor (56,74).

De esta manera, la secuencia temporal para el desarrollo de AbMR comenzaría con la aparición de DSA, seguida de la lesión endotelial que finalmente concluiría en el desarrollo de la glomerulopatía del trasplante con el consiguiente deterioro de la función del injerto (Figura 8) (75).

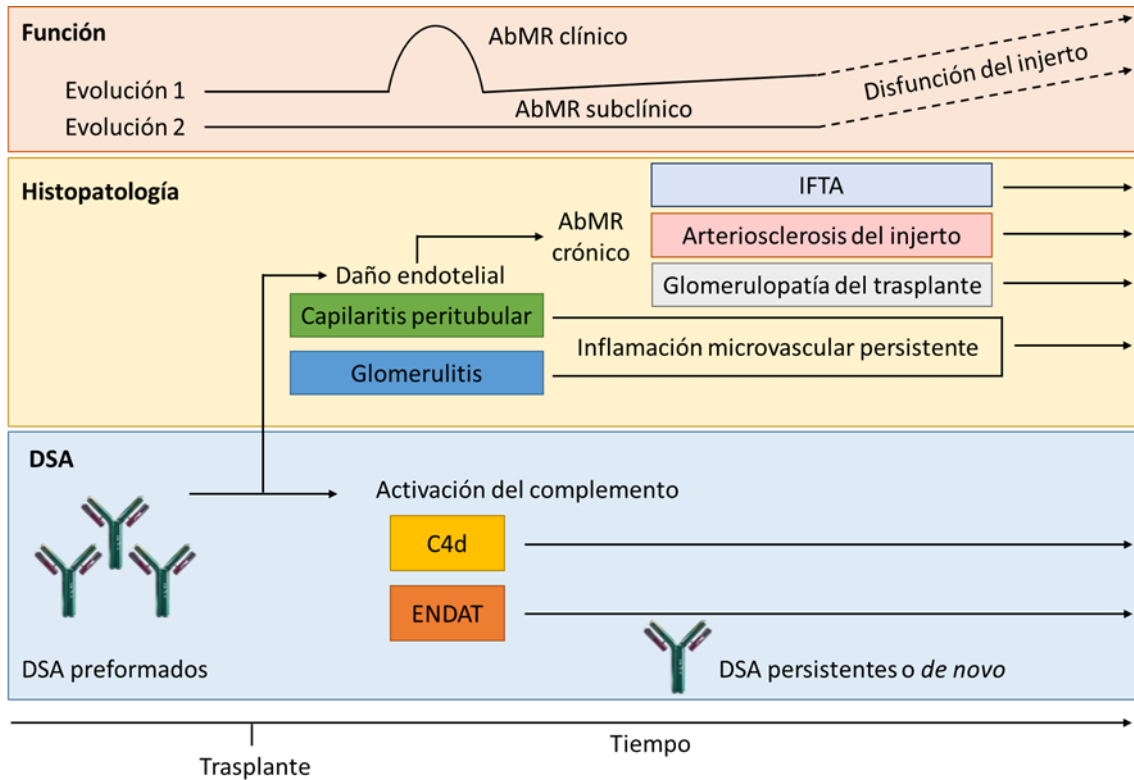


Figura 8. Historia natural de la disfunción del injerto mediada por anticuerpos. Secuencia de acontecimientos en el desarrollo de rechazo mediado por anticuerpos (AbMR) en cuanto a la función, histología y producción de anticuerpos anti-HLA. AbMR: rechazo mediado por anticuerpos; DSA: anticuerpos donante específicos; IFTA: fibrosis intersticial y atrofia tubular; ENDATs: transcritos asociados al endotelio. [Adaptado de Loupy A. et al. 2012 (75)].

Los pacientes con DSA tienen un mayor riesgo de sufrir AbMR tanto agudo como crónico, así como de pérdida del injerto. Además, tanto el AbMR agudo como crónico se asocian con un peor pronóstico tras el trasplante, aumentando la probabilidad de nuevos episodios de rechazo. La importancia de los anticuerpos anti-HLA se ha demostrado gracias al desarrollo de técnicas cada vez más sensibles para su determinación, entre los que destacan el ensayo automatizado citométrico de Luminex.

La técnica clásica de detección de anticuerpos anti-HLA se basa en el ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Es un ensayo en el que se valora la presencia de anticuerpos anti-HLA en el receptor capaces de unirse a las moléculas HLA del donante, con la consiguiente activación del sistema del complemento, lo cual provoca la lisis celular. El resultado se valora mediante microscopía óptica, utilizando un microscopio invertido, tras la adición de un colorante vital (eosina) capaz de penetrar en

I. Introducción

las células muertas, o mediante microscopía de fluorescencia en el caso de utilizar colorantes fluorescentes. La CDC es una técnica que sigue empleándose en la prueba cruzada, la cual se realiza de manera obligatoria previamente al trasplante renal (76), ya que un resultado positivo tiene un elevado poder predictivo positivo de desarrollo de rechazo hiperagudo. De este modo, un resultado de prueba cruzada por CDC positivo contraindica la realización del trasplante. Entre sus limitaciones destaca el hecho de que únicamente detecta aquellos anticuerpos capaces de activar el sistema del complemento, no detecta anticuerpos presentes a baja concentración y puede dar lugar a falsos positivos como consecuencia de la detección de autoanticuerpos.

La citometría de flujo, al igual que la CDC, se basa en la utilización de células del donante y suero del receptor con el objetivo de determinar la presencia en el suero de anticuerpos anti-HLA dirigidos contra el donante. A diferencia de la CDC para la visualización de los resultados se utilizan anticuerpos monoclonales. Además, permite la detección de anticuerpos anti-HLA tanto fijadores como no fijadores de complemento, por lo que es una técnica más sensible que la CDC. Es útil para la identificación de pacientes que presentan DSA que no fijan complemento y que, por tanto, dan lugar a una prueba cruzada por CDC negativa, pero que sin embargo tienen un mayor riesgo de AbMR (77,78).

Los ensayos de Luminex, más recientemente introducidos, son técnicas de fase sólida muy sensibles y específicas, gracias a las cuales se puede determinar la especificidad de los anticuerpos anti-HLA y que han revolucionado la histocompatibilidad. Se basan en la utilización de microesferas fluorescentes a las cuales se encuentran adheridas moléculas HLA (79).

La presencia y especificidad de los anticuerpos anti-HLA se determina en los pacientes sometidos a trasplante renal de manera previa al trasplante así como periódicamente tras el trasplante, con el objetivo de prevenir la aparición de AbMR, puesto que los pacientes con anticuerpos anti-HLA tienen un mayor riesgo de desarrollar AbMR y de sufrir una pérdida del injerto. Otro aspecto importante y que en ocasiones no es tenido en cuenta, hace referencia a las subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que conforman los anticuerpos anti-HLA, ya que no todas ellas tienen la misma capacidad para activar el sistema del complemento. IgG3 e IgG1 tienen mayor capacidad de fijación

de complemento que IgG2. IgG4, por su parte no activa el complemento, lo cual se traduce en que los anticuerpos anti-HLA IgG3 tienen una mayor asociación con la aparición de AbMR agudo, mientras que los IgG4 se asocian con la presencia de AbMR subclínico y crónico a través de mecanismos independientes del complemento (80–82).

El estudio de la sensibilización HLA de los pacientes trasplantados renales es, por tanto, un aspecto de gran importancia, ya que reduce de manera considerable la probabilidad de llevar a cabo un trasplante de manera satisfactoria. Estos anticuerpos anti-HLA se desarrollan, en la mayoría de las ocasiones, como consecuencia de transfusiones sanguíneas (o de derivados), embarazos (o abortos), así como debido a trasplantes previos que han fracasado. Los nuevos métodos para la detección y caracterización de los anticuerpos anti-HLA, especialmente los que emplean la tecnología Luminex, han permitido aumentar las posibilidades de éxito del trasplante, aunque esto también se traduce en que a mayor número de especificidades detectadas, menor es la posibilidad de encontrar un donante compatible. Por tanto, debe establecerse un equilibrio entre sensibilidad, o capacidad de detección de gran cantidad de anticuerpos anti-HLA en el receptor, mejorando así la supervivencia del injerto, y especificidad, o caracterización de aquellos anticuerpos clínicamente relevantes. En función de estos anticuerpos anti-HLA puede establecerse el panel reactivo de anticuerpos (PRA), gracias al cual se determina el porcentaje de antígenos HLA frente a los que se han desarrollado anticuerpos. El PRA refleja, por consiguiente, el pronóstico del trasplante. Pacientes con mayor PRA tienen una menor probabilidad de encontrar un donante compatible, presentan una menor supervivencia del injerto en el caso de ser trasplantados y además, la supervivencia de estos pacientes es menor (83). Otro aspecto importante, es la prueba cruzada virtual (PCv), la cual permite predecir si el suero del receptor de trasplante renal va a reaccionar frente a los antígenos HLA del posible donante, siempre y cuando dispongamos de los datos de las especificidades de anticuerpos anti-HLA presentes en el receptor, así como del tipaje HLA del donante. Gracias a la PCv se acelera la toma de decisiones acerca de si un injerto es válido o no para un receptor, sin la necesidad de contar con la muestra celular del donante.

Concretamente en España, la ONT creó en 2015 un programa para aumentar las posibilidades de trasplante de los pacientes hiperinmunizados, el cual se conoce como

I. Introducción

programa PATHI, Plan Nacional de Acceso al trasplante renal para pacientes hiperinmunizados. Los criterios vigentes con fecha de redacción de la presente Tesis Doctoral para poder participar en este programa incluyen que los pacientes deben estar en lista de espera de trasplante renal, tener un PRA calculado (cPRA) mediante Luminex superior al 98% y llevar más de un año en TRS en diálisis. Los donantes, por su parte, deben disponer de los dos riñones válidos para el trasplante y haber fallecido en muerte encefálica y tener entre 18-70 años o en asistolia controlada con edad inferior a 60 años.

No obstante, la definición del perfil de anticuerpos anti-HLA no es procedimiento estandarizado, por lo que debe estudiarse de manera detenida a la hora de determinar los antígenos HLA prohibidos para cada uno de los receptores en lista de espera de trasplante renal. Para ello, es fundamental el desarrollo de estrategias que permitan clasificar de una manera exhaustiva los anticuerpos anti-HLA de acuerdo a su relevancia clínica. Así mismo, existen distintas estrategias encaminadas a la desensibilización de los pacientes, es decir, a intentar reducir o eliminar la presencia de los anticuerpos anti-HLA, entre las que destacan el uso de IGIVs, rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20 o plasmaféresis, entre otros (84).

En lo que respecta al tratamiento de los pacientes con AbMR, no se ha demostrado la existencia de ningún tratamiento que resulte eficaz frente al AbMR crónico, por lo que los fármacos utilizados se centran en hacer frente al AbMR agudo. Los abordajes terapéuticos en pacientes con AbMR consisten en intentar eliminar la presencia de anticuerpos anti-HLA, reducir su producción y bloquear sus efectos, para lo cual se utiliza la plasmaféresis, la administración de IGIVs, así como fármacos tales como rituximab, bortezomib, inhibidor del proteasoma o eculizumab, anticuerpo monoclonal anti-C5 (85). Un aspecto que no debe pasarse por alto es la importancia de promover la adherencia al tratamiento inmunosupresor estándar por parte del paciente para así reducir en la medida de los posible la aparición de rechazo del injerto (86).

Por todo ello, no hay ninguna duda de que el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos del rechazo mediado por anticuerpos es crucial para poder desarrollar opciones terapéuticas para estos pacientes. La presencia de anticuerpos anti-HLA y concretamente de aquellos dirigidos frente a moléculas HLA del donante es un aspecto fundamental. Sin embargo, la búsqueda de nuevos biomarcadores que ayuden en su

predicción y diagnóstico es un tema de gran importancia. La generación de linfocitos B memoria alorreactivos y su diferenciación a células B plasmáticas productoras de los anticuerpos anti-HLA juega un papel esencial en el AbMR.

3. Ontogenia de los linfocitos B

Los linfocitos B se originan en la médula ósea a partir de células progenitoras hematopoyéticas, en un proceso conocido como hematopoyesis (87).

Las etapas iniciales del desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea tienen como objetivo el reordenamiento funcional de los segmentos V-(D)-J de las inmunoglobulinas, proceso fundamental, ya que gracias a estos reordenamientos es como se consigue el gran repertorio de células B presente en el organismo, capaz de reconocer más de 5×10^{13} antígenos diferentes (88). Se trata, por tanto de un proceso de maduración independiente de antígeno. Dentro de este reordenamiento se distinguen varias etapas.

En la primera de ellas, la célula pro-B lleva a cabo los reordenamientos de D-J de la cadena pesada y a continuación el reordenamiento de la región V con el segmento de DJ. Es un requisito indispensable que este reordenamiento de la cadena pesada sea funcional, concretamente del gen μ , para llegar al estadio de célula pre-B, donde tiene lugar el reordenamiento de los segmentos génicos que codifican las cadenas ligeras kappa y lambda. La combinación de la cadena ligera con la cadena pesada μ , permite la formación de la IgM, la cual se expresa en la superficie celular y se asocian con otras moléculas (Ig- α e Ig- β) dando lugar al receptor del linfocito B (BCR) (89–91).

Estas células que expresan la IgM en la membrana se denominan linfocitos B inmaduros y son capaces de abandonar la médula ósea y migrar al bazo para continuar con su diferenciación dando lugar a células B transicionales, a partir de las cuales se generarán las correspondientes células B naïve, foliculares o de la zona marginal. Los linfocitos B inmaduros deben pasar un punto de control que garantice que el BCR es funcional, es decir, capaz de transmitir señales al interior celular (selección positiva) y que además no reconoce antígenos propios (selección negativa). Gracias a este proceso de selección negativa se asegura la eliminación de células autorreactivas (92–94). Además de que el

I. Introducción

BCR sea funcional, para la supervivencia de las células B en la periferia son necesarias una serie de señales de supervivencia entre las que destacan las generadas por la unión del factor activador de células B (BAFF) a su receptor (BAFFR) expresado en las células inmaduras y transicionales, entre otras (95,96).

Únicamente una pequeña proporción de los linfocitos B maduros corresponden a células de la zona marginal, ya que la mayor parte de los linfocitos B maduros son linfocitos B foliculares, los cuales coexpresan en su membrana tanto IgM como IgD.

El proceso de maduración de estos linfocitos es un proceso dependiente de antígeno, el cual tiene lugar en los órganos linfoides secundarios. Si los linfocitos B naïve no son capaces de encontrar su antígeno específico acaban muriendo al cabo de varios días. Si por el contrario, este reconocimiento tiene lugar, se producen una serie de señales que conducen a su proliferación y maduración hacia célula efectora (97).

Las principales células B efectoras son las células plasmáticas encargadas de la producción de anticuerpos específicos frente a los antígenos con los que han entrado en contacto (98,99), pero también se generan linfocitos B memoria, los cuales destacan por su rápida capacidad de respuesta frente a estímulos antigénicos en comparación con los linfocitos B inmaduros y naïve, gracias a la gran expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) (98,100). Las células B memoria se caracterizan por la expresión de CD27 y en función de la expresión o no de IgD podemos diferenciar dos tipos, linfocitos B memoria sin cambio de isotipo (CD27⁺ IgD⁺) y linfocitos B memoria con cambio de isotipo (CD27⁺ IgD⁻) (Figura 9) (101).

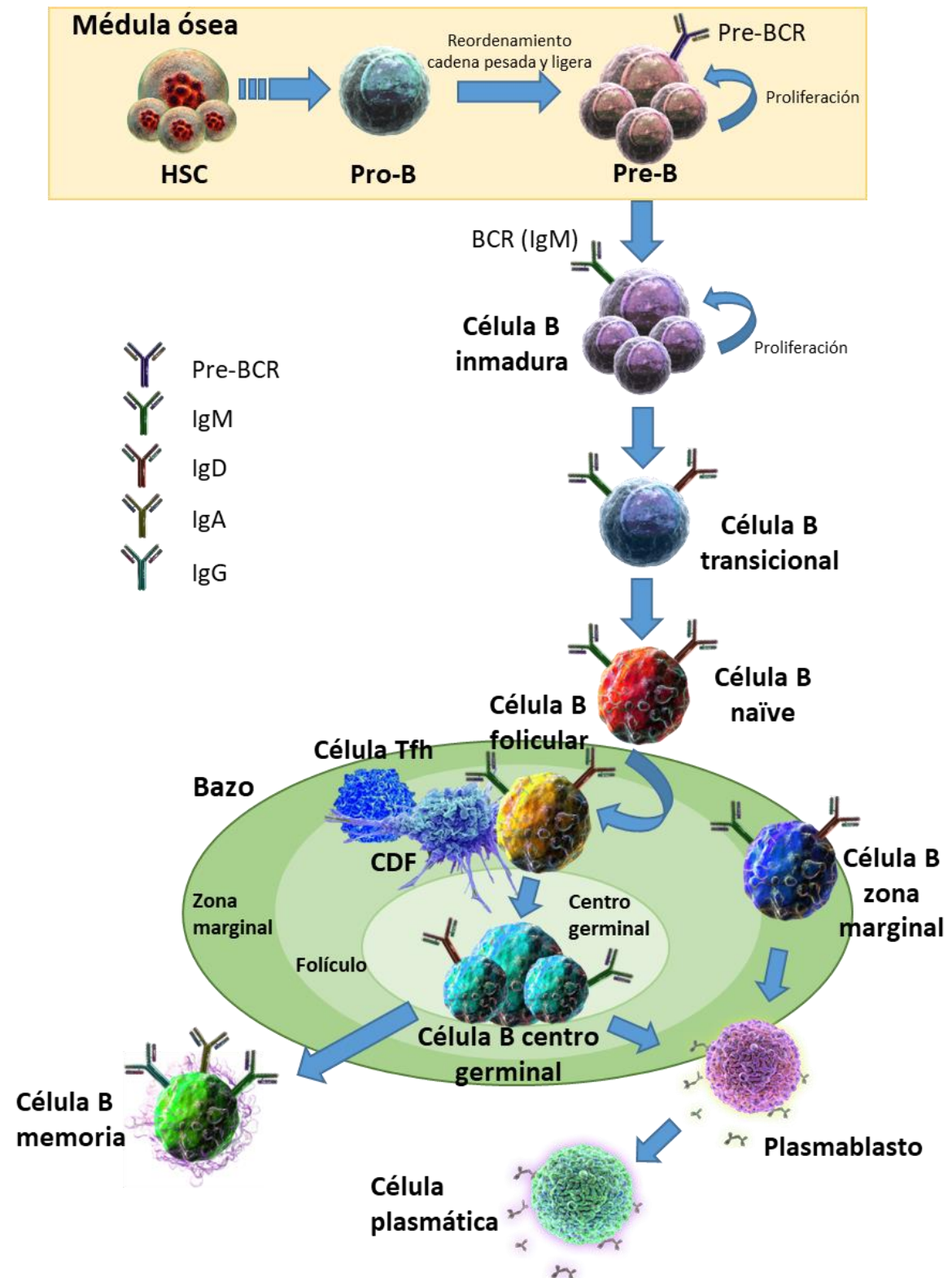


Figura 9. Ontogenia de los linfocitos B.

4. Factores implicados en el desarrollo y la homeostasis de los linfocitos B

La homeostasis de los linfocitos B está regulada por diversos factores, entre los que destacan el factor activador de células B (BAFF, también denominado miembro de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral 13B, TNFSF13B, o estimulador de linfocitos B, BLyS) y el ligando inductor de la proliferación (APRIL). BAFF es una proteína de membrana perteneciente a la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF), aunque también se presenta de forma soluble, compartiendo hasta un 50% de homología con APRIL (102,103). APRIL, sin embargo, existe mayoritariamente en su forma secretada, ya que su escisión se produce en el aparato de Golgi (104).

BAFF es, por tanto, una citocina expresada y secretada por diversas células del sistema inmunitario, predominantemente células mieloides (monocitos, macrófagos y células dendríticas), así como por un subtipo de linfocitos T, entre otras, la cual está implicada en la supervivencia, proliferación, diferenciación y maduración de diferentes subpoblaciones de linfocitos B (105–107). APRIL también es producida por células mieloides, así como por diversos tipos celulares de linaje no hematopoyético (108), pero posee un papel más limitado sobre los linfocitos B, ya que se ha observado que ratones deficientes en APRIL poseen una maduración normal de los linfocitos B, así como un correcto desarrollo del sistema inmunitario (109,110). No obstante, se ha descrito el papel de APRIL como factor estimulador del crecimiento celular tumoral (111).

Estudios *in vitro* han demostrado que diversas citocinas implicadas en la regulación del sistema inmunitario, tales como interferón- γ (IFN- γ) e interleucina-10 (IL-10), son capaces de estimular la expresión de BAFF en células mieloides (112).

BAFF es capaz de unirse a tres receptores diferentes, el receptor de BAFF (BAFFR, también conocido como TNFRSF13C o receptor de BLyS 3), el antígeno de maduración de células B (BCMA) y *T cell activator and calcium modulating ligand interactor* (TACI). Los tres receptores son expresados por los linfocitos B aunque su expresión varía dependiendo del estadio de desarrollo de la célula (113,114). BAFFR es el primero en expresarse y el único necesario para la supervivencia de las células B transicionales y naïve. Se expresa en todas las subpoblaciones de linfocitos B excepto en las células

plasmáticas (96,115). La expresión de BCMA, por su parte, parece estar restringida a linfocitos B maduros, expresándose de manera constitutiva en células plasmáticas promoviendo de esta manera su supervivencia (116). TACI se expresa en linfocitos B activados, linfocitos B de la zona marginal, linfocitos B memoria con cambio de isotipo, así como en células plasmáticas (117,118). Este receptor junto con BAFFR se ha visto implicado con el cambio de clase de las inmunoglobulinas (Igs) (119). Además, mutaciones en TACI se ha relacionado con el desarrollo de inmunodeficiencias (120). A diferencia de lo que ocurre con BCMA y BAFFR, TACI inhibe la proliferación celular y la producción de inmunoglobulinas (121,122) (Figura 10).

APRIL, por su parte, es capaz de unirse fuertemente a BCMA y de manera moderada a TACI, pero no interacciona con BAFFR.

I. Introducción

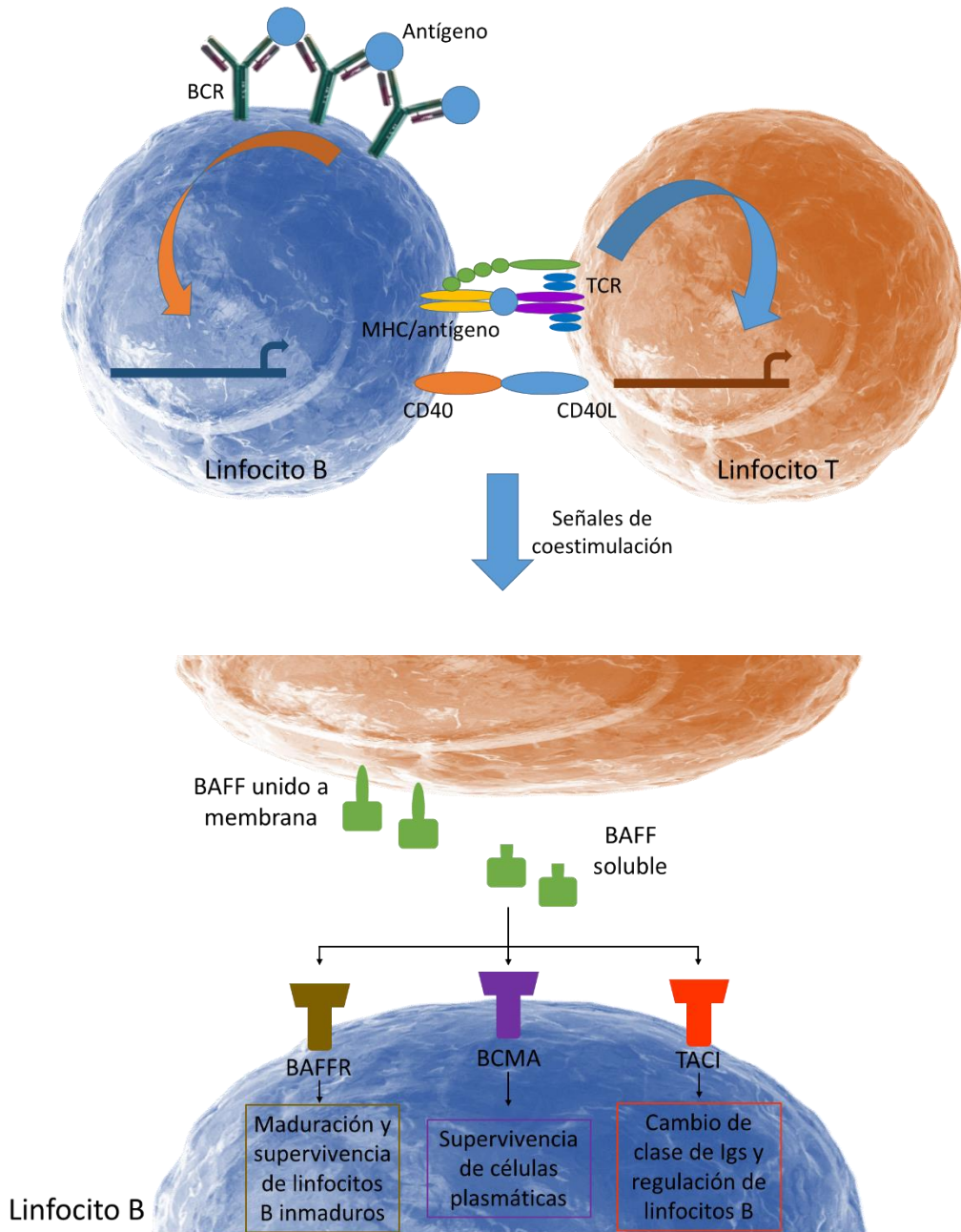


Figura 10. Papel de BAFF en las señales de coestimulación necesarias para la activación de los linfocitos B. BCR: receptor del linfocito B; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; BAFF: factor activador de células B; BAFFR: receptor de BAFF; BCMA: antígeno de maduración de células B; TACI: T cell activator and calcium modulating ligand interactor.

Defectos en la expresión tanto de BAFF como de BAFFR se han relacionado con una alteración del desarrollo de los linfocitos B más allá de la etapa inmadura, afectando a la formación de células B foliculares y de la zona marginal (123,124). Del mismo modo,

experimentos en ratones han demostrado que defectos en la señalización del BCR y de BAFFR implican una ausencia de poblaciones de células B en la periferia (125).

Distintos estudios han demostrado la importancia de BAFF en la biología de las células B, aumentando la respuesta inmunitaria humoral, tanto frente a antígenos T dependientes como independientes, induciendo el cambio de clase de las Igs, así como actuando como molécula coestimuladora de la activación de células T (126,127).

Así mismo, destaca el papel de BAFF en la tolerancia inmunológica, mecanismo gracias al cual en condiciones fisiológicas las células B autorreactivas son eliminadas, evitando de esta manera la generación de autoanticuerpos. Una ruptura de este proceso de tolerancia da lugar al desarrollo de fenómenos autoinmunes. Estudios llevados a cabo en ratones han demostrado un aumento de la presencia de células B autorreactivas como consecuencia de una sobreexpresión de BAFF (128), lo cual indica una implicación de dicha molécula en la patogénesis de diferentes enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico (129), síndrome de Sjögren (130), artritis reumatoide (131), esclerosis sistémica (132) o esclerosis múltiple (133), entre otras. Así mismo, también está descrito el hecho de que niveles elevados de BAFF en suero se correlacionan con la gravedad de dichas enfermedades autoinmunes (134–137), así como con los títulos de los correspondientes autoanticuerpos patogénicos (135,138,139).

Todo ello, ha llevado a la generación de anticuerpos antagonistas de BAFF, así como de su receptor, BAFFR, entre los que destaca belimumab, con el objetivo de neutralizar sus efectos y posibilitar tratamientos alternativos a este tipo de pacientes (140–143).

A diferencia de los que ocurre en el campo de la autoinmunidad, el papel de BAFF en el ámbito del trasplante, donde existen menos estudios realizados, es más controvertido.

Por un lado, algunos autores indican que los niveles séricos de BAFF son indicativos del perfil de riesgo inmunológico de los pacientes tras el trasplante renal, al considerar que los niveles de BAFF pretrasplante (PreTx) se encuentran asociados con el grado de sensibilización previa al trasplante y son, por tanto, un biomarcador de utilidad para predecir el rechazo del injerto (144–146). Siguiendo en esta línea, se afirma que la expresión de BAFF se correlaciona con el panel reactivo de anticuerpos (PRA) preTx,

I. Introducción

indicando que dicha molécula está implicada en los fenómenos que llevan a la pérdida del injerto (147). Así mismo, niveles elevados de BAFF se encuentran asociados con el daño mediado por anticuerpos tras el trasplante renal (148) y con un aumento del riesgo de desarrollo de AbMR (149–151). Un metaanálisis publicado recientemente evaluó el valor predictivo de los niveles séricos de BAFF para AbMR, indicando que la incidencia de AbMR es significativamente más elevada en pacientes con niveles más elevados de BAFF (152).

Por el contrario, hay autores que afirman que los niveles de BAFF no son un biomarcador pronóstico para la disfunción del injerto o para la supervivencia de los pacientes trasplantados renales, ya que los niveles de séricos de BAFF no están relacionados con la sensibilización anti-HLA (153) y que pacientes que presentan AbMR poseen niveles significativamente más bajos de BAFF (154). También se ha descrito que niveles elevados de BAFF no se asocian con el resultado del injerto en pacientes trasplantados renales que reciben inducción con rituximab (155).

A la vista de estos resultados, en la presente Tesis Doctoral se analizó el papel de los niveles de BAFF y de otras subpoblaciones celulares tanto preTx como de manera prospectiva en pacientes trasplantados renales para evaluar su utilidad como biomarcador predictor y de diagnóstico de AbMR.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Hipótesis

El trasplante renal representa el tratamiento óptimo para los pacientes con enfermedad renal terminal (ERT). Gracias al desarrollo de fármacos inmunosupresores y a un mayor conocimiento de los mecanismos a través de los cuales el sistema inmune responde frente al órgano trasplantado, el rechazo mediado por células T ha dejado de ser una de las principales causas de pérdida del injerto en los pacientes trasplantados renales. Sin embargo, el rechazo mediado por anticuerpos (AbMR) continúa siendo una causa importante de pérdida del órgano trasplantado, por lo que es necesario un mayor conocimiento de los mecanismos etiopatogénicos que conducen a su desarrollo.

Con las células T bajo control, todos los esfuerzos deben centrarse en el estudio de las células B, ya que es este tipo celular el precursor de las células plasmáticas productoras de anticuerpos, siendo éstos, especialmente los anticuerpos anti-HLA, uno de los criterios para el diagnóstico del AbMR. El estudio de las subpoblaciones de linfocitos B así como de los factores implicados en su diferenciación y supervivencia, junto a un mejor conocimiento de los mecanismos patogénicos implicado en el AbMR, puede permitir añadir nuevos biomarcadores a los anticuerpos anti-HLA para el manejo clínico del AbMR en el trasplante renal.

Objetivos

El principal objetivo de la presente Tesis Doctoral se basa en la búsqueda de nuevos biomarcadores implicados en el rechazo mediado por anticuerpos (AbMR) en pacientes trasplantados renales, los cuales sean de utilidad para la predicción y diagnóstico de esta entidad clínica y permitan un mayor conocimiento de la patogenia de este proceso, así como en la definición de procedimientos técnicos para el estudio de anticuerpos anti-HLA en los pacientes hipersensibilizados.

Los objetivos secundarios son:

1. Analizar los niveles séricos de BAFF en el momento previo al trasplante, así como de manera prospectiva y establecer su asociación con la presencia de anticuerpos anti-HLA en pacientes trasplantados renales que sufren AbMR.
2. Estudiar la distribución de las subpoblaciones de linfocitos B y T circulantes pretrasplante y de manera prospectiva en pacientes con AbMR.
3. Definir combinaciones de biomarcadores para la monitorización de pacientes trasplantados renales.
4. Analizar el efecto de la terapia de inducción en las poblaciones celulares, haciendo hincapié en las subpoblaciones de linfocitos B.
5. Estudiar la relación entre incompatibilidades de *eplets* de moléculas HLA y el desarrollo de AbMR.
6. Mejorar la definición técnica del perfil de anticuerpos anti-HLA en pacientes hipersensibilizados.

III. MATERIAL Y MÉTODOS



1. Aspectos ético-legales

El presente trabajo ha sido sometido a la aprobación por parte del Comité de Ética de Investigación Clínica de Cantabria (número de referencia: 1014/161; 1 de agosto de 2014). Del mismo modo, todos los pacientes trasplantados renales y sujetos sanos incluidos en el estudio han sido informados acerca de los objetivos del estudio y han firmado el correspondiente consentimiento informado para la publicación de los datos que se obtengan.

2. Estudios realizados

Con el objetivo de abordar las diferentes cuestiones planteadas en la presente Tesis Doctoral, se diseñó un estudio prospectivo en el que participaron pacientes con ERT, a los que se realizó un seguimiento durante 24 meses tras el trasplante. Además, se llevó a cabo un estudio retrospectivo en el que se incluyeron pacientes hipersensibilizados incluidos en lista de espera de trasplante renal.

2.1. Estudio prospectivo

En el estudio prospectivo, fueron incluidos 109 pacientes con enfermedad renal crónica terminal sometidos a trasplante de riñón entre los años 2015 y 2018 en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV), con el objetivo de identificar nuevos biomarcadores implicados en la patogenia del AbMR. La monitorización de dichos pacientes tuvo lugar de manera secuencial, para lo cual se recogieron muestras en el momento previo al trasplante, así como a los 6, 12 y 24 meses del mismo, en las correspondientes consultas de trasplante llevadas a cabo en el Servicio de Nefrología del HUMV. Así mismo, en los pacientes con sospecha de rechazo dentro del primer año postTx como consecuencia de una función retrasada del injerto de manera mantenida, un aumento de la creatinina o desarrollo de proteinuria en los que se llevó a cabo una biopsia renal por indicación para confirmar la existencia de rechazo clínico y en aquellos que fueron sometidos a una biopsia de protocolo a los 12 meses tras el trasplante para poner en evidencia la presencia de rechazo subclínico, se recogió una muestra adicional

III. Material y Métodos

(Figura 11). Todos los resultados de las biopsias fueron reclasificados de acuerdo a la clasificación de Banff 2017.

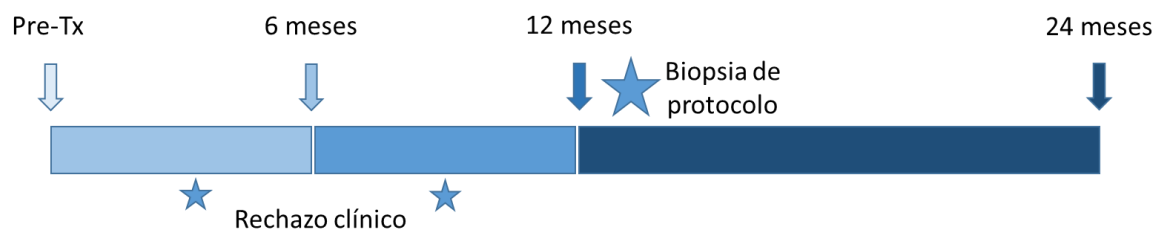


Figura 11. Cronograma de la extracción de muestras.

Además, se incluyó un grupo control formado por 40 sujetos sanos no trasplantados, pareado en edad y sexo con la cohorte de pacientes trasplantados renales incluidos en el estudio, con el objetivo de poder llevar a cabo las comparaciones necesarias.

Para la monitorización de los posibles biomarcadores a los 6, 12 y 24 meses tras el trasplante se seleccionaron aquellos pacientes trasplantados renales que no presentaban factores de confusión. Concretamente, se seleccionaron 51 pacientes, los cuales no sufrieron ningún evento de rechazo durante los 12 primeros meses post-trasplante, no recibieron ningún tratamiento (timoglobulina, rituximab, plasmaféresis, IGIVs) adicional aparte de la terapia de inducción (timoglobulina, n = 23; basiliximab, n = 12), en los casos en los que fue administrada, y a los que se les realizó una biopsia de protocolo a los 12 meses postTx que permitió observar el desarrollo de AbMR subclínico, el cual se produjo en un 9,8% de los casos.

Para valorar el efecto de las terapias de inducción en la dinámica de las diferentes poblaciones celulares se seleccionaron 91 pacientes, los cuales, únicamente, recibieron tratamiento con terapia de inducción (timoglobulina, basiliximab) en los casos en los que fue necesario, no recibiendo timoglobulina ni rituximab postTx como tratamiento del rechazo agudo. Concretamente, 44 pacientes fueron tratados con timoglobulina y 20 con basiliximab como terapias de inducción. Así mismo, 27 pacientes no recibieron ningún tratamiento de inducción.

2.2. Estudio retrospectivo

En el estudio retrospectivo se incluyeron 18 pacientes hipersensibilizados, con un cPRA >98% incluidos en lista de espera de trasplante renal en el HUMV, los cuales no recibieron ningún tratamiento de desensibilización con rituximab ni con IGIVs en los 12 meses previos a su incorporación en el estudio, con el objetivo de definir de una manera más exhaustiva el perfil de anticuerpos anti-HLA.

3. Muestras recogidas

3.1. Estudio prospectivo

3.1.1. Muestras de los receptores

En cada uno de los distintos puntos de control se recogieron 10 mL de sangre periférica en un tubo sin anticoagulante, así como 5 ml de sangre anticoagulada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

A partir de la sangre almacenada en tubos sin anticoagulante se procedió a la extracción del suero mediante centrifugación a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Dicho suero fue almacenado a -20°C hasta su utilización para los correspondientes ensayos (estudio de anticuerpos anti-HLA, determinación de niveles de BAFF y APRIL soluble).

La sangre anticoagulada con EDTA fue sometida a una purificación en gradiente de densidad mediante el empleo de Ficoll Histopaque (Sigma-Aldrich) para el consiguiente aislamiento y purificación de las células mononucleares (PBMCs). Para ello, se llevó a cabo una centrifugación sin freno a 2000 rpm durante 20 minutos a TA. Tras dicho procedimiento se recogió la correspondiente población leucocitaria y se efectuó un lavado con tampón fosfato salino (PBS) mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos a TA. Al finalizar la centrifugación se eliminó el PBS mediante decantación y el pellet celular resultante fue resuspendido en medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 (Sigma-Aldrich) con el objetivo de llevar a cabo los correspondientes ensayos de citometría de flujo para identificar las diferentes subpoblaciones de linfocitos B y T.

Así mismo, se procedió al aislamiento de ácido desoxirribonucleico (ADN) de forma automatizada mediante Maxwell 16 System (Promega Inc.) para la determinación del tipaje HLA y poder establecer las incompatibilidades HLA, así como de *eplets*.

3.1.2. Muestras de los sujetos sanos

Se realizó una única extracción de 10 mL de sangre periférica en tubo sin anticoagulante y 5 ml de sangre anticoagulada con EDTA.

Al igual que en el caso de las muestras de los receptores, a partir de la sangre almacenada en tubos sin anticoagulante se procedió a la extracción del suero mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a TA. Dicho suero fue almacenado a -20°C hasta su utilización para la determinación de los niveles séricos de BAFF y APRIL.

La sangre anticoagulada con EDTA fue nuevamente sometida a una purificación en gradiente de densidad mediante el empleo de Ficoll-Histopaque para el consiguiente aislamiento y purificación de las PBMCs. Para ello, se llevó a cabo una centrifugación sin freno a 2000 rpm durante 20 minutos a TA. Tras dicho procedimiento se recogió la correspondiente población leucocitaria y se efectuó un lavado con PBS mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos a TA. Al finalizar la centrifugación se eliminó el PBS mediante decantación y el pellet celular resultante fue resuspendido en medio de cultivo RPMI-1640 con el objetivo de llevar a cabo los correspondientes ensayos de citometría de flujo para el estudio de las subpoblaciones de linfocitos B y T.

3.1.3. Muestras de los donantes

Se realizó una única extracción de 5 mL de sangre anticoagulada con EDTA en el momento previo al trasplante.

Tal y como se realizó en el caso de las muestras de los receptores, se procedió al aislamiento de ADN de forma automatizada mediante Maxwell 16 System (Promega Inc.) para la determinación del tipaje HLA y el estudio de incompatibilidades HLA, así como de *eplets*.

3.2. Estudio retrospectivo

3.2.1. Muestras de los receptores

Se recogieron 5 mL de sangre periférica en tubo sin anticoagulante, así como 5 ml de sangre anticoagulada con EDTA.

Al igual que en el estudio prospectivo, a partir de la sangre almacenada en tubos sin anticoagulante se procedió a la extracción del suero mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a TA. Dicho suero fue utilizado para la determinación de anticuerpos anti-HLA de clase I en tres condiciones: neto, dilución 1/160 y estudio de especificidades fijadoras de complemento mediante el test de C1q (C1qScreen, One Lambda Inc.); así como para la realización de la prueba cruzada mediante CDC y citometría de flujo.

La sangre anticoagulada con EDTA se empleó para el aislamiento de ADN de forma automatizada mediante Maxwell 16 System (Promega Inc.) para la determinación del tipaje HLA.

3.2.2. Muestras de los donantes

Se recogieron 5 mL de sangre anticoagulada con EDTA, la cual se empleó nuevamente para el aislamiento de ADN de forma automatizada mediante Maxwell 16 System (Promega Inc.) para la determinación del tipaje HLA, así como para el aislamiento de PBMCs, tal y como se ha mencionado anteriormente, con el objetivo de poder llevar a cabo la prueba cruzada tanto por CDC como por citometría de flujo.

4. Inmunofenotipado de subpoblaciones de linfocitos B y T mediante citometría de flujo multiparamétrica

Las células mononucleares aisladas mediante Ficoll-Histopaque se pusieron en contacto con los anticuerpos monoclonales detallados en la Tabla 2. Tras dicho marcaje, se llevó a cabo una incubación de 30 minutos, a TA y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al lavado de las muestras para lo cual se añadieron 2 mL de PBS

III. Material y Métodos

con el objetivo de eliminar el exceso de anticuerpo monoclonal y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Finalizada la centrifugación, el sobrenadante se eliminó mediante decantación y el pellet celular resultante se resuspendió en 250 µL para su adquisición en el citómetro de flujo Cytoflex (Beckman Coulter, Inc.). El análisis de los resultados de citometría de flujo se llevó a cabo en el programa de análisis Kaluza (Beckman Coulter Inc.). El inmunofenotipado para la identificación de las subpoblaciones de linfocitos B y T se llevó a cabo tal y como se describe (156) y es detallado en las tablas 3 y 4. En la figura 12 se muestra la estrategia de selección empleada para el estudio de las subpoblaciones de linfocitos B (a, b) y de linfocitos T (c). El cálculo de los números absolutos de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B y T se llevó a cabo mediante la relativización de los correspondientes valores obtenidos tras su adquisición en el citómetro de flujo Cytoflex teniendo en cuenta los números absolutos de linfocitos B y T obtenidos en el citómetro de flujo volumétrico Aquios CL (Beckman Coulter, Inc.).

Tabla 2. Panel de anticuerpos monoclonales empleado para el estudio de las subpoblaciones de linfocitos B y T mediante citometría de flujo.

Fluorocromo	Anticuerpo	Clon	Casa comercial
FITC	CD27	M-T271	BD Biosciences
FITC	CD138	MI15	BD Biosciences
FITC	CD62L	DREG56	Beckman Coulter
PE	CD24	ML5	BD Biosciences
PE	CD268	11C1	BD Biosciences
PE	CD45RO	UCHL1	BD Biosciences
PE-Cy5.5	CD19	J3-119	Beckman Coulter
PE-Cy5.5	CD28	L293	Beckman Coulter
PE-Cy7	CD38	HIT2	BioLegend
PE-Cy7	CD27	1A4	BioLegend
APC	CD5	UCHT2	BioLegend
APC	IgM	G20-127	BD Biosciences
APC	CCR7	REA108	Miltenyi Biotec
APC-Cy7	CD10	HI10a	BioLegend
APC-Vio770	CD27	M-T271	Miltenyi Biotec
APC-Vio770	CD4	VIT4	Immunostep
VioBlue	CD21	HB5	Miltenyi Biotec
VioBlue	CD3	ICHT1	Immunostep

Pacific Blue	CD25	BC96	BioLegend
VioGreen	CD20	LT20	Miltenyi
Brilliant Violet 510	IgD	IA6-2	BioLegend

FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; Cy: Cianina; APC: Alofocianina.

Tabla 3. Inmunofenotipado para la identificación de subpoblaciones de linfocitos B.

Subpoblaciones linfocitos B	Marcadores CD
B Foliculares	CD19 ⁺ CD10 ⁺ CD20 ⁺ CD21 ⁺ CD5 ^{high}
Zona marginal	CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD21 ⁺ CD24 ^{high} CD38 ⁻
Pre B1	CD19 ⁺ CD10 ⁺ CD20 ⁻
Pre B2	CD19 ⁺ CD10 ⁺ CD20 ⁺ CD21 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ^{high}
B Transicionales T1	CD19 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ⁺ CD5 ^{high}
B Transicionales T2	CD19 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ⁺ CD5 ^{low/-}
Bm1	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD38 ⁻
Bm2	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD38 ⁺
Bm2'	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD38 ^{high}
Bm3Bm4	CD19 ⁺ IgD ⁻ CD38 ^{high}
eBm5	CD19 ⁺ IgD ⁻ CD38 ⁺
Bm5	CD19 ⁺ IgD ⁻ CD38 ⁻
B Naïve	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻
B memoria sin cambio de isotipo	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺
B memoria con cambio de isotipo	CD19 ⁺ IgD ⁻ CD27 ⁺
Células plasmáticas	CD19 ⁻ CD20 ⁻ CD27 ^{high} CD38 ^{high} CD138 ⁺

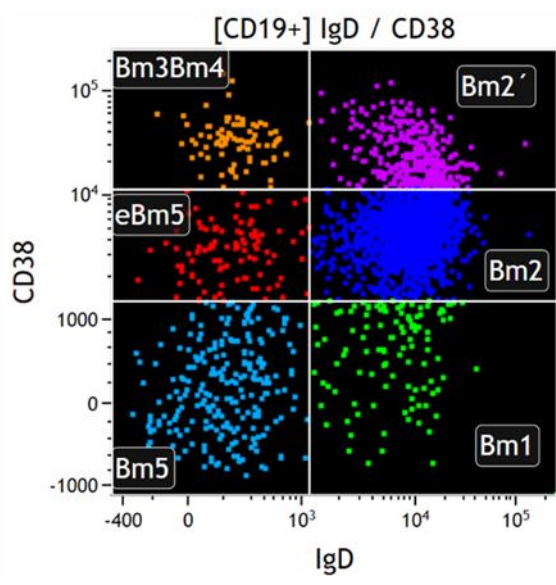
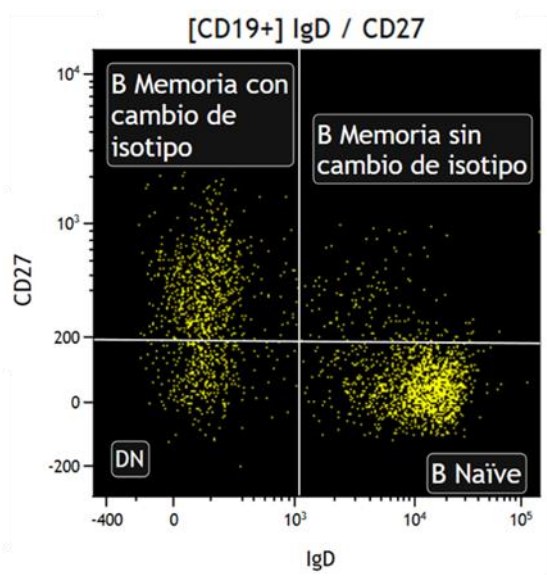
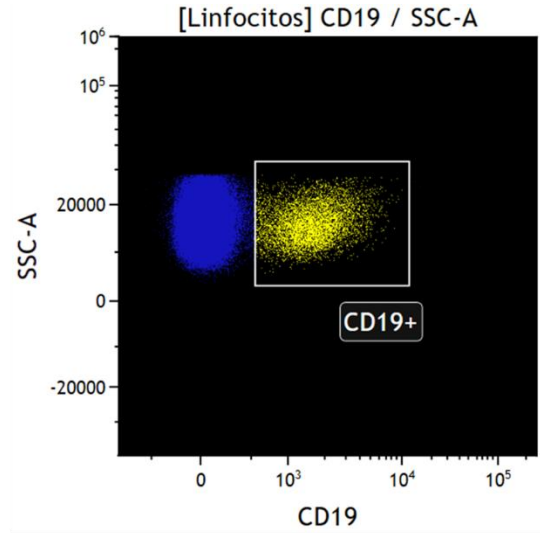
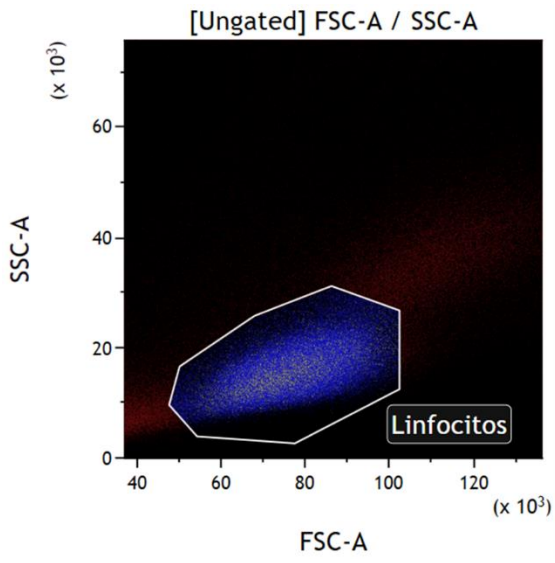
CD: cluster de diferenciación

Tabla 4. Inmunofenotipado para la identificación de subpoblaciones de linfocitos T.

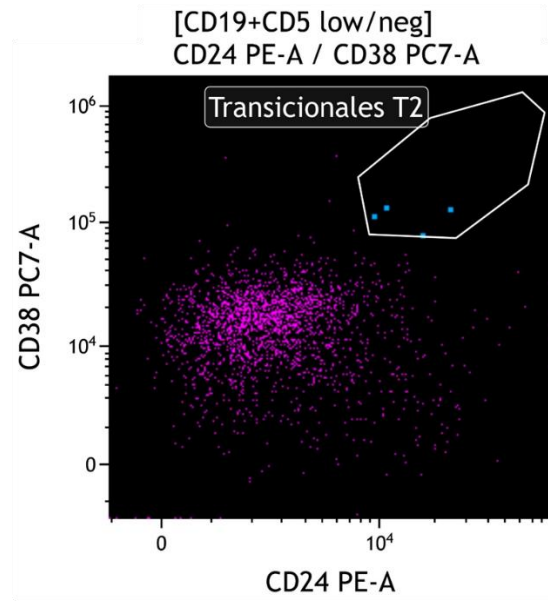
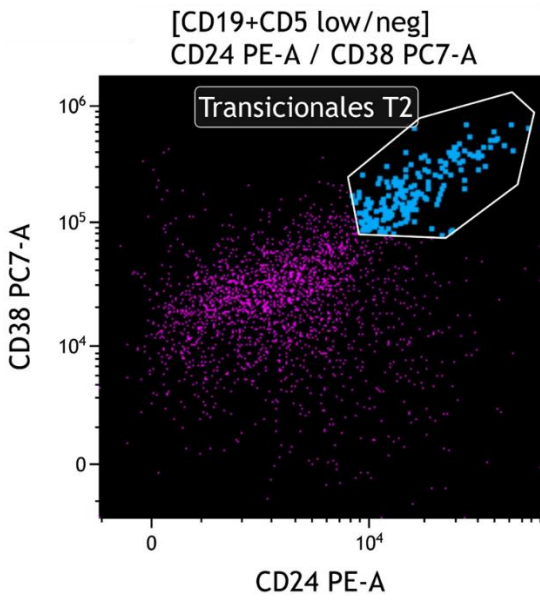
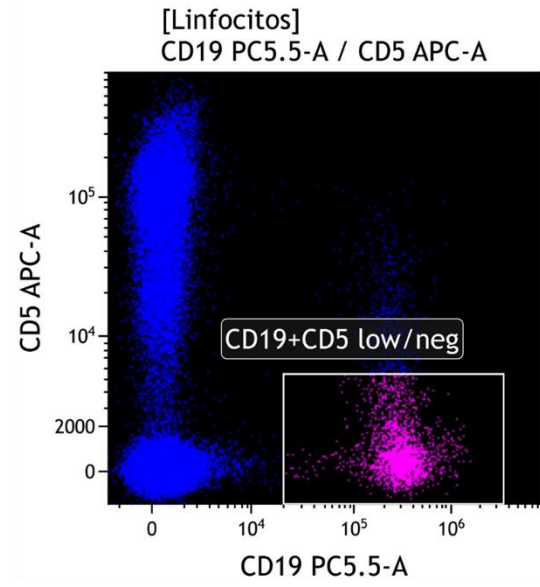
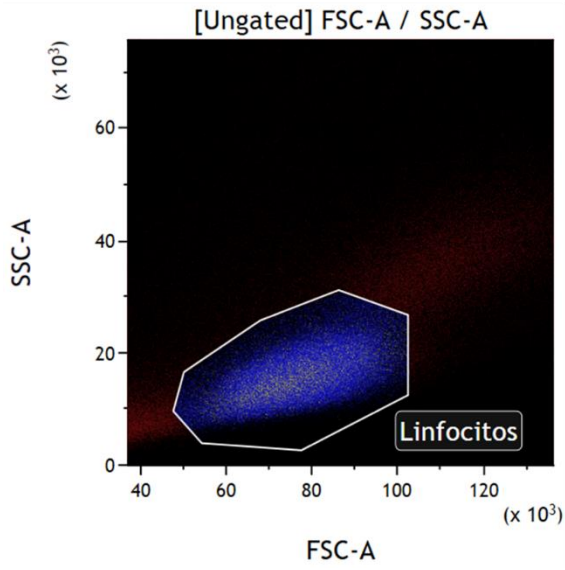
Subpoblaciones linfocitos T	Marcadores CD
CD4 naïve	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ⁺ CD45RO ⁻
CD4 memoria centrales	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ⁺ CD45RO ⁺
CD4 memoria efectoras	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ⁻ CD45RO ⁺
CD4 TEMRA	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ⁻ CD45RO ⁻
CD8 naïve	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD62L ⁺ CD45RO ⁻
CD8 memoria centrales	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD62L ⁺ CD45RO ⁺
CD8 memoria efectoras	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD62L ⁻ CD45RO ⁺
CD8 TEMRA	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD62L ⁻ CD45RO ⁻

CD: cluster de diferenciación

(a)



(b)



(c)

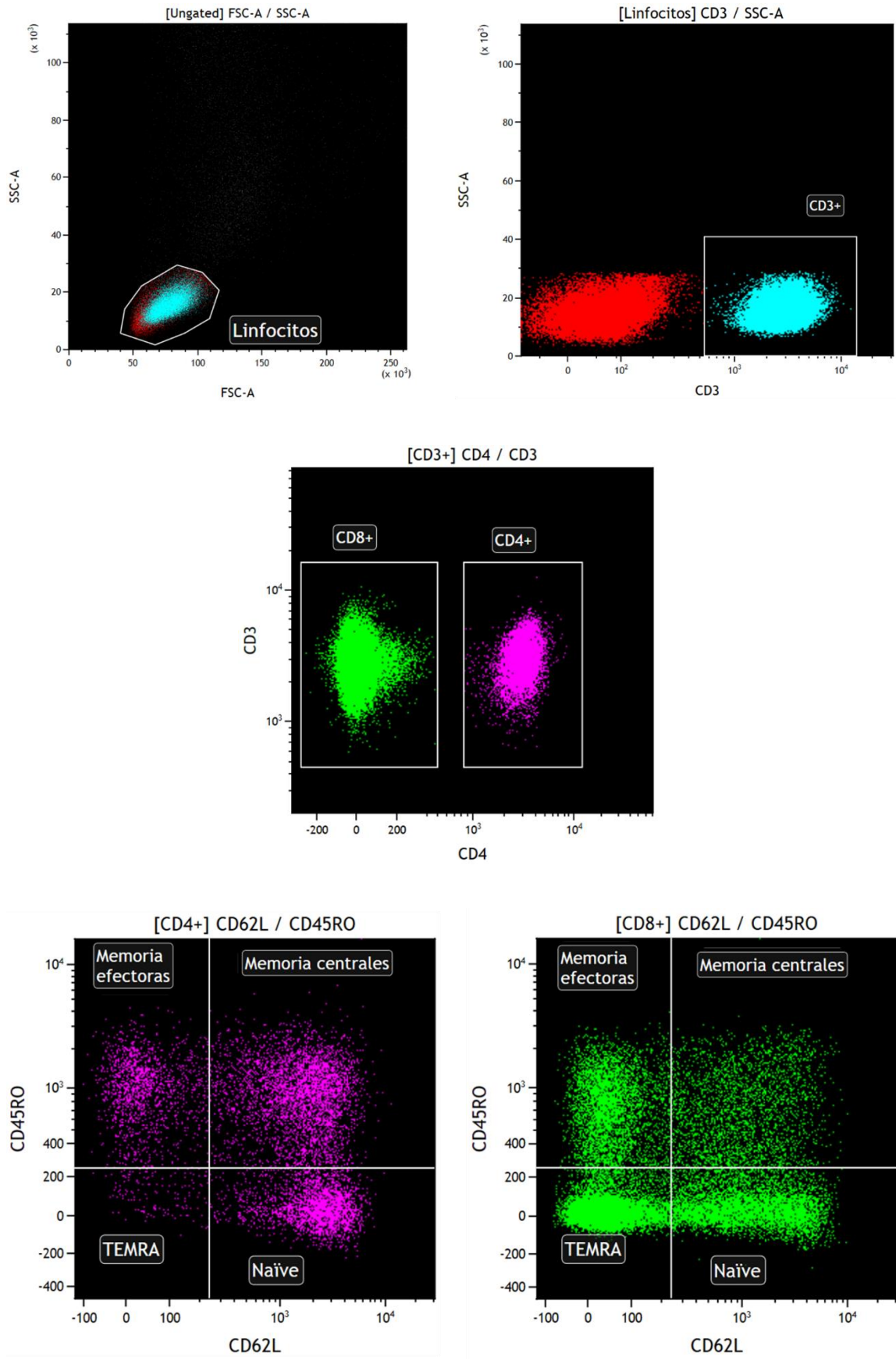


Figura 12. Estrategia de selección de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B y T mediante citometría de flujo. a) Estrategia de selección de las subpoblaciones de linfocitos B. Los linfocitos fueron identificados mediante FSC (Forward Scatter) y SSC (Side Scatter). A partir de la población de linfocitos, se seleccionaron las células CD19⁺ y a partir de ellas y de acuerdo a los marcadores IgD y CD27, las células B naïve (IgD⁺ CD27⁻), memoria sin cambio de isotipo (IgD⁺ CD27⁺) y memoria con cambio de isotipo (IgD⁻ CD27⁺) fueron identificadas. Además, en base a las células CD19⁺ y de acuerdo a los marcadores IgD y CD38, las células B se pueden clasificar en Bm1 (IgD⁺ CD38⁻), Bm2 (IgD⁺ CD38⁺), Bm2' (IgD⁺ CD38^{high}), Bm3Bm4 (IgD⁻ CD38^{high}), eBm5 (IgD⁻ CD38⁺) y Bm5 (IgD⁻ CD38⁻) (157). b) Estrategia de selección de las células B transicionales tipo 2 (T2). Los linfocitos fueron identificados mediante FSC y SSC. A partir de la población de linfocitos, se seleccionaron las células CD19⁺ CD5^{low/-} y en base a ellas y de acuerdo a los marcadores CD24 y CD38, las células transicionales tipo 2 fueron identificadas. Se muestran dos ejemplos representativos de pacientes con niveles altos y bajos de células transicionales tipo 2. La estrategia de selección de las células plasmáticas se basó en la identificación de los linfocitos mediante FSC y SSC. A partir de la población de linfocitos, se seleccionaron las células CD19⁻ CD27^{high} y a partir de éstas, se seleccionaron las células plasmáticas de acuerdo a los marcadores CD38^{high} CD138⁺. c) Estrategia de selección de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Los linfocitos fueron identificados mediante FSC y SSC. A partir de la población de linfocitos, se seleccionaron las células CD3⁺ y a partir de ellas las células CD4⁺ y CD8⁺. En base a estas poblaciones celulares y de acuerdo a los marcadores CD62L y CD45RO, se identificaron las células T naïve (CD62L⁺ CD45RO⁻), memoria central (CD62L⁺ CD45RO⁺), memoria efectora (CD62L⁻ CD45RO⁺) y TEMRA (CD62L⁻ CD45RO⁻).

5. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

5.1. ELISA para la determinación de niveles de BAFF en suero

Se utilizó el kit Quantikine ELISA Human BAFF/BlyS/TNFSF13B (R&D Systems, Inc.) para la determinación cuantitativa de la concentración de BAFF en suero de pacientes trasplantados renales y controles sanos.

Se trata de un ELISA tipo sándwich en el que un anticuerpo monoclonal específico para BAFF se encuentra prefijado en la microplaca. Para la preparación de la recta de calibrado se siguieron las instrucciones que se muestran a continuación (Figura 13).

III. Material y Métodos

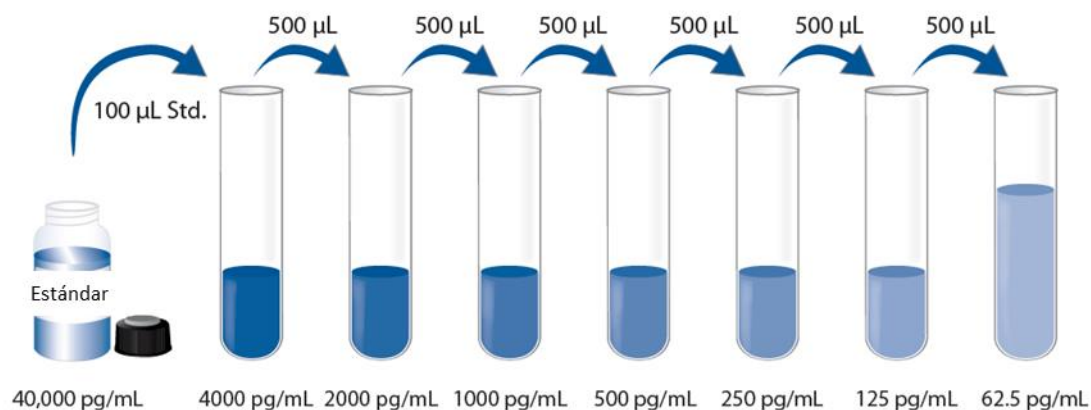


Figura 13. Concentración final de los distintos calibradores empleados en la recta de calibrado.

El resto de reactivos, tampón de lavado, solución de sustrato, también fueron preparados de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante. En primer lugar, se añadieron 100 µL de diluyente a cada pocillo y 50 µL de los calibradores y muestras por pocillo. Debe tenerse en cuenta que previamente a su dispensación, las muestras de suero de los pacientes y de los controles sanos fueron diluidas 1:2. Se cubrió la placa con un adhesivo y se incubó durante 3 horas a TA en agitación. Finalizada la incubación, se aspiró el contenido de cada pocillo y se lavó la placa 4 veces con el correspondiente tampón de lavado. A continuación, se añadieron 200 µL del anticuerpo policlonal conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP), específico para el reconocimiento de BAFF humano, a cada pocillo de la placa. Se cubrió nuevamente la placa con un adhesivo y se incubó durante una 1 hora a TA en agitación. Tras la incubación, se repitieron los ciclos de lavado anteriormente mencionados. Posteriormente, se añadieron 200 µL de solución de sustrato (peróxido de hidrógeno + tetrametilbencidina) por pocillo y se incubó durante 30 minutos a TA en oscuridad. Finalmente, se añadieron 50 µL de solución de parada (ácido sulfúrico 2N) a cada uno de los pocillos con el objetivo de detener la reacción enzimática y se determinó la absorbancia mediante espectrofotometría a 450 nm.

Para la interpretación de los resultados y el cálculo de la concentración sérica de BAFF, se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras con los obtenidos de los calibradores empleados para la recta patrón y se corrigió multiplicando por el factor de dilución aplicado a las muestras.

5.2. ELISA para la determinación de niveles de APRIL en suero

Se empleó el kit de ELISA Human APRIL/TNFSF13 (R&D Systems, Inc.) para la determinación cuantitativa de la concentración de APRIL en las muestras de suero de los pacientes trasplantados renales, así como en los sujetos sanos.

La preparación de los reactivos, incluyendo los estándares para la realización de la correspondiente curva de calibrado (2000-31,3 pg/mL), la solución de lavado, el conjugado, el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección fue llevada a cabo siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

En primer lugar, se añadieron 100 μ L del anticuerpo de captura, previamente diluido, a cada uno de los pocillos, se cubrió la placa con un adhesivo y se incubó "overnight" a TA. A continuación, se aspiró el contenido de cada pocillo y se lavó la placa 3 veces con la correspondiente solución de lavado. Se añadieron 300 μ L de diluyente a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a TA. Finalizada la incubación, se repitieron los 3 ciclos de lavado y se añadieron 100 μ L de los calibradores y muestras por pocillo. Se cubrió la placa con un adhesivo y se incubó durante 2 horas a TA. Tras la incubación, se aspiró el contenido de cada pocillo y se lavó la placa 3 veces con el correspondiente tampón de lavado. A continuación, se añadieron 100 μ L del conjugado de estreptavidina-HRP a cada pocillo de la placa. Se cubrió nuevamente la placa con un adhesivo y se incubó durante 20 minutos a TA en oscuridad. Tras la incubación, se repitieron los ciclos de lavado anteriormente mencionados. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de solución de sustrato (peróxido de hidrógeno + tetrametilbencidina) por pocillo y se incubó durante 20 minutos a TA en oscuridad. Finalmente, se añadieron 50 μ L de solución de parada (ácido sulfúrico 2N) a cada uno de los pocillos con el objetivo de detener la reacción enzimática y se determinó la absorbancia mediante espectrofotometría a 450 nm.

Para la interpretación de los resultados y el cálculo de la concentración sérica de APRIL, se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras con los obtenidos de los calibradores empleados para la curva de calibrado.

6. Tipaje HLA de donantes y receptores de trasplante renal

6.1. Tipaje HLA mediante PCR-SSO

A partir del ADN purificado, el tipaje HLA de los receptores se determinó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con la subsiguiente hibridación del producto amplificado por medio de sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO). Concretamente, los loci amplificados fueron HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1.

6.2. Tipaje mediante PCR-SSP

Partiendo del ADN purificado, el tipaje HLA de los donantes se determinó mediante PCR con la subsiguiente hibridación del producto amplificado por medio de primers específicos de secuencia (PCR-SSP). Los loci amplificados fueron HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1.

7. Detección de anticuerpos anti-HLA y test de C1q mediante

Luminex

La determinación de anticuerpos anti-HLA de clase I y II se llevó a cabo en todos los pacientes incluidos en el estudio prospectivo, en los distintos puntos de control indicados en el apartado 2.1, mediante la tecnología Luminex, técnica de citometría de flujo basada en el uso de microesferas fluorescentes.

En primer lugar, se realizó una técnica de cribado mediante el uso del kit LABScreen Mixed (One Lambda Inc.), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Para ello, se incubaron, en placas de 96 pocillos, 20 μ L del suero de los pacientes con 5 μ L de las microesferas LABScreen Mixed, cada una de las cuales presenta adheridas en su superficie varias moléculas HLA diferentes, durante 30 minutos a TA, en agitación y en oscuridad. A continuación, se procedió a la realización de cuatro ciclos de lavado con la correspondiente solución de lavado previamente diluida. Tras el lavado, se añadieron 100 μ L de anticuerpo anti-IgG conjugado a PE, previamente diluido, a cada uno de los pocillos y se incubó durante 30 minutos a TA, en agitación y en oscuridad. Finalizada la

incubación, se repitieron nuevamente los cuatro ciclos de lavado y la muestra resultante fue adquirida en el Luminex LABScan 100 (One Lambda Inc.). Tras este procedimiento, se pudo establecer un cribado de aquellos pacientes que no presentaban anticuerpos anti-HLA (Figura 14 a).

Posteriormente, se analizaron únicamente los sueros de los pacientes con anticuerpos anti-HLA, es decir, aquellos que mostraron un resultado positivo en el cribado, con el objetivo de poder determinar la especificidad de los anticuerpos anti-HLA mediante el kit LABScreen Single Antigen Class I and II (One Lambda Inc.), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Para ello, se incubaron, en placas de 96 pocillos, 20 μ L del suero de los pacientes con 5 μ L de las microesferas LABScreen Single Antigen clase I y II, cada una de las cuales, a diferencia del ensayo anterior, presenta adherido en su superficie un único antígeno HLA, durante 30 minutos a TA, en agitación y en oscuridad. A continuación, se procedió a la realización de cuatro ciclos de lavado con la correspondiente solución de lavado previamente diluida. Tras el lavado, se añadieron 100 μ L de anticuerpo anti-IgG conjugado a PE, previamente diluido, a cada uno de los pocillos y se incubó durante 30 minutos a TA, en agitación y en oscuridad. Finalizada la incubación, se repitieron nuevamente los cuatro ciclos de lavado y la muestra resultante fue adquirida en el Luminex LABScan 100, pudiendo determinarse de esta manera las especificidades de clase I y II de los distintos anticuerpos anti-HLA (Figura 14 b).

III. Material y Métodos

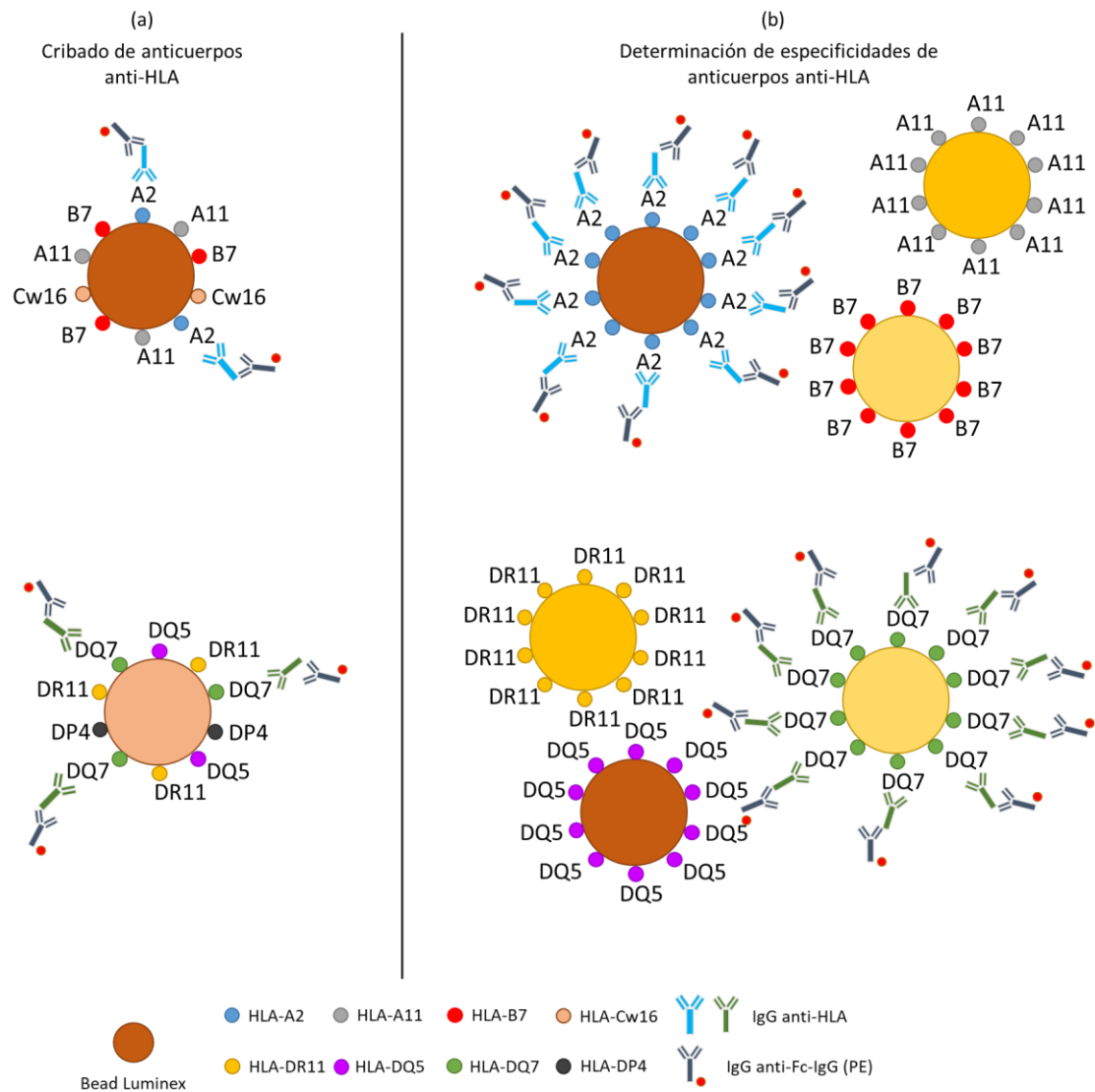


Figura 14. Detección de anticuerpos anti-HLA mediante Luminex. Tecnología Luminex para la detección de anticuerpos anti-HLA mediante cribado (a) y análisis de especificidades (b).

La intensidad media de fluorescencia (MFI) obtenida fue determinada mediante el Luminex LABScan 100 y el análisis de los resultados fue llevado a cabo en el software HLA Fusion (One Lambda Inc.). Se consideraron positivas aquellas especificidades con una MFI superior a 1500 o con un valor superior al 25% de la MFI del control positivo.

Así mismo, la determinación de las especificidades de anticuerpos anti-HLA de clase I fue llevada a cabo en los pacientes hipersensibilizados incluidos en el estudio retrospectivo mediante LABScreen Single Antigen Class I (One Lambda Inc.), siguiendo

las instrucciones recomendadas por el fabricante, anteriormente detalladas. Concretamente, cada uno de los sueros fue analizado sin diluir y tras llevar a cabo una dilución 1/160 del mismo.

Además, se llevó a cabo el test de SAB-C1q (One Lambda Inc.) en dichos suero con el objetivo de detectar los anticuerpos anti-HLA de clase I capaces de activar el sistema del complemento. Para ello, se incubaron, en placas de 96 pocillos, 5 μ L del suero de los pacientes, previamente inactivado térmicamente a 56°C para eliminar cualquier C1q endógeno, con 5 μ L de C1q de complemento humano previamente diluido y con 5 μ L de las microesferas, durante 20 minutos a TA, en agitación y en oscuridad. A continuación, se añadieron 5 μ L de anticuerpo anti-C1q conjugado a PE, previamente diluido, a cada uno de los pocillos y se incubó durante 20 minutos a TA, en agitación y en oscuridad. Finalizada la incubación, se realizó un lavado con PBS y la muestra resultante fue adquirida en el Luminex LABScan 100, pudiendo determinarse de esta manera las especificidades de los anticuerpos anti-HLA de clase I con capacidad activadora del complemento.

En las tres condiciones mencionadas (suero neto, suero diluido 1/160 y C1q) se consideraron resultados positivos aquellas especificidades de anticuerpos anti-HLA con valores de superiores a 3000 MFI.

8. Estudio de *eplets*

La determinación de disparidades de *eplets* verificados por anticuerpos entre los tipajes HLA de donante y receptor fue determinada mediante el software HLAMatchmaker 2.1 (<https://www.epitopes.net/downloads.html>), para lo cual fue necesario conocer previamente el tipaje HLA de alta resolución. En el caso de existir ambigüedades en el tipaje HLA, los haplotipos más frecuentes fueron asignados en función de la base de datos Haplostats (<https://www.haplostats.org>).

9. Prueba cruzada

9.1. Prueba cruzada mediante citotoxicidad dependiente de complemento

Para esta técnica, los PBMCs de los donantes, previamente aislados mediante gradiente de Ficoll, se resuspendieron en PBS hasta alcanzar una concentración de 2×10^6 células/mL y se dispensó 1 μ L de los mismos en cada uno de los pocillos de las placas Terasaki parafinadas. A continuación, se dispensó 1 μ L del suero de los pacientes sin diluir, así como tras una dilución $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ y se incubó durante 30 minutos a TA. Cada una de las condiciones fue testada por duplicado. Finalizada la incubación, se añadieron 5 μ L de complemento de conejo (One Lambda Inc.) y se incubó durante 1 hora a TA. Por último, se dispensaron 5 μ L de eosina 5% y 5 μ L de formol en cada uno de los pocillos. El resultado fue evaluado mediante un microscopio de óptico invertido (Figura 15).

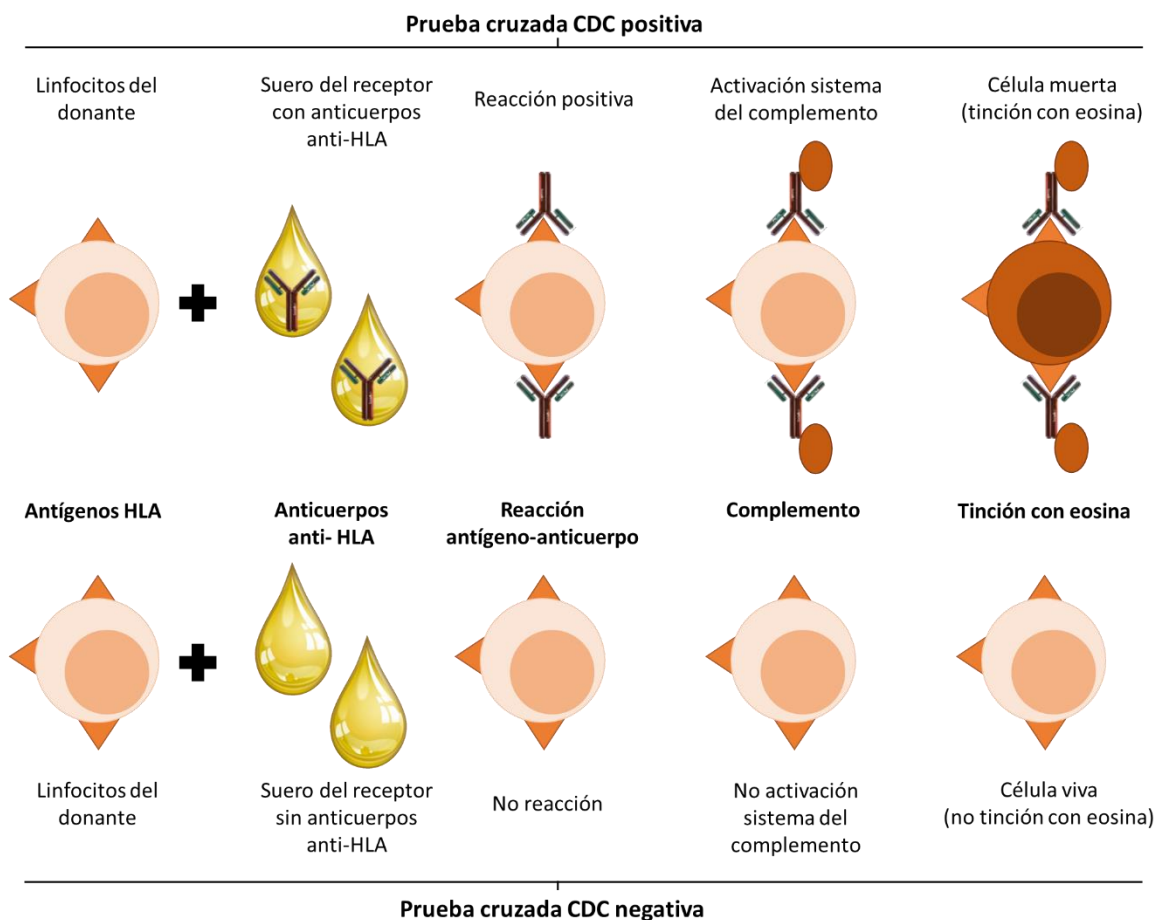


Figura 15. Prueba cruzada mediante citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En la parte superior se muestra el resultado de una prueba cruzada positiva y en la inferior el de una negativa.

9.2. Prueba cruzada mediante citometría de flujo

Para esta técnica, en primer lugar los PBMCs de los donantes, nuevamente aislados mediante gradiente de Ficoll, se incubaron con pronasa (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos a 37°C con el objetivo de eliminar los receptores para la región cristalizable de las Igs (Fc) capaces de unir IgG de manera inespecífica presentes en la superficie de los linfocitos y evitar resultados falsos positivos. A continuación, se añadieron sobre esta mezcla de PBMCs y pronasa, los sueros (neto y tras dilución 1/160) de los receptores y se incubaron durante 30 minutos a TA. Finalizada la incubación, se llevó a cabo un lavado con 2 mL de PBS y se añadieron los correspondientes anticuerpos monoclonales (Tabla 5). Tras dicho marcaje, se realizó una incubación de 30 minutos, a TA y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al lavado de las muestras para lo cual se añadieron 2 mL de PBS con el objetivo de eliminar el exceso de anticuerpo monoclonal y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Finalizada la centrifugación, el sobrenadante se eliminó mediante decantación y el pellet celular resultante se resuspendió en 250 µL para su adquisición en el citómetro de flujo FACS-Canto II (BD Biosciences). El análisis de los resultados de citometría de flujo se llevó a cabo en el programa de análisis FACSDiva (BD Biosciences), considerándose resultados positivos para antígenos HLA de clase I cuando el ratio MFI suero / MFI control negativo en la región de linfocitos CD3⁺ fue superior a 1,5; y para antígenos HLA de clase II cuando el ratio en la región de linfocitos CD19⁺ fue superior a 2 (Figura 16).

Tabla 5. Panel de anticuerpos monoclonales empleado en la prueba cruzada mediante citometría de flujo.

Fluorocromo	Anticuerpo	Clon	Casa comercial
Pacific Blue	CD3	UCHT-1	Immunostep
APC	CD19	SJ25C1	BD Biosciences
FITC	Fab'-IgG		Dako

APC: Alociocianina; FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

III. Material y Métodos

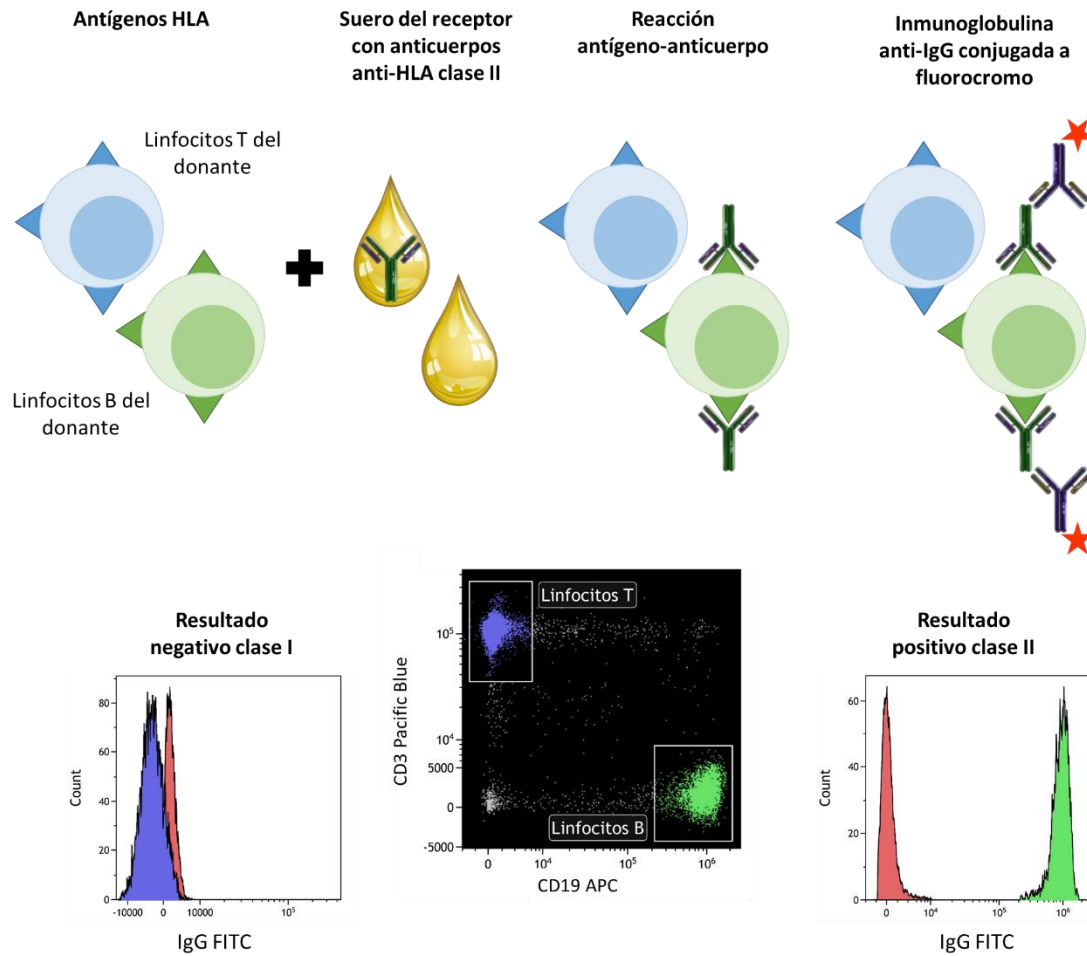


Figura 16. Prueba cruzada mediante citometría de flujo. Se muestra un ejemplo en el que el paciente tiene anticuerpos anti-HLA de clase II, lo cual da lugar a una prueba cruzada negativa para antígenos de clase I y positiva para antígenos de clase II, observándose un aumento de la intensidad media fluorescencia de IgG-FITC (isotiocianato de fluoresceína) en linfocitos B (verde) respecto al control negativo representado en rojo. Por el contrario, no se observa dicho aumento en linfocitos T (azul).

10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante los programas SPSS v.22 (IBM Corp., Armonk, NY, EEUU) y Graph Pad Prism v.6 (San Diego, CA). La distribución de las variables continuas se determinó empleando los test de Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk. Los resultados fueron expresados como media y desviación estándar (SD) o mediana y rango intercuartil (IQR) para las variables continuas y como número de casos y porcentaje en el caso de variables categóricas. Para las comparaciones de las variables categóricas se empleó el test de Chi cuadrado, mientras

que en el caso de variables continuas no paramétricas se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Las comparaciones intra-grupos de variables cuantitativas se llevaron a cabo mediante el test de Wilcoxon. El coeficiente de correlación de Spearman fue empleado para cuantificar el grado de asociación entre variables continuas. El estudio mediante curvas ROC (receiver operating characteristic), así como el índice de Youden se utilizaron para el establecimiento de los puntos de corte con mayor sensibilidad y especificidad. La supervivencia libre de rechazo fue determinada mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Se emplearon análisis de regresión de Cox y análisis de regresión multivariante para establecer el papel independiente de las variables objeto de estudio en el desarrollo de AbMR. Así mismo, se estudió la colinealidad de las variables incluidas en dichos análisis multivariantes. Valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. En las figuras * indica $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.



IV. RESULTADOS



1. Bloque I: Estudio Prospectivo

1.1. Características de la cohorte

Para el estudio de los niveles de BAFF y APRIL en suero y de las subpoblaciones de linfocitos B y T en sangre como biomarcadores en trasplante renal se incluyeron 109 pacientes sometidos a un trasplante de riñón, los cuales se monitorizaron de manera prospectiva durante dos años. En la tabla 6 se muestran las principales características demográficas, clínicas e inmunológicas de la cohorte objeto de estudio.

En función de las características tanto de los receptores como de los donantes se valoró en cada caso el uso de terapia de inducción, la cual se administró en el 71,6% de los pacientes. Se utilizó timoglobulina como agente de inducción en el caso de donantes de muerte cefálica, donación en asistolia tipo II (no controlada), así como en el caso de receptores de alto riesgo inmunológico (presencia de anticuerpos anti-HLA preformados). El uso de inducción con basiliximab se limitó a la donación en asistolia tipo III (controlada), así como en el caso de donantes con criterios expandidos.

Todos los pacientes recibieron tras el trasplante triple terapia inmunosupresora de mantenimiento consistente en tacrolimus, micofenolato de mofetilo (MMF) y prednisona. 11 pacientes (10,1%) desarrollaron un evento de AbMR durante el primer año tras el trasplante confirmado mediante biopsia. En la tabla 7 se muestran los principales parámetros demográficos clínicos e inmunológicos de los pacientes que sufrieron AbMR clínico frente a los del grupo de pacientes sin rechazo.

Con respecto a la inmunosupresión de los pacientes a los 12 meses tras el trasplante, todos ellos continuaban con prednisona, 108 con tacrolimus, 100 con MMF y 10 pacientes fueron convertidos a mTOR.

Tabla 6. Características demográficas, clínicas e inmunológicas de los pacientes sometidos a trasplante de riñón.

	Pacientes trasplantados renales (n = 109)			
	n	Media / Mediana	SD / IQR	%
Edad receptor (años)		55	43-62	
Sexo receptor (% mujeres)	46			42,2
Causa enfermedad renal terminal				
Glomerular	37			33,9
Nefropatía diabética	28			25,7
Poliquistosis renal	16			14,7
Intersticial	9			8,3
Vascular	8			7,3
No filiada	7			6,4
Otras causas	4			3,7
Hipertensión receptor	95			87,2
Diabetes mellitus receptor	42			38,5
Tipo de tratamiento renal sustitutivo				
Hemodiálisis	72			66,1
Diálisis peritoneal	16			14,7
Prediálisis	11			10,1
Trasplante	10			9,2
Días en tratamiento renal sustitutivo				
Hemodiálisis		396	216,25-975	
Diálisis peritoneal		463,5	226-859	
Prediálisis		0		
Trasplante		3998	2513-7007	
Número de trasplante				
1	86			78,9
2	19			17,4
3	4			3,7
Retrasplante	23			21,1
Hipersensibilizados (cPRA >90%)	7			6,4
Anticuerpos anti-HLA				
PreTx	33			30,3
6 meses	43			39,4
12 meses	43			39,4
24 meses	45			41,3
DSA				
PreTx	3			9,1
6 meses	12			27,9

12 meses	15			34,9
24 meses	14			31,1
Edad donante (años)		52	44-62	
Sexo donante (% hombres)	59			54,1
Tipo de donante				
ACVA	49			45
Asistolia	30			27,5
Anoxia	8			7,3
TCE	14			12,8
Vivo	6			5,5
Otro	2			1,8
Hipertensión donante	28			26,9
Diabetes mellitus donante	10			9,5
Tipo de trasplante				
Riñón	98			89,9
Páncreas-Riñón	11			10,1
Función retrasada del injerto	26			23,9
Número de sesiones de diálisis al alta		3	2-5	
Tiempo de isquemia fría (horas)		17	9-21	
Serología CMV receptor (% positivo)	94			86,2
Serología CMV donante (% positivo)	81			74,3
Terapia de inducción:	78			71,6
Timoglobulina	53			67,9
Basiliximab	25			32,1
Rechazo clínico	22			20,2
AbMR clínico	11			10,1
Tiempo desarrollo AbMR (días)		24	19,5-79,5	
Biopsia indicación C4d+	13			59,1
Biopsia indicación g+ptc \geq 2	18			81,8
Biopsia protocolo	70			64,2
Rechazo subclínico	20			28,6
AbMR subclínico	9			12,9
Biopsia protocolo C4d+	20			28,6
Biopsia protocolo g+ ptc \geq 2	12			17,1
Incompatibilidades HLA				
HLA-A		1,21	0,63	
HLA-B		1,50	0,62	
HLA-C		1,37	0,62	
HLA-DRB1		1,32	0,67	
HLA-DQB1		1,04	0,67	

IV. Resultados

Eplets HLA verificados por anticuerpos				
HLA-A		5	2-8	
HLA-B		3	2-5	
HLA-C		3	1-4	
HLA-DRB1		5	2-5	
HLA-DQA1		1	0-2	
HLA-DQB1		1	1-1	

SD: desviación estándar; IQR: rango intercuartílico; cPRA: panel reactivo de anticuerpos calculado; PreTx: pretrasplante; DSA: anticuerpos donante específicos; ACVA: accidente cerebrovascular agudo; TCE: traumatismo craneoencefálico; CMV: citomegalovirus; AbMR: rechazo mediado por anticuerpos; g+ptc: glomerulitis + capilaritis peritubular

Tabla 7. Parámetros demográficos, clínicos e inmunológicos de los pacientes con rechazo clínico mediado por anticuerpos (AbMR; n = 11) respecto a los pacientes sin rechazo (n = 87).

	No rechazo (n = 87)	AbMR (n = 11)	p
Edad receptor (años)	56 (43-63)	51 (44-63)	0,875
Sexo receptor (% mujeres)	35 (40,2%)	6 (54,5%)	0,364
Causa enfermedad renal terminal			
Glomerular	30 (34,5%)	3 (27,3%)	0,634
Nefropatía diabética	19 (21,8%)	3 (27,3%)	0,684
Poliquistosis renal	15 (17,2%)	1 (9,1%)	0,491
Intersticial	6 (6,9%)	2 (18,2%)	0,198
Vascular	6 (6,9%)	2 (18,2%)	0,198
No filiada	7 (8,0%)	0	
Otras causas	4 (4,6%)	0	
Retrasplante	17 (19,5%)	3 (27,3%)	0,549
Hipersensibilizados (cPRA >90%)	4 (4,6%)	3 (27,3%)	0,006
Anticuerpos anti-HLA PreTx	27 (31%)	5 (45,5%)	0,337
Edad donante (años)	53 (44-62)	55 (48-64)	0,408
Función retrasada el injerto	16 (18,4%)	7 (63,6%)	0,001
Tiempo de isquemia fría (horas)	16 (9-21)	21 (21-23)	0,012
Terapia de inducción:			
Timoglobulina	41 (47,1%)	5 (45,5%)	0,917
Basiliximab	19 (21,8%)	5 (45,5%)	0,086
Biopsia indicación C4d+	0	10 (90,9%)	
Biopsia indicación g+ptc ≥ 2	0	10 (90,9%)	
Incompatibilidades HLA			
HLA-A	1,18 (0,64)	1,18 (0,60)	0,959
HLA-B	1,52 (0,63)	1,36 (0,67)	0,418

HLA-C	1,37 (0,61)	1,36 (0,67)	0,980
HLA-DRB1	1,30 (0,68)	1,36 (0,67)	0,786
HLA-DQB1	1,05 (0,65)	1,00 (0,89)	0,861

cPRA: panel reactivo de anticuerpos calculado; PreTx: pretrasplante

1.2. Estudio de biomarcadores pretrasplante

1.2.1. Análisis de los niveles séricos de BAFF y APRIL pretrasplante en pacientes trasplantados renales

Se analizaron los niveles de BAFF presentes en suero en 109 pacientes trasplantados renales en el momento previo al trasplante, así como en 40 sujetos sanos con el objetivo de conocer los niveles basales de dicha citocina en los grupos estudiados. Los resultados mostraron que los pacientes sometidos a un trasplante de riñón poseen niveles basales de BAFF más elevados (604,63; IQR 465,18-845,42 pg/mL) que los controles sanos (549,88; IQR 495,43-622,97 pg/mL). Sin embargo las diferencias estadísticas no fueron significativas.

Por ello, se decidió estratificar a los pacientes trasplantados renales en función de la presencia o no de rechazo clínico durante los primeros 12 meses tras el trasplante y fue entonces cuando se observó que los pacientes que sufrieron rechazo mediado por anticuerpos (AbMR) presentaron niveles de BAFF pretrasplante significativamente mayores (853,29; IQR 765,37-1545,99 pg/mL) que los pacientes trasplantados que no desarrollaron rechazo del injerto (594,60; IQR 453,21-803,93 pg/mL) y que los controles sanos, $p = 0,003$ y $p < 0,001$, respectivamente (Figura 17 a, b).

El análisis de los niveles de APRIL en suero no mostró diferencias significativas entre los sujetos sanos y los pacientes trasplantados renales, independientemente de la estratificación o no de éstos en función del desarrollo de rechazo clínico durante los primeros 12 meses postTx (datos no mostrados).

IV. Resultados

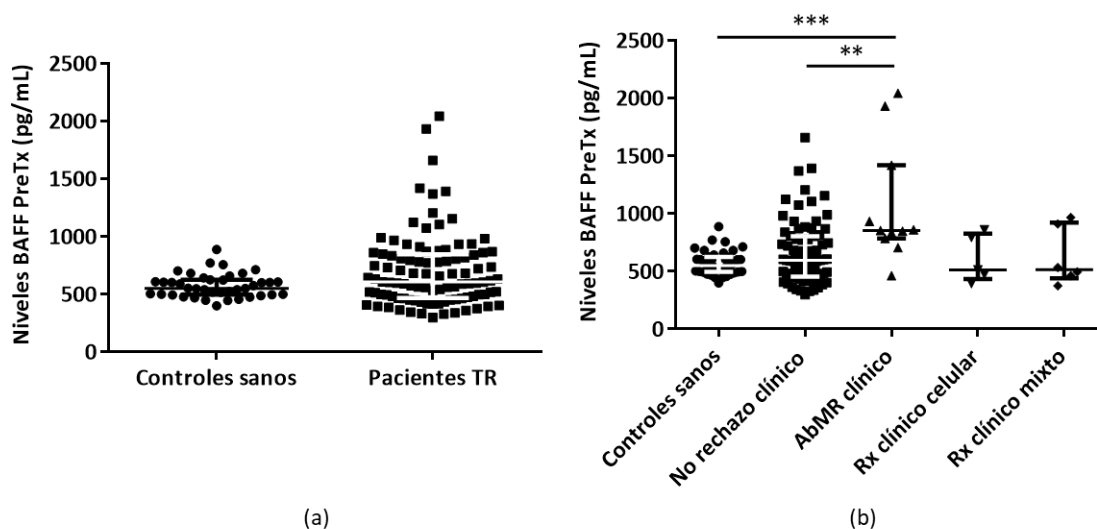


Figura 17. Distribución de los niveles séricos de BAFF pretrasplante. a) No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de BAFF pretrasplante entre los pacientes trasplantados renales (TR; $n = 109$) y los controles sanos ($n = 40$). b) Aumento significativo de los niveles séricos de BAFF pretrasplante en los pacientes TR que sufrieron un rechazo mediado por anticuerpos (AbMR) en los primeros 12 meses tras el trasplante ($n = 11$) en comparación con los controles sanos y los sujetos que no desarrollaron rechazo clínico ($n = 87$). No se encontraron diferencias significativas en el grupo de pacientes que desarrolló rechazo (Rx) clínico celular ($n = 5$) ni rechazo clínico mixto ($n = 6$). ** Indica $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Además, se observaron niveles significativamente más elevados de BAFF pretrasplante en aquellos pacientes que presentaban anticuerpos anti-HLA pretrasplante (836,22; IQR 594,11-1140,75 pg/mL vs. 586,25; IQR 448,23-778,01 pg/mL), así como DSA (1153,09; IQR 914,34-1402,35 pg/mL vs. 601,64; IQR 462,72-833,26 pg/mL), $p = 0,001$ y $p = 0,049$, respectivamente. Así mismo, se encontró una asociación entre los niveles de BAFF y el panel reactivo de anticuerpos calculado (cPRA) pretrasplante ($r = 0,355$, $p < 0,001$) y se observó que los pacientes que desarrollaron anticuerpos anti-HLA a los 6 meses post-trasplante presentaban niveles de BAFF pretrasplante significativamente más elevados ($p = 0,001$).

El análisis de curva ROC de los niveles de BAFF pretrasplante como biomarcador predictor de AbMR durante los primeros 12 meses tras el trasplante renal mostró un área bajo la curva (AUC) de 0,784 (IC95% 0,644-0,925). En base a este análisis y aplicando el índice de Youden se estableció que el punto de corte óptimo para distinguir a los pacientes con niveles elevados de BAFF pretrasplante fue de 782,03 pg/mL, con una

sensibilidad del 80% y una especificidad del 73%. Considerando este punto de corte, los pacientes trasplantados renales con niveles de BAFF pretrasplante superiores a 782,03 pg/mL mostraron menor supervivencia libre de AbMR (*log-rank* $p < 0,001$) (Figura 18 a, b).

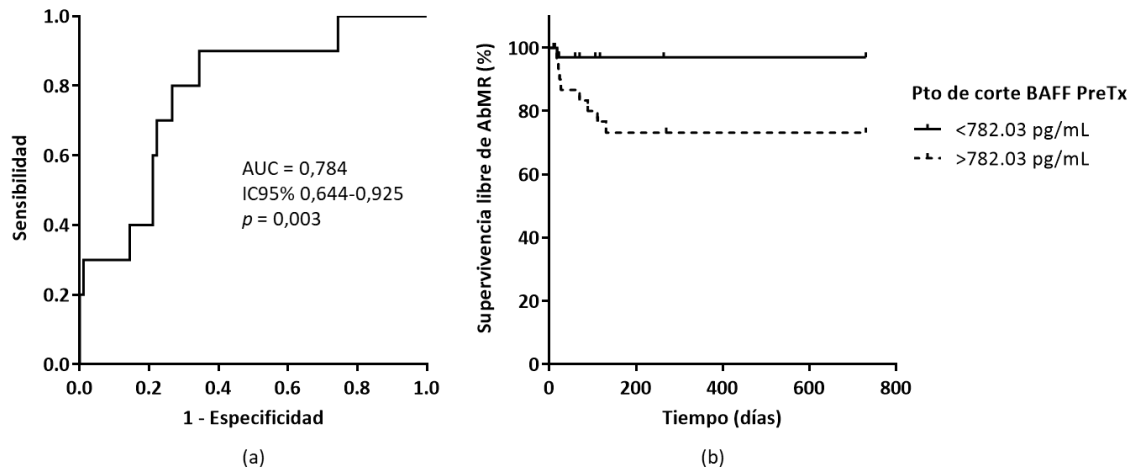


Figura 18. Análisis de curva ROC y de supervivencia libre de AbMR en función de los niveles de BAFF pretrasplante. a) Análisis de curva ROC de los niveles de BAFF previos al trasplante renal y desarrollo de rechazo mediado por anticuerpos (AbMR) durante los primeros 12 meses tras el trasplante con un área bajo la curva (AUC) de 78,4%. En base al índice de Youden, un punto de corte de 782,03 pg/mL en los niveles de BAFF pretrasplante permite discriminar entre los pacientes que desarrollan AbMR y aquellos que no sufren rechazo a lo largo del primer año post-trasplante con una sensibilidad y especificidad de 80% y 73,3%, respectivamente. b) Supervivencia libre de AbMR entre pacientes con niveles de BAFF superiores e inferiores a 782,03 pg/mL.

Existen diferentes factores de riesgo involucrados en el desarrollo de AbMR, entre los que destacan la edad del donante, el grado de sensibilización HLA, la existencia de retrasplantes, la función retrasada del injerto (DGF), el tiempo de isquemia fría (CIT) o el número de incompatibilidades HLA, entre otros, los cuales fueron evaluados en nuestra cohorte de pacientes (Tabla 7). Con el objetivo de establecer el impacto que puede tener la determinación de los niveles de BAFF en el desarrollo de AbMR, se llevó a cabo el análisis de regresión de Cox el cual confirmó un papel significativo e independiente de los niveles séricos de BAFF pretrasplante en el desarrollo de AbMR durante los primeros 12 meses tras el trasplante renal, *hazard ratio* (HR) 1,002; IC95% 1,001-1,003, $p = 0,008$. Las covariables incluidas en el análisis fueron la edad del donante, la presencia de anticuerpos anti-HLA pretrasplante, DSA pretrasplante, el

IV. Resultados

número de trasplantes previos, el número total de incompatibilidades HLA (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1), el uso de terapias de inducción, el CIT, así como la DGF. De esta manera, se puso de manifiesto que niveles elevados de BAFF pretrasplante constituyen un factor de riesgo para el desarrollo del evento, independientemente de las variables clásicas anteriormente citadas. Concretamente, un incremento de 100 pg/mL de los niveles de BAFF supone 1,35 veces más riesgo de desarrollar AbMR durante el primer año post-trasplante.

Este incremento puede no parecer muy cuantioso, sin embargo, cuando el análisis de Cox se llevó a cabo tras la estratificación de los pacientes de acuerdo al punto de corte anteriormente expuesto (782,03 pg/mL), los niveles pretrasplante de BAFF se confirmaron como una variable independiente para el desarrollo de AbMR clínico (HR 6,945; IC95% 1,415-34,082, $p = 0,017$), lo cual indica que pacientes con niveles de BAFF pretrasplante superiores al punto de corte presentan alrededor de siete veces más riesgo de desarrollar AbMR durante los 12 primeros meses después del trasplante renal.

Cuando el papel de los niveles de BAFF pretrasplante en el desarrollo de AbMR clínico se estudió mediante análisis de regresión multivariante se obtuvieron resultados similares: HR 1,003; IC95% 1,001-1,005, $p = 0,004$.

1.2.2. Análisis de la distribución de subpoblaciones de linfocitos B pretrasplante en pacientes con AbMR clínico

En primer lugar, se analizó el fenotipo del repertorio de subpoblaciones de linfocitos B presente en los receptores de trasplante renal en el momento previo al trasplante en comparación con los sujetos sanos. Tal y como se muestra en otras publicaciones, los pacientes trasplantados renales mostraron una disminución del número de linfocitos B circulantes pretrasplante (100,5; IQR 59-194 cél/ μ L), tanto en términos de números absolutos de células como en porcentaje, respecto al grupo de controles sanos (218; IQR 127,5-275,5 cél/ μ L), $p < 0,001$. Sin embargo, el número absoluto de linfocitos B sanguíneos pretrasplante de los receptores que desarrollaron AbMR clínico (94; IQR 51-249 cél/ μ L) era similar al de pacientes trasplantados clínicamente estables (102; IQR 59-192 cél/ μ L) (Figura 19 a, b). Como consecuencia de ello, el resto de comparativas que se

realizaron en el presente trabajo respecto a subpoblaciones de linfocitos B se llevaron a cabo teniendo en cuenta el número absoluto de células objeto de estudio. No obstante, también se analizaron las frecuencias de las diferentes poblaciones celulares, las cuales se muestran en la Tabla Anexo 1.

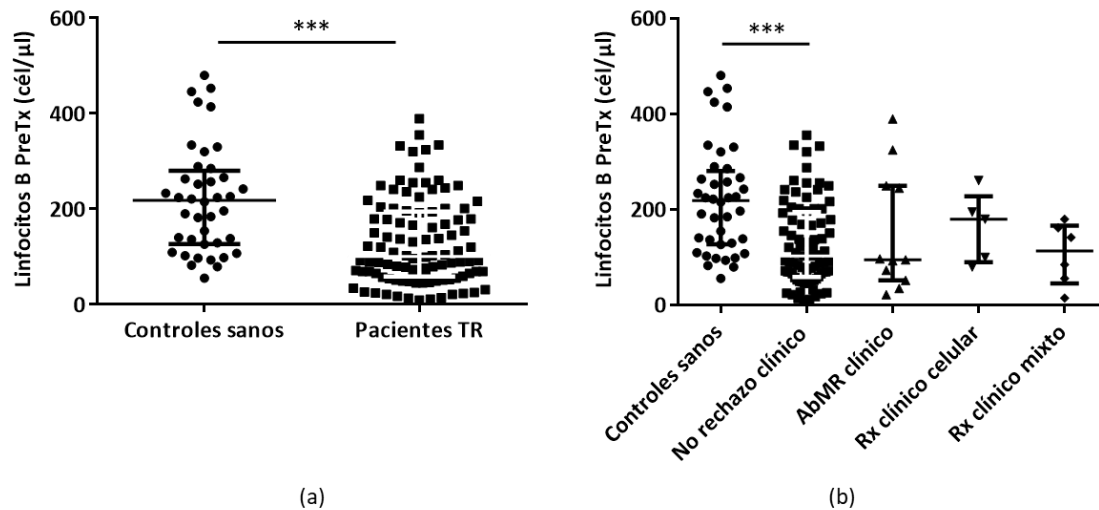


Figura 19. Distribución de los niveles de linfocitos B pretrasplante. a) Número absoluto de linfocitos B pretrasplante en controles sanos ($n = 40$) y en pacientes trasplantados renales (TR; $n = 109$). b) Número absoluto de linfocitos B pretrasplante en pacientes trasplantados renales clínicamente estables ($n = 87$), pacientes con rechazo clínico [rechazo mediado por anticuerpos (AbMR; $n = 11$), rechazo celular ($n = 5$), rechazo mixto ($n = 6$)], así como en sujetos sanos. *** Indica $p < 0,001$.

Analizando los diferentes estadios celulares en el proceso de desarrollo de los linfocitos B, se observó que pacientes que presentaron AbMR clínico poseían una reducción del número absoluto de células B transicionales tipo 2 (T2) pretrasplante, las cuales se caracterizan por la expresión de $CD5^{low/-}$, en comparación con los pacientes trasplantados renales clínicamente estables (0,52; IQR 0,11-1,51 $cél/\mu L$ vs. 1,35; IQR 0,51-2,88 $cél/\mu L$), $p = 0,039$ y los sujetos sanos (8; IQR 4,78-14,75 $cél/\mu L$), $p < 0,001$ (Figura 20).

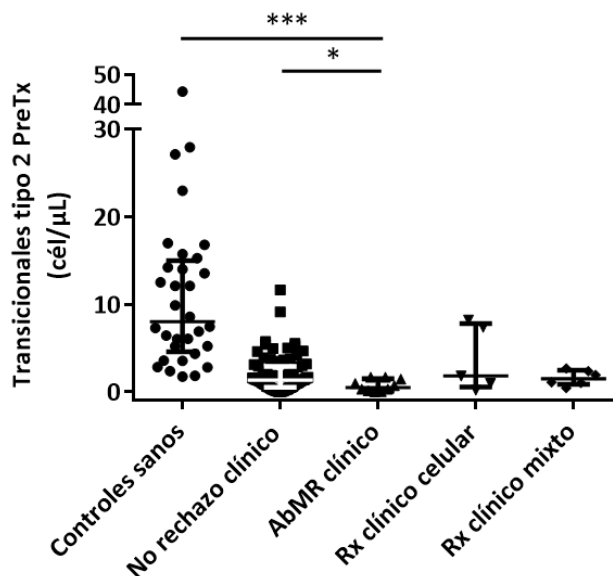


Figura 20. Distribución de los niveles de células B transicionales tipo 2 pretrasplante. Reducción del número absoluto de células transicionales tipo 2 en pacientes con rechazo mediado por anticuerpos (AbMR; $n = 11$) en el primer año post-trasplante en comparación con el grupo de pacientes trasplantados que no sufren rechazo (Rx) ($n = 87$) y el grupo de controles sanos ($n = 40$). * Indica $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

Además de la disminución de este tipo celular con un fenotipo regulador, los pacientes que desarrollaron AbMR poseían en el estudio pretrasplante una distribución anormal de otras subpoblaciones de linfocitos B, tales como las células B naïve ($CD19^+ IgD^+ CD27^-$) y las células B memoria con cambio de isotipo ($CD19^+ IgD^- CD27^+$). Concretamente, estos pacientes presentaron una reducción significativa de los niveles de células B naïve (33,65; IQR 22,60-61,31 $cél/\mu L$) respecto a los pacientes trasplantados renales que no experimentaron ningún evento de rechazo (59,61; IQR 32,39-97,07 $cél/\mu L$) y al grupo de sujetos sanos (128,54; IQR 71,13-172,53 $cél/\mu L$), $p = 0,04$ y $p < 0,001$, respectivamente. Por el contrario, el número absoluto de células B memoria con cambio de isotipo se encontró aumentado en el momento pretrasplante en los pacientes que sufrieron AbMR durante los 12 primeros meses tras el trasplante (41,93; IQR 31,03-52,53 $cél/\mu L$), en comparación con los pacientes trasplantados clínicamente estables (20,39; IQR 8,28-32,87 $cél/\mu L$) y con el grupo de controles sanos (30,42; IQR 20,18-45,38 $cél/\mu L$), $p = 0,001$ y $p = 0,11$, respectivamente. (Figura 21 a, b). Considerando el ratio entre las células B naïve y memoria (con cambio de isotipo + sin cambio de isotipo), este ratio se encontró

disminuido en los pacientes con AbMR clínico frente a los pacientes estables y los voluntarios sanos, $p < 0,001$ en ambos casos (Figura 21 c).

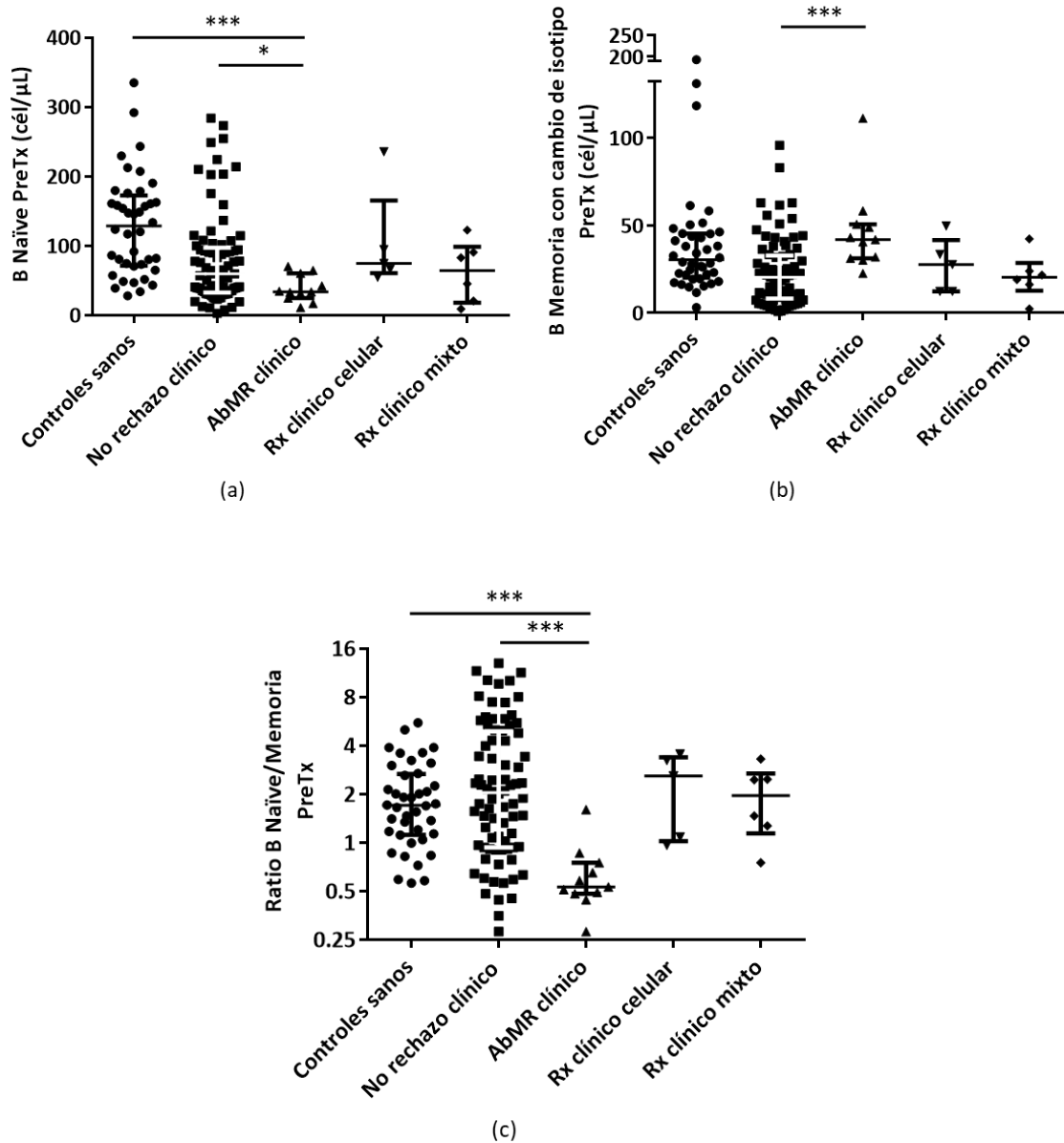


Figura 21. Distribución anormal de células B naïve y memoria. a) Reducción significativa del número absoluto de células B naïve pretrasplante en pacientes con rechazo mediado por anticuerpos (AbMR; $n = 11$). b) Aumento del número de células B memoria con cambio de isotipo pretrasplante en pacientes trasplantados renales que sufren AbMR en el primer año tras el trasplante. c) Reducción del ratio entre las células B naïve y memoria pretrasplante en pacientes con AbMR clínico frente al grupo de sujetos trasplantados clínicamente estables ($n = 87$) y sujetos sanos ($n = 40$). * Indica $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

Se obtuvieron resultados similares cuando se analizó el compartimento de células B de acuerdo a la clasificación Bm1-Bm5 con el objetivo de identificar los distintos estadios

IV. Resultados

celulares en la ontogenia de las células B desde los linfocitos B naïve hasta las células B memoria (157) (Figura 22).

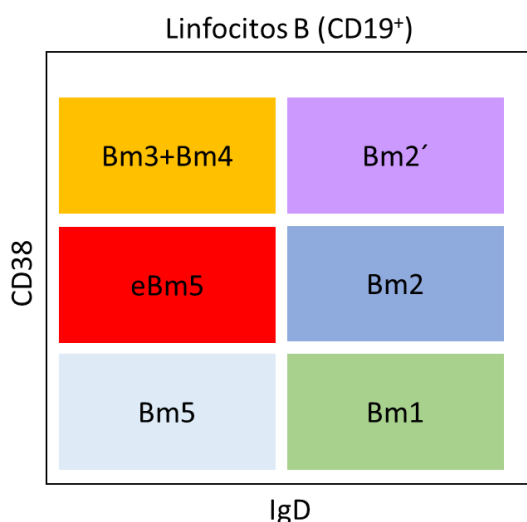


Figura 22. Clasificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B de acuerdo a los marcadores IgD y CD38.

Atendiendo a esta clasificación, las subpoblaciones Bm2 y Bm2' corresponden a células B activadas, mientras que las subpoblaciones Bm5 y eBm5 incluyen células B memoria. Al igual que observamos anteriormente, los pacientes con AbMR clínico presentaron niveles más bajos de células B activadas (Bm2 + Bm2') pretrasplante (36,07; IQR 16,66-69,21 cél/ μ L) que los pacientes sin rechazo clínico (61,32; IQR 36,96-92,81 cél/ μ L) y los sujetos sanos (105,21; IQR 60,42-161,93 cél/ μ L), $p = 0,045$ y $p = 0,001$, respectivamente. Por el contrario, dichos pacientes mostraron un mayor número de células B con un fenotipo memoria (Bm5 + eBm5) en comparación con el grupo de pacientes trasplantados sin presencia de rechazo, $p = 0,05$ y los sujetos sanos. Al establecer el ratio de células activadas frente a memoria, $(Bm2 + Bm2')/(Bm5 + eBm5)$, éste se encontró disminuido en el grupo de pacientes que desarrollaron AbMR durante el primer año tras el trasplante (1,12; IQR 0,61-1,46 cél/ μ L) respecto a los pacientes trasplantados clínicamente estables (2,80; IQR 1,80-4,96 cél/ μ L) y controles sanos (2,47; IQR 1,60-3,61 cél/ μ L), $p < 0,001$ en ambas comparaciones (Figura 23).

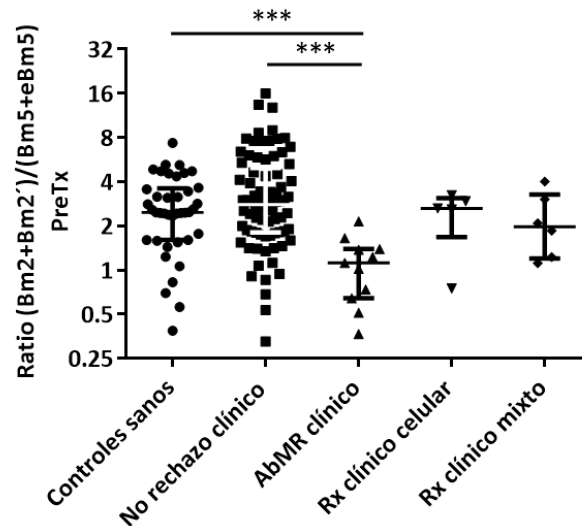


Figura 23. Distribución del ratio de células $(Bm2+Bm2')/(Bm5+eBm5)$ pretrasplante. Predominio de subpoblaciones de B con fenotipo memoria ($Bm5 + eBm5$) pretrasplante en pacientes con rechazo clínico mediado por anticuerpos (AbMR; $n = 11$) en comparación con el grupo de pacientes trasplantados que no sufren rechazo ($n = 87$) y los sujetos sanos ($n = 40$). *** Indica $p < 0,001$.

Con el objetivo de evaluar el papel independiente de los niveles pretrasplante de BAFF así como de determinadas subpoblaciones de linfocitos B, que mostraron resultados significativos en el análisis univariante cuando fueron comparadas entre pacientes con AbMR clínico y el grupo de pacientes clínicamente estable, en el desarrollo de AbMR durante los 12 primeros meses tras el trasplante renal, se llevó a cabo un análisis de regresión multivariante incluyendo en él las variables clásicamente implicadas en este proceso, tales como la presencia de anticuerpos anti-HLA pretrasplante, DSA pretrasplante, número de trasplantes previos, número total de incompatibilidades HLA (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1), el uso de terapias de inducción, CIT, así como DGF. Los resultados obtenidos mostraron que tanto los niveles de BAFF pretrasplante (HR 1,006, IC95% 1,001-1,011, $p = 0,014$), como los números absolutos pretrasplante de células B memoria con cambio de isotipo (HR 1,050, IC95% 1,002-1,105, $p = 0,065$) y el ratio de células B naïve/memoria (HR 0,03, IC95% 0,001-0,706, $p = 0,03$) se asocian al desarrollo de AbMR clínico, independientemente de las variables clásicas. Por consiguiente, cuanto mayores sean los niveles pretrasplante de BAFF, así como el número absoluto de células B memoria con cambio de isotipo, mayor es el riesgo de desarrollar AbMR durante el primer año post-trasplante. Por el contrario, un incremento del ratio de células B

naïve/memoria tiene un efecto protector frente al desarrollo de AbMR clínico. Se descartó la colinealidad entre el número de células B memoria con cambio de isotipo y el ratio de células B naïve/memoria ($p = 0,775$), por lo que ambas variables pudieron ser incluidas en el análisis estadístico.

1.2.3. Análisis de la distribución de subpoblaciones de linfocitos T pretrasplante en pacientes con AbMR clínico

El compartimento de células T también fue objeto de estudio debido a la cooperación existente entre las células B y T, ya que las respuestas llevadas a cabo por los linfocitos T se ven influenciadas por la actividad de los linfocitos B mediante las señales coestimuladoras y la secreción de citocinas. Así mismo, es importante destacar el papel de los linfocitos T foliculares cooperadores (Tfh) en la activación de los linfocitos B, ya que su interacción es necesaria para la generación de la respuesta inmunitaria, induciendo que los linfocitos B se diferencien a células productoras de anticuerpos.

Cuando las diferentes subpoblaciones de linfocitos T (naïve, memoria central, memoria efectora y TEMRA) pretrasplante fueron comparadas, se observó que los pacientes que sufrieron AbMR durante el primer año post-trasplante presentaban una depleción de células T CD4⁺ naïve (29,99; IQR 15,49-38,78%) con respecto a los pacientes sin rechazo (42,47; IQR 23,46-59,70%) y a los controles sanos (58,32; IQR 39,66-66,58%), $p = 0,038$ y $p < 0,001$, respectivamente. Por el contrario, se observaron niveles aumentados de células T CD4⁺ TEMRA en dichos pacientes (12,90; IQR 4,71-17,95%) en comparación con los pacientes trasplantados clínicamente estables (3,29; IQR 1,40-7,78%) y los sujetos sanos (0,50; IQR 0,26-1,11%), $p = 0,003$ y $p < 0,001$, respectivamente.

Se encontraron resultados similares al analizar las subpoblaciones de células T CD8⁺ pretrasplante, ya que los pacientes que sufrieron AbMR clínico poseían una disminución de las células T CD8⁺ naïve, así como un predominio de células T CD8⁺ TEMRA.

Considerando esta distribución de las subpoblaciones de células T en los pacientes con AbMR clínico, se observó una polarización hacia un estado de células preactivadas en este grupo de sujetos, puesto que el ratio entre subpoblaciones T naïve/TEMRA estaba significativamente disminuido en aquellos pacientes con AbMR con respecto al grupo

de pacientes trasplantados clínicamente estables y a los controles sanos, tanto en células T CD4⁺, $p = 0,002$ y $p < 0,001$, respectivamente, como en células T CD8⁺, $p = 0,006$ y $p < 0,001$, respectivamente (Figura 24 a, b).

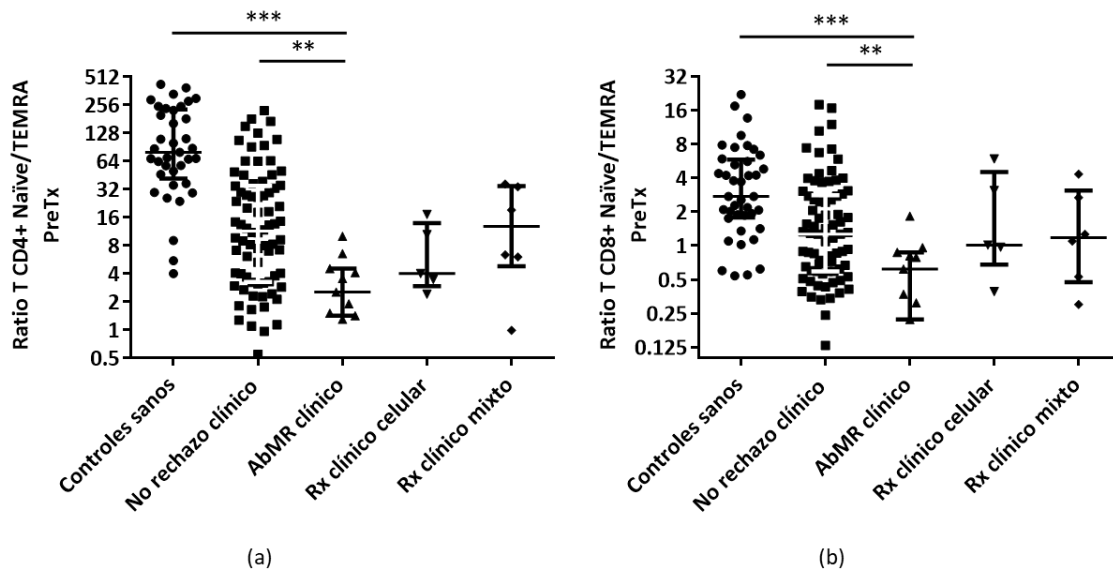


Figura 24. Distribución del ratio de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ naïve/TEMRA pretrasplante. Predominio de un estado preactivado en pacientes con rechazo clínico mediado por anticuerpos (AbMR; $n = 11$) en comparación con el grupo de pacientes sin rechazo clínico ($n = 87$) y los controles sanos ($n = 40$), el cual se refleja mediante una reducción del ratio naïve/TEMRA en células T CD4⁺ (a), así como CD8⁺ (b). ** Indica $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

1.3. Estudio prospectivo de biomarcadores

1.3.1. Análisis de los niveles séricos de BAFF y APRIL a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante renal en pacientes con AbMR subclínico

Para el estudio prospectivo, tal y como se describe en el correspondiente apartado de “material y métodos”, se incluyeron 51 pacientes trasplantados renales que no sufrieron ningún evento de rechazo durante el primer año tras el trasplante, no recibieron ningún tratamiento adicional post-trasplante (timoglobulina, rituximab, plasmaféresis, inmunoglobulinas intravenosas) a excepción de la terapia de inducción en los casos en los que fue utilizada y a los que se les realizó una biopsia de protocolo a los 12 meses post-trasplante que permitió observar el desarrollo de AbMR subclínico.

Se observó que los pacientes que presentaban AbMR subclínico, detectado en la biopsia de protocolo realizada a los 12 meses post-trasplante, tenían niveles séricos de BAFF

IV. Resultados

más elevados a los 6 meses (895,70; IQR 722,44-1010,02 pg/mL), a los 12 meses (1035,91; IQR 718,87-1100,12 pg/mL) y a los 24 meses post-trasplante (1072,28; IQR 1047,73-1222,15 pg/mL) en comparación con los pacientes clínicamente estables (577,13; IQR 417,73-812,61 pg/mL, 619,17; IQR 446,38-798,15 pg/mL y 803,93; IQR 557,49-1030,53 pg/mL), $p = 0,048$, $p = 0,045$ y $p = 0,021$, respectivamente (Figura 25 a, b, c). Sin embargo, los niveles séricos de APRIL no mostraron diferencias significativas entre los grupos analizados en los diferentes puntos de control (datos no mostrados).

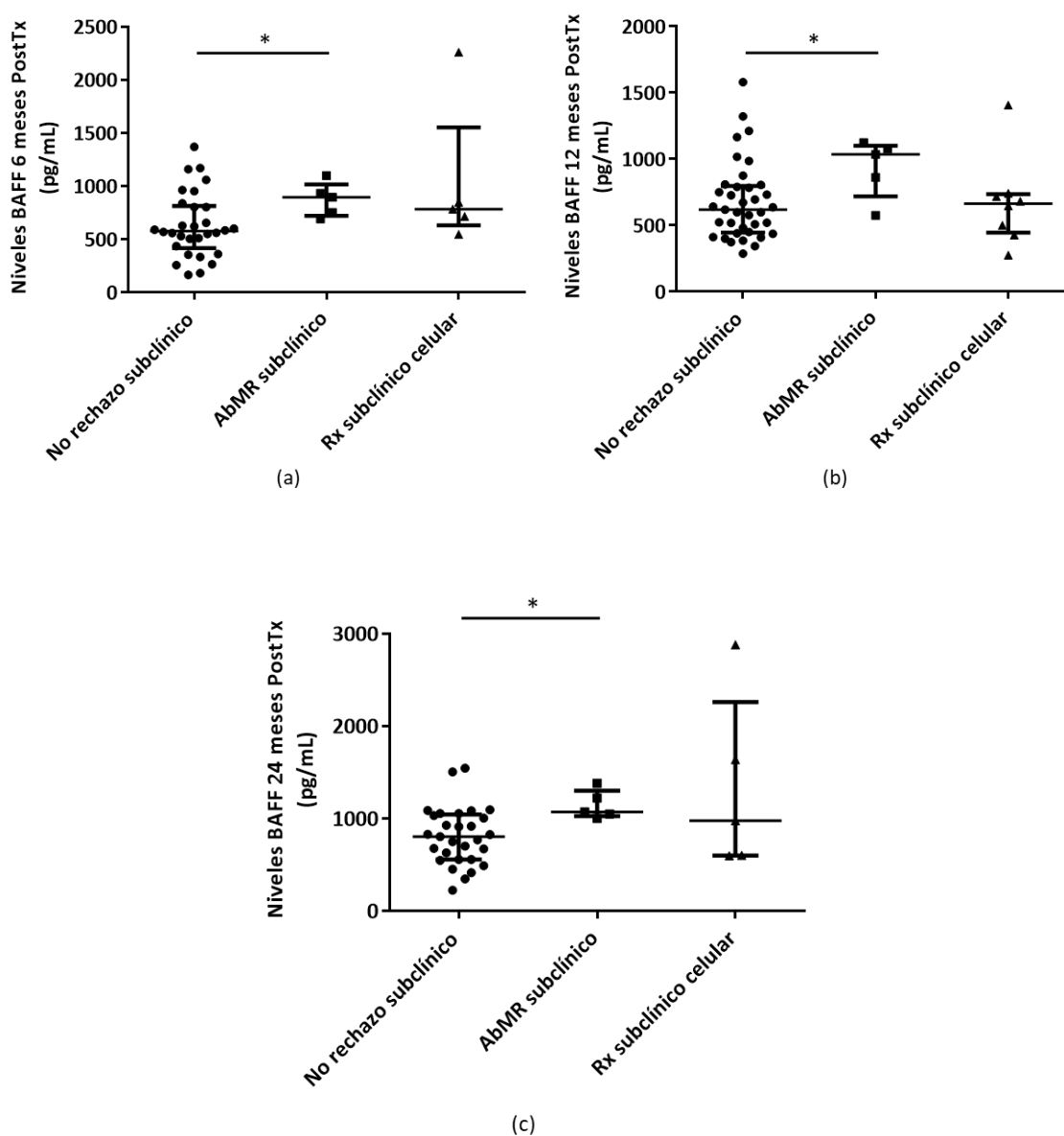
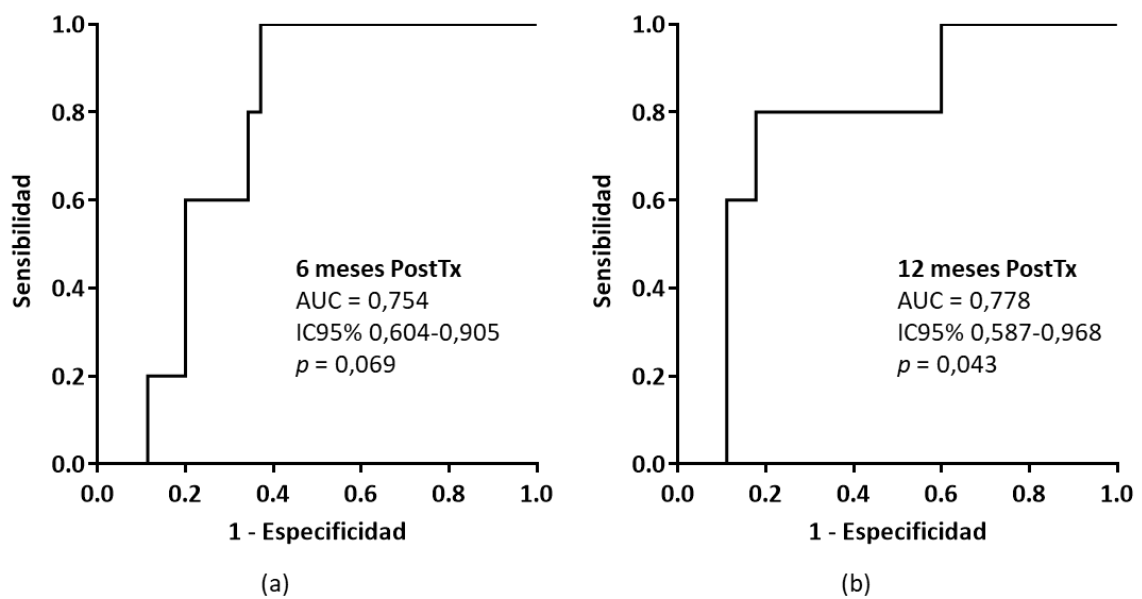


Figura 25. Niveles de BAFF a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante. Aumento significativo de los niveles séricos de BAFF a los 6 (a), 12 (b) y 24 meses (c) post-trasplante renal en pacientes con rechazo subclínico mediado por anticuerpos (AbMR; $n = 5$) detectado de manera retrospectiva en la biopsia de protocolo llevada a cabo los 12 meses tras el trasplante renal, en comparación con el grupo de pacientes sin rechazo ($n = 38$). * Indica $p < 0,05$.

El AUC en el análisis de curva ROC de los niveles de BAFF soluble a los 6, 12 y 24 meses tras el trasplante como biomarcador predictor y de evolución del AbMR subclínico detectado de manera retrospectiva en la biopsia de protocolo fue de 0,754 (IC95% 0,604-0,905), 0,778 (IC95% 0,587-0,968) y 0,794 (IC95% 0,655-0,933), respectivamente.

En función de este análisis y aplicando el índice de Youden, el mejor punto de corte para diferenciar entre niveles bajos y elevados de BAFF a los 6 meses post-trasplante fue de 734,22 pg/mL con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 65,7%. Del mismo modo, el punto de corte óptimo de niveles de BAFF a los 12 meses fue de 835,94 pg/mL con una sensibilidad y especificidad del 80% y 82,2%, respectivamente, mientras que a los 24 meses tras el trasplante renal fue de 1039,13 pg/mL con una sensibilidad del 80%, así como una especificidad del 73,5% (Figura 26 a, b, c).



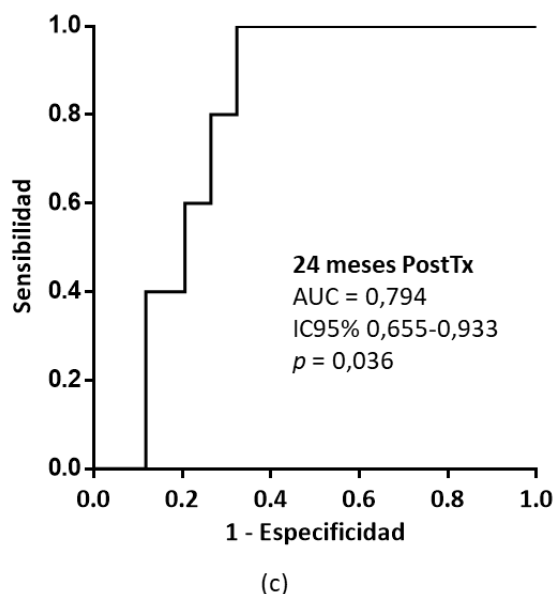


Figura 26. Análisis de curva ROC de los niveles de BAFF a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante. Análisis de curva ROC de los niveles de BAFF a los 6 meses (a), 12 meses (b) y 24 meses (c) tras el trasplante renal y desarrollo de rechazo subclínico mediado por anticuerpos detectado de manera retrospectiva en la biopsia de protocolo.

El análisis de regresión logística multivariante confirmó el papel de los niveles séricos BAFF a los 12 meses tras el trasplante renal como biomarcador implicado en el desarrollo AbMR subclínico, de manera independiente al resto de variables incluidas en el análisis, HR 1,004; IC95% 1,001-1,008, $p = 0,026$. Las covariables incluidas en el análisis multivariante fueron la presencia de anticuerpos anti-HLA y DSA a los 6 y 12 meses tras el trasplante, el número de trasplantes previos, el número total de incompatibilidades HLA (HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1), el uso de terapias de inducción, CIT, así como DGF mantenida.

Cuando se llevó a cabo el análisis multivariante tras la estratificación de los pacientes trasplantados de acuerdo al punto de corte de 835,94 pg/mL, obtenido como valor óptimo para la clasificación de los niveles séricos de BAFF a los 12 meses, los niveles de BAFF permanecieron como un biomarcador independiente en el desarrollo de AbMR subclínico, HR 18,5; IC95% 1,817-188,389, $p = 0,014$, lo cual indica que los niveles elevados de BAFF a los 12 meses tras el trasplante renal incrementan el riesgo de desarrollar AbMR.

Con el objetivo de establecer la determinación de los niveles séricos de BAFF como un biomarcador de utilidad para la evaluación de la función renal y poder predecir el desarrollo de AbMR se realizaron los correspondientes análisis de correlación, los cuales mostraron una correlación positiva entre los niveles de BAFF y el ratio albúmina/creatinina en orina, el cual es un parámetro de utilidad para evaluar la excreción urinaria de albúmina, especialmente en aquellos casos en los que la pérdida de dicha proteína no es muy elevada y puede verse enmascarada por otras proteínas también excretadas, dando lugar a cocientes proteína/creatinina en orina y a determinaciones de proteinuria de 24 horas dentro del rango de normalidad. Un aumento del cociente albúmina/creatinina en orina es indicativo de cierto grado de fallo renal (Tabla 8).

Tabla 8. Correlación entre los niveles de BAFF y el cociente albúmina/creatinina en orina a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante.

	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	p
Niveles BAFF 6 meses (pg/mL) vs Albúmina/Creatinina orina 12 meses (mg/g)	0,326	0,04
Niveles BAFF 6 meses (pg/mL) vs Albúmina/Creatinina orina 24 meses (mg/g)	0,466	0,005
Niveles BAFF 12 meses (pg/mL) vs Albúmina/Creatinina orina 12 meses (mg/g)	0,340	0,016
Niveles BAFF 12 meses (pg/mL) vs Albúmina/Creatinina orina 24 meses (mg/g)	0,373	0,012
Niveles BAFF 24 meses (pg/mL) vs Albúmina/Creatinina orina 12 meses (mg/g)	0,451	0,004
Niveles BAFF 24 meses (pg/mL) vs Albúmina/Creatinina orina 24 meses (mg/g)	0,485	0,002

Así mismo también se observó una correlación positiva entre los niveles de BAFF presentes en suero en los distintos puntos de control (6, 12 y 24 meses post-trasplante) (Figura 27 a, b, c).

IV. Resultados

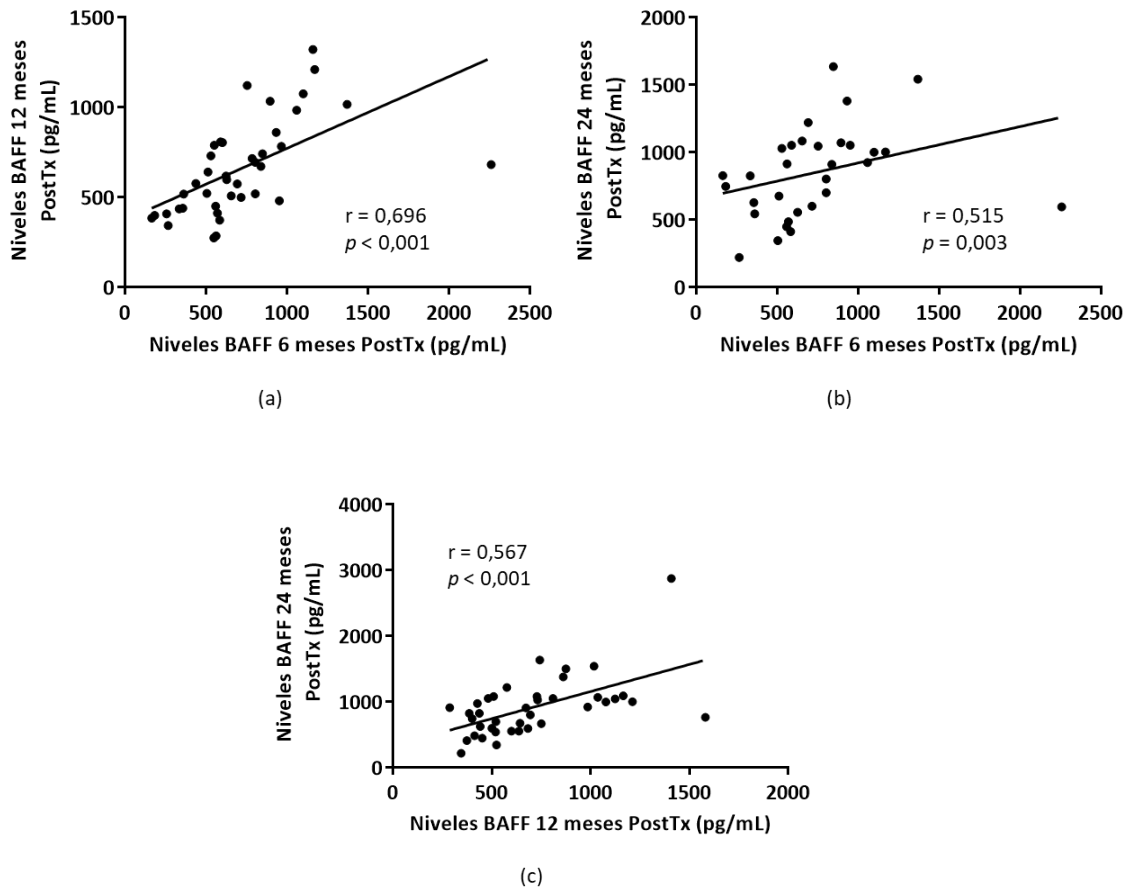


Figura 27. Correlación de los niveles solubles de BAFF en los distintos puntos de control (6, 12 y 24 meses post-trasplante).

1.3.2. Análisis de la distribución de subpoblaciones de linfocitos B y T a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante en pacientes con AbMR subclínico

Tal y como está descrito, el uso de terapias de inducción, concretamente el uso de timoglobulina, provoca una depleción celular significativa. Sin embargo, a diferencia de los que ocurre con los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, los linfocitos B CD19⁺ no se ven afectados (Figura 28 a, b, c).

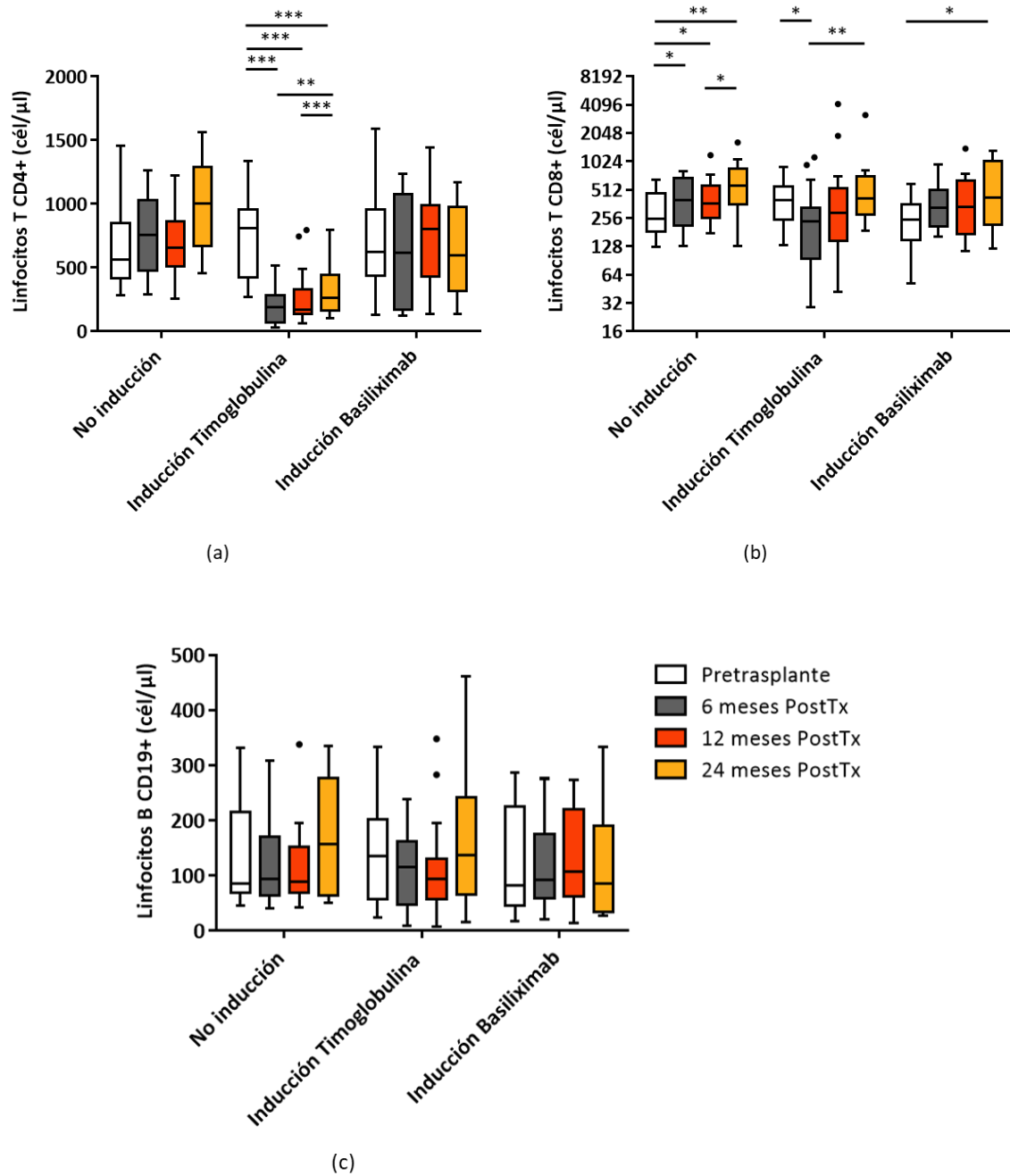


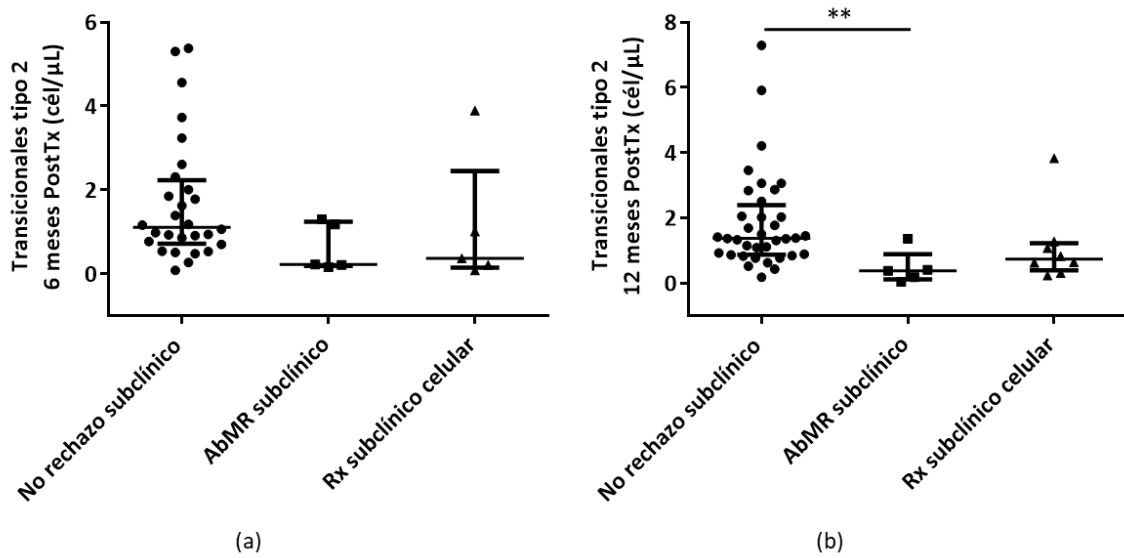
Figura 28. Efecto de la terapia de inducción en los linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y en los linfocitos B CD19⁺. Reducción del número absoluto de linfocitos T CD4⁺ (a) y linfocitos T CD8⁺ (b) post-trasplante en pacientes que recibieron timoglobulina con tratamiento de inducción. No se observaron diferencias en el número de linfocitos B CD19⁺ (c). * Indica $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

En base a ello, para este estudio prospectivo se tuvieron en cuenta los números absolutos de aquellas poblaciones celulares cuya distribución se encontró alterada en el momento pretrasplante, considerando que las diferencias encontradas no fueron

IV. Resultados

debidas a una depleción de los linfocitos B CD19⁺ como consecuencia del uso de tratamientos de inducción. Las frecuencias de las distintas poblaciones celulares en cada uno de los puntos de control se muestran en la Tabla Anexo 2.

De esta manera, se observó que los pacientes con AbMR subclínico presentaron una reducción del número absoluto de células transicionales T2 a los 6 meses (0,21; IQR 0,08-1,24 cél/μL), a los 12 meses (0,38; IQR 0,11-0,89 cél/μL) y a los 24 meses (0,50; IQR 0,29-1,18 cél/μL) en comparación con el grupo de pacientes que no mostró indicios de rechazo (1,11; IQR 0,72-2,22 cél/μL, 1,38; IQR 0,87-2,40 cél/μL y 1,59; IQR 0,67-3,45 cél/μL), $p = 0,067$, $p = 0,005$ y $p = 0,044$, respectivamente (Figura 29 a, b, c).



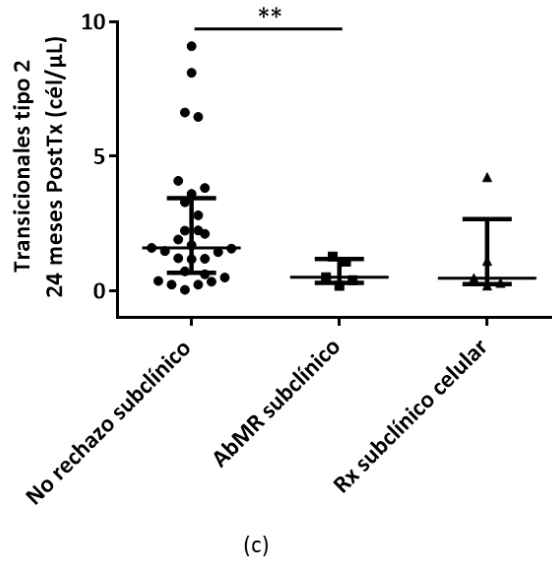


Figura 29. Distribución de las células B transicionales tipo 2 a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante. Disminución del número absoluto de células B transicionales tipo 2 en pacientes con rechazo subclínico mediado por anticuerpos (AbMR; $n = 5$) respecto al grupo de pacientes sin rechazo ($n = 38$) a los 6 meses (a), 12 meses (b) y 24 meses (c) tras el trasplante renal. * Indica $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Así mismo, se observó una tendencia al aumento de las subpoblaciones de células B con un fenotipo memoria (Bm5 + eBm5, así como células B memoria con y sin cambio de isotipo) a los 6 meses post-trasplante (datos no mostrados), la cual fue confirmada a los 12 y 24 meses tras el mismo como consecuencia de la reducción tanto del ratio naïve/memoria, como $(Bm2+Bm2')/(Bm5+eBm5)$ en los paciente con AbMR subclínico frente al grupo de pacientes trasplantados sin datos de rechazo (Figura 30 a, b, c, d).

IV. Resultados

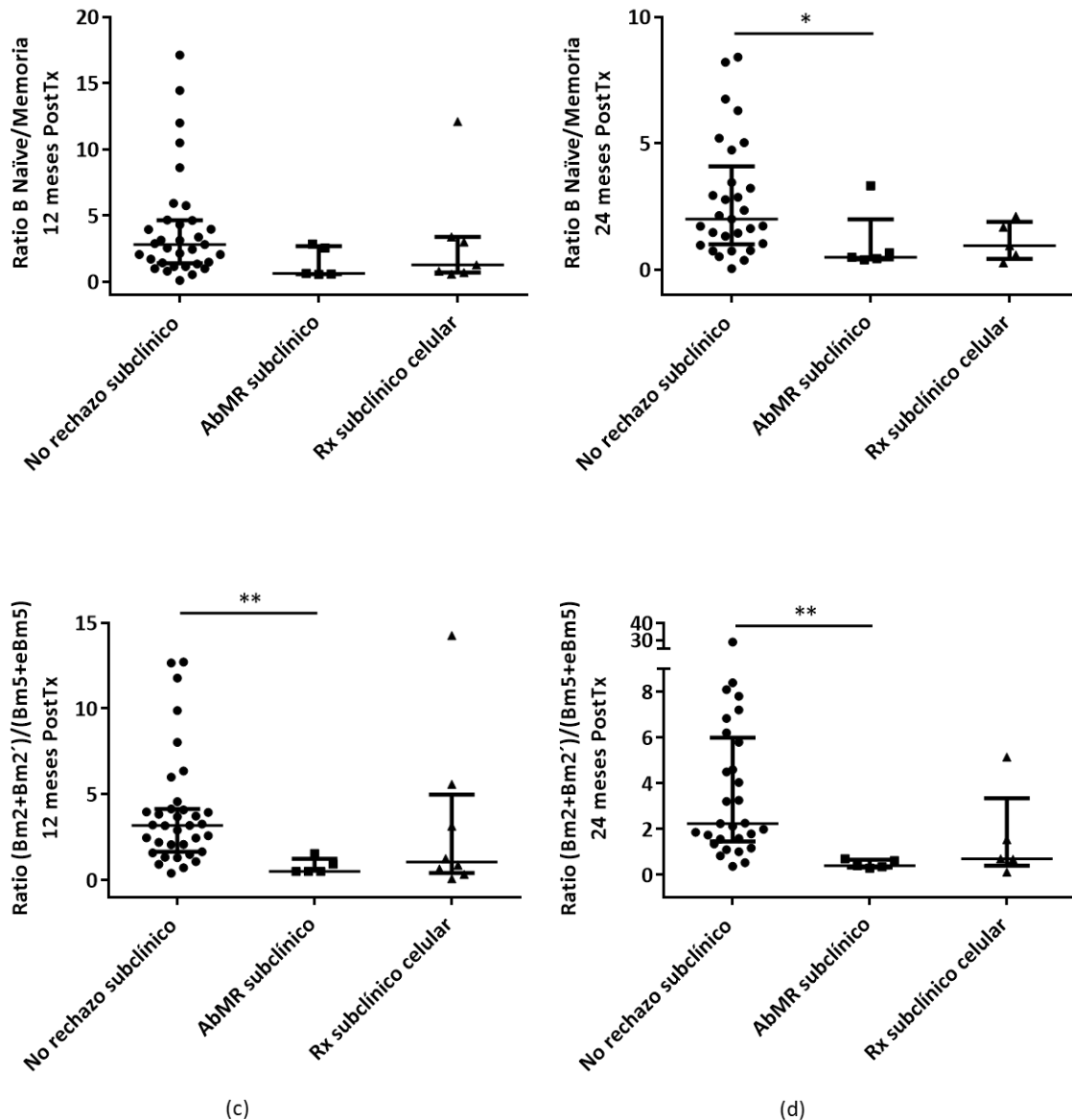


Figura 30. Distribución del ratio de células B naïve/memoria y (Bm2+Bm2')/(Bm5+eBm5) a los 12 y 24 meses post-trasplante. Aumento de las subpoblaciones con fenotipo memoria en pacientes con rechazo subclínico mediado por anticuerpos (AbMR; n = 5) respecto al grupo de pacientes sin rechazo (n = 38), lo cual se traduce en la consiguiente reducción tanto del ratio de células B naïve/memoria a los 12 meses (p = 0,055) (a) y a los 24 meses (p = 0,039) (b), como del ratio (Bm2 + Bm2')/(Bm5 + eBm5) a los 12 meses (p = 0,002) (c) y a los 24 meses (p = 0,001) (d) tras el trasplante renal. * Indica p < 0,05 y ** p < 0,01.

Respecto a las subpoblaciones de linfocitos T únicamente se observó un aumento de las células T CD4+ TEMRA a los 6 meses tras el trasplante y por ende, una reducción del ratio de linfocitos T CD4+ naïve/TEMRA en los pacientes que presentaron AbMR en la biopsia de protocolo respecto al grupo de pacientes sin rechazo, p = 0,012. No se

encontró ninguna diferencia a los 12 ni a los 24 meses en lo que respecta a subpoblaciones de linfocitos T (Figura 31).

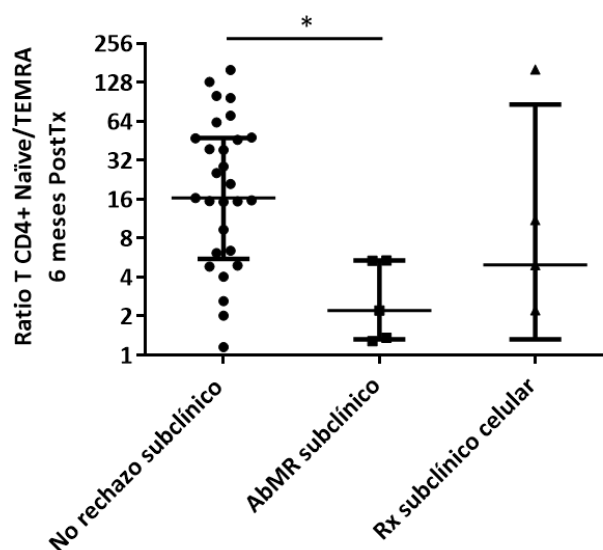


Figura 31. Distribución del ratio de linfocitos T CD4⁺ naïve/TEMRA a los 6 meses post-trasplante. Disminución del ratio de células T CD4⁺ naïve/TEMRA en pacientes con rechazo subclínico mediado por anticuerpos (AbMR; n = 5) respecto al grupo de pacientes estables (n = 38). * Indica p < 0,05.

1.4. Estudio de incompatibilidades HLA y de *eplets* verificados por anticuerpos

El estudio del número de incompatibilidades HLA, así como de *eplets* verificados por anticuerpos (VerEp), demostró la existencia de una correlación positiva entre ambas variables para los distintos *loci* HLA estudiados (HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1) (Tabla 9).

Tabla 9. Correlación entre el número de incompatibilidades HLA y de *eplets* verificados por anticuerpos.

	Coefficiente de correlación de Pearson (r)	p
Incompatibilidades HLA-A vs VerEpA	0,683	< 0,001
Incompatibilidades HLA-B vs VerEpB	0,394	0,004
Incompatibilidades HLA-C vs VerEpC	0,522	<0,001
Incompatibilidades HLA-DRB1 vs VerEpDRB1	0,556	<0,001
Incompatibilidades HLA-DQB1 vs VerEpDQB1	0,664	<0,001

IV. Resultados

Además de esta correlación, se observó que los pacientes con AbMR subclínico presentaban un mayor número de incompatibilidades HLA-DRB1 (1,6; SD 0,55), así como de *eplets* verificados por anticuerpo para el mismo locus (VerEpDRB1) (6; IQR 4-8), en comparación con el grupo de pacientes sin rechazo (1,13; SD 0,67 y 3; IQR 1-5), $p = 0,135$ y $p = 0,035$, respectivamente. Los pacientes con AbMR subclínico también presentaron un mayor número de incompatibilidades de *eplets* de loci HLA de clase II (VerEpDRB1 + VerEPDQB1) (14,00; IQR 10,50-14,00) respecto al grupo de pacientes clínicamente estables (7,00; IQR 4,00-11,25), $p = 0,035$.

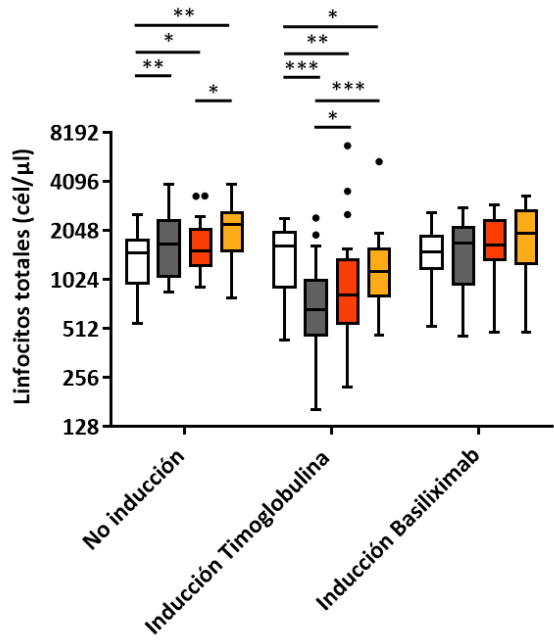
1.5. Efecto de la terapia de inducción en las poblaciones celulares

Para el estudio del efecto de la terapia de inducción (timoglobulina y basiliximab) en las poblaciones celulares de pacientes trasplantados renales se incluyeron 91 pacientes que no recibieron rituximab ni timoglobulina post-trasplante como tratamiento del rechazo agudo, recibiendo por tanto, únicamente, terapia de inducción en los casos en los que fue necesaria, tal y como se describe en el correspondiente apartado de “material y métodos”.

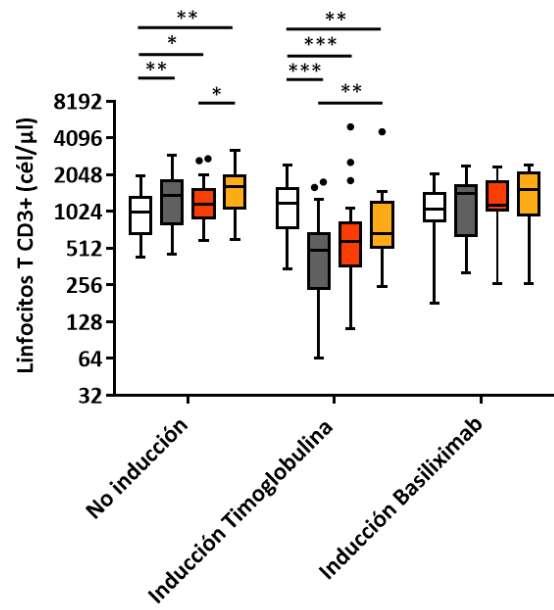
Los datos mostraron que aquellos pacientes que recibieron timoglobulina como terapia de inducción presentaron un descenso tanto del número absoluto de linfocitos, como de número total de linfocitos T CD3+, así como de los linfocitos T CD4+ a los 6, 12 y 24 meses tras el trasplante. Esta depleción celular no se observó en aquellos pacientes que no recibieron terapia de inducción, donde por el contrario se apreció un aumento de las citadas poblaciones celulares, ni en los pacientes que recibieron basiliximab donde los números absolutos de los distintos tipos celulares permanecieron estables a lo largo del tiempo.

En lo que respecta a los linfocitos T CD8+ se observó un aumento de los mismos tanto en los pacientes sin inducción como en los tratados con basiliximab, permaneciendo estables a los 6, 12 y 24 meses en los pacientes tratados con timoglobulina.

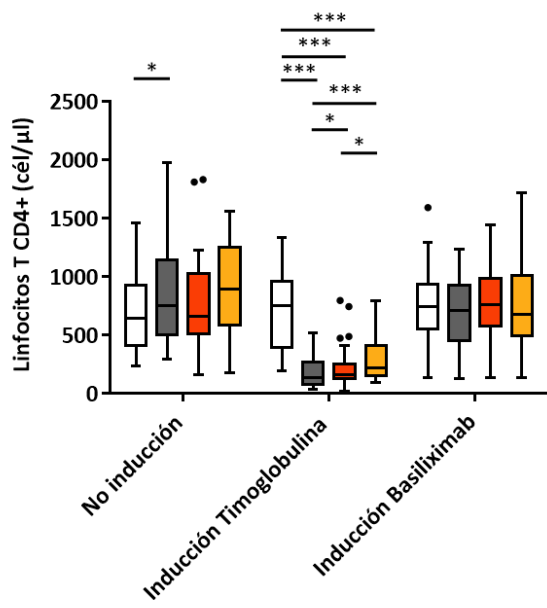
A diferencia de lo mencionado, los números absolutos de linfocitos B CD19+ no variaron con el paso del tiempo en ninguno de los grupos estudiados (Figura 32 a, b, c, d, e).



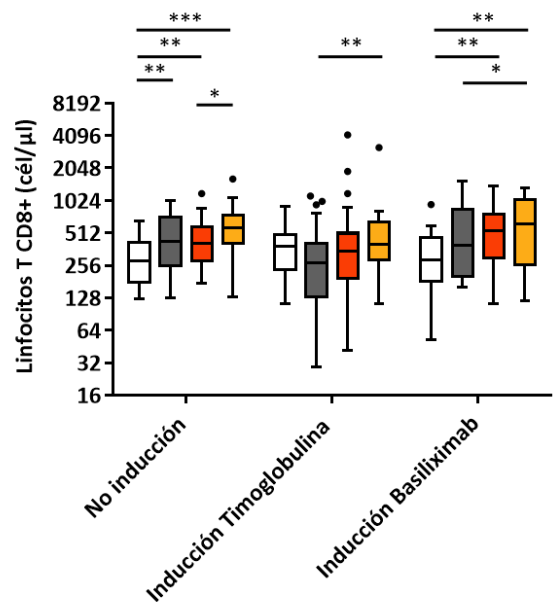
(a)



(b)

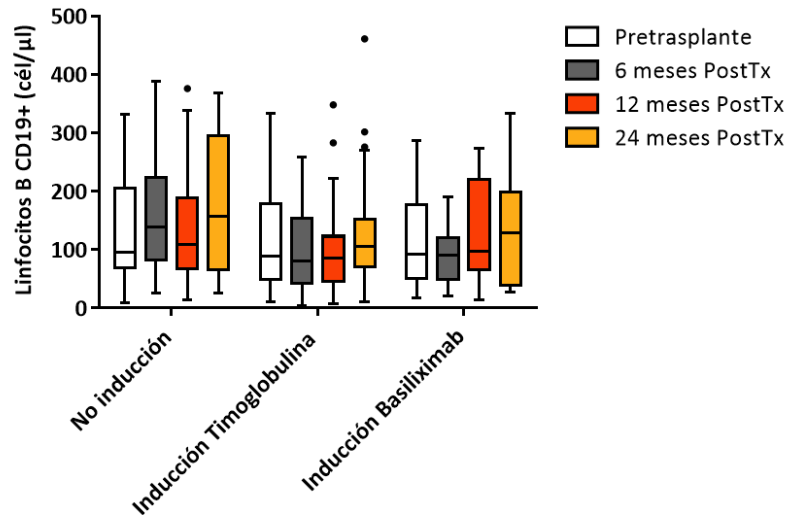


(c)



(d)

IV. Resultados



(e)

Figura 32. Efecto de la terapia de inducción en la dinámica de las poblaciones celulares. 44 pacientes fueron tratados con timoglobulina, 20 con basiliximab y 27 pacientes no recibieron ningún tratamiento de inducción. * Indica $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Profundizando en los efectos de los tratamientos de inducción sobre el repertorio de subpoblaciones de linfocitos B se observó una reducción del número de linfocitos B memoria con cambio de isotipo a los 6 y 12 meses post-trasplante, únicamente, en aquellos pacientes tratados con timoglobulina (Figura 33).

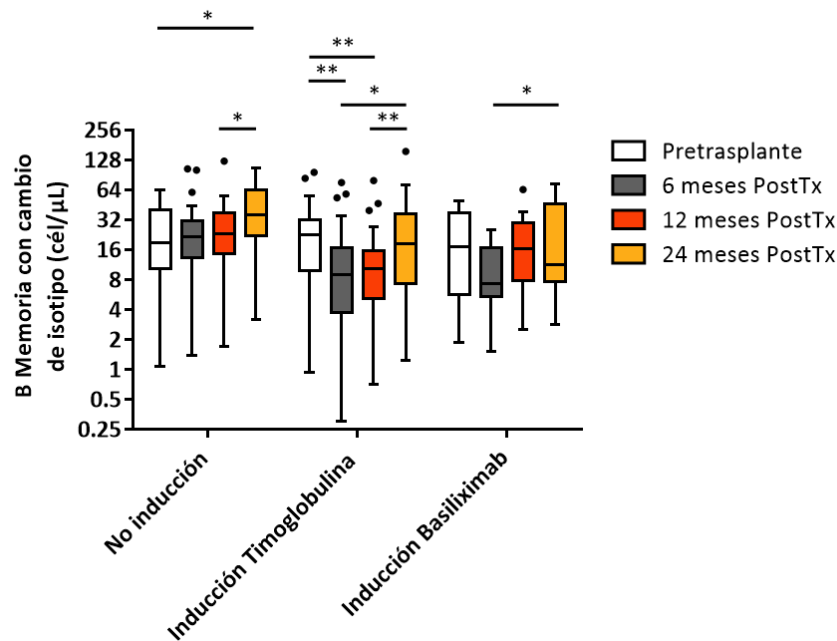


Figura 33. Efecto de la terapia de inducción en los niveles de células B memoria con cambio de isotipo. Depleción de células B memoria con cambio de isotipo a los 6 y 12 meses post-trasplante en pacientes que reciben terapia de inducción con timoglobulina ($n = 44$). * Indica $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Finalmente, se apreció una disminución del número de células plasmáticas a los 12 y 24 meses tras el trasplante, exclusivamente, en aquellos pacientes tratados con timoglobulina como terapia de inducción. Además, se encontró una reducción significativa en el número absoluto de dicha población celular a los 12 meses post-trasplante en los pacientes que recibieron timoglobulina (5,23; IQR 2,19-14,04 $\text{cél}/\mu\text{L}$) frente a los pacientes que no recibieron tratamiento de inducción (16,33; IQR 10,59-23,48 $\text{cél}/\mu\text{L}$) o que fueron tratados con basiliximab (13,12; IQR 4,57-29,42 $\text{cél}/\mu\text{L}$), $p = 0,001$ y $p = 0,024$, respectivamente. Por el contrario, no se observaron diferencias en el número absoluto de células plasmáticas pretrasplante ni a los 6 meses del mismo entre los tres grupos de pacientes (Figura 34 a, b).

IV. Resultados

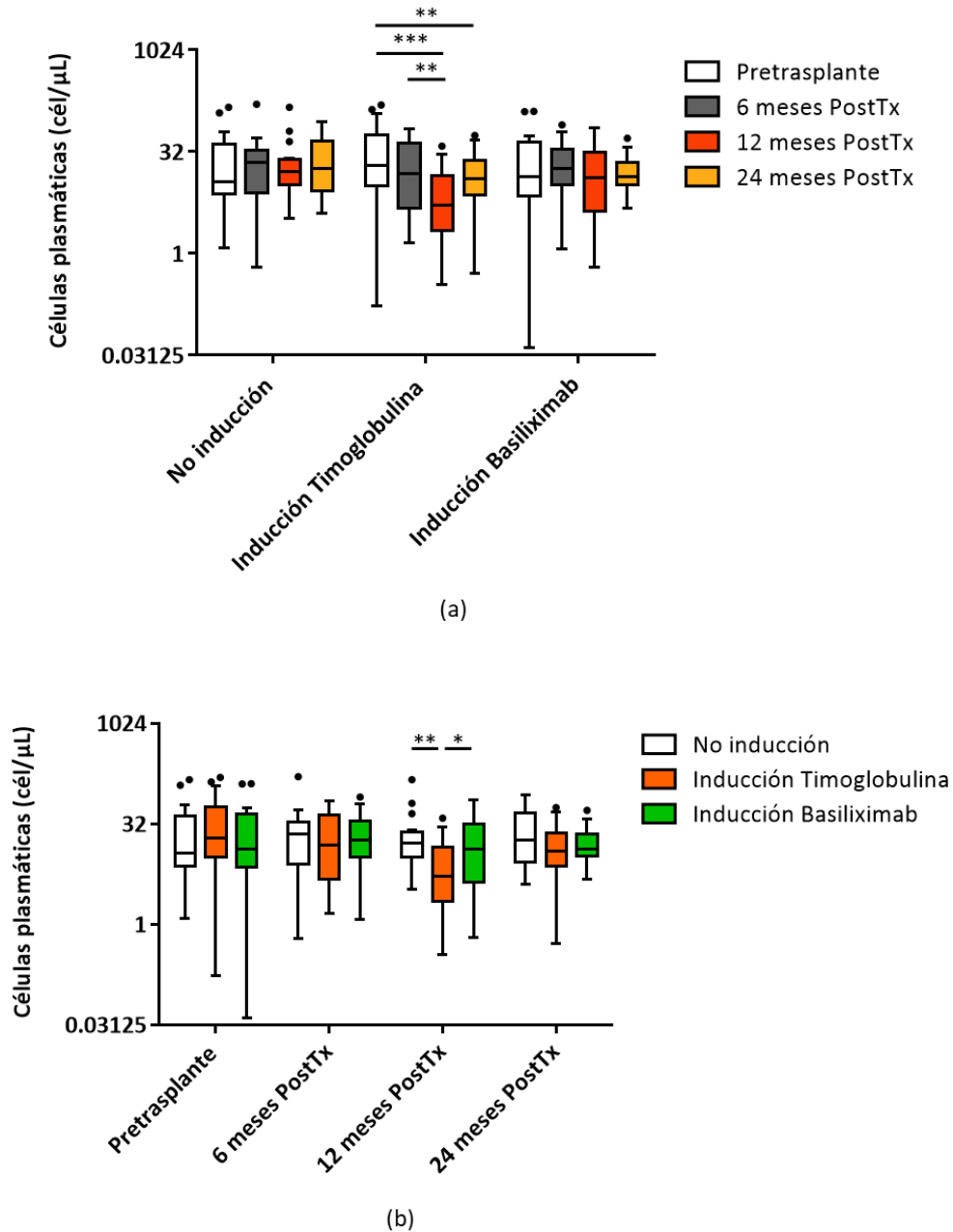


Figura 34. Efecto de la terapia de inducción en los niveles de células plasmáticas. a) Reducción del número de células plasmáticas a los 12 y 24 meses tras el trasplante en los pacientes que recibieron inducción con timoglobulina ($n = 44$). b) Descenso del número de células plasmáticas a los 12 meses post-trasplante en los pacientes que recibieron inducción con timoglobulina ($n = 44$) respecto al grupo de pacientes sin tratamiento de inducción ($n = 27$) y a los pacientes tratados con basiliximab ($n = 20$). * Indica $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

2. Bloque II: Estudio Retrospectivo

2.1. Características de la cohorte

Para el estudio del perfil de anticuerpos anti-HLA se incluyeron 18 pacientes hipersensibilizados, con un cPRA > 98%, incluidos en lista de espera de trasplante renal en el HUMV, los cuales no recibieron ningún tratamiento de desensibilización con rituximab ni con IGIVs en los 12 meses previos a su incorporación en el estudio. Las principales características clínico-demográficas pueden observarse en la Tabla 10. Las especificidades antigénicas de los anticuerpos anti-HLA de clase I se determinaron tanto en el suero neto (N), como en el suero diluido 1/160 (Dil), así como mediante el test de C1q, con el objetivo de determinar la capacidad de los anticuerpos anti-HLA de activar el sistema del complemento, en cada uno de los pacientes. En el caso del estudio de la presencia de anticuerpos anti-HLA en el suero diluido, se empleó una dilución elevada para así detectar únicamente las especificidades de mayor título. Cinco de los pacientes (27,8%) pudieron ser trasplantados con un resultado de prueba cruzada mediante CDC negativo, aunque positivo mediante citometría de flujo.

Tabla 10. Características clínico-demográficas de los pacientes hipersensibilizados.

	Pacientes hipersensibilizados (n = 18)			
	n	Media / Mediana	SD / IQR	%
Edad (años)		57	48-69	
Sexo (% mujeres)	5			27,8
Causa enfermedad renal terminal				
Glomerular	10			55,5
Nefropatía diabética	1			5,6
Intersticial	4			22,2
Vascular	2			11,1
No filiada	1			5,6
Tipo de tratamiento renal sustitutivo				
Hemodiálisis	16			88,9
Diálisis peritoneal	2			11,1
Número de trasplantes				
0	2			11,1
1	6			33,3
2	9			50
3	1			5,6
cPRA		99	98-100	
Transfusiones	10			55,6

SD: desviación estándar; IQR: rango intercuartílico; cPRA: panel reactivo de anticuerpos calculado

2.2. Perfiles de anticuerpos anti-HLA de clase I en pacientes hipersensibilizados

En primer lugar, con el objetivo de establecer una asociación entre los valores de MFI de los anticuerpos anti-HLA frente a antígenos de clase I obtenidos en cada una de las condiciones descritas, se llevaron a cabo los correspondientes análisis de correlación, los cuales mostraron una asociación positiva entre los valores de MFI en suero neto y diluido, así como entre MFI en suero diluido y C1q. También se observó una correlación positiva, aunque menor entre MFI en suero neto y C1q (Figura 35 a, b, c).

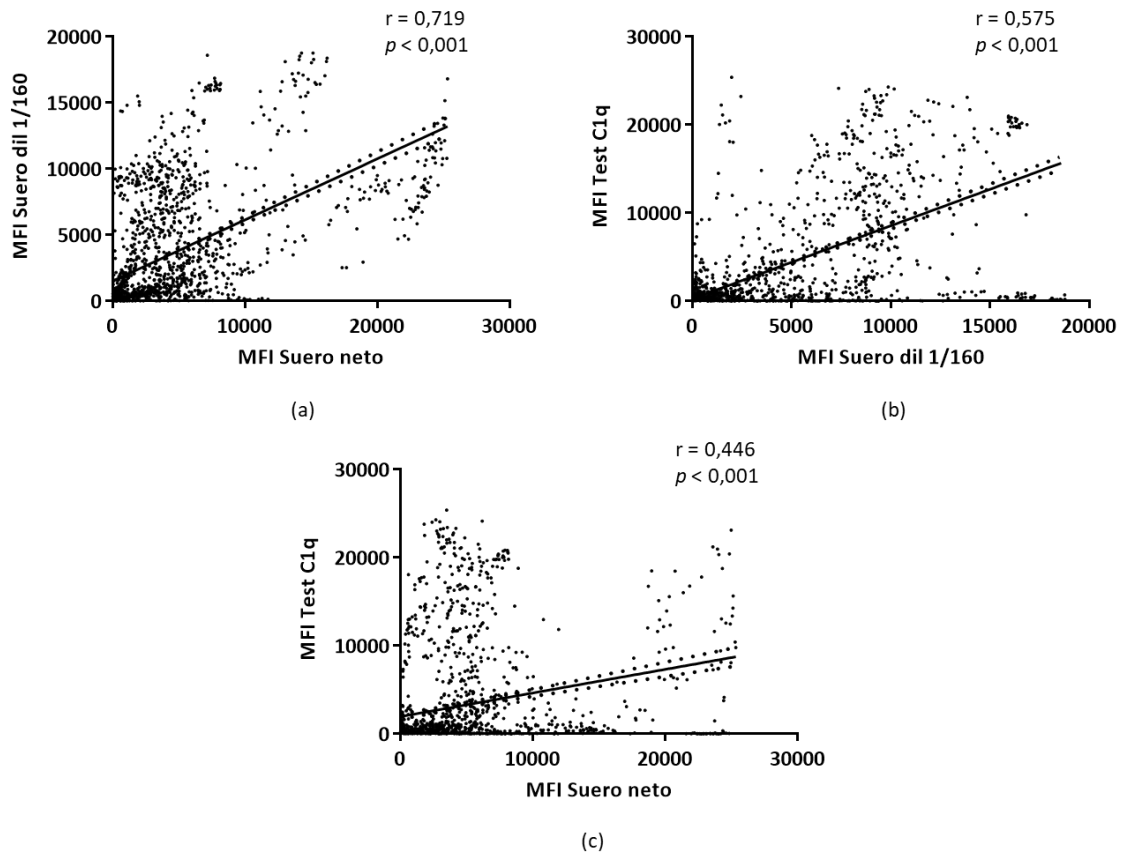


Figura 35. Valores de MFI de los anticuerpos anti-HLA de clase I en suero neto, diluido y test de C1q. Correlación de los valores de MFI de los anticuerpos anti-HLA frente a antígenos HLA de clase I obtenidos en muestras de suero neto, diluido 1/160 y tras el test de C1q en pacientes hipersensibilizados tras analizar 1746 microesferas. Se observó una correlación positiva entre los tres parámetros analizados, siendo mayor entre valores de MFI en suero neto y diluido (a), seguida de MFI en suero diluido y C1q (b) y MFI en suero neto y C1q (c).

A continuación, en función de la combinación de resultados obtenidos en cada una de las tres condiciones, se procedió a la estratificación de la reactividad de los sueros. De esta manera, gracias a los resultados obtenidos tras analizar los valores de MFI en los sueros diluidos se pudo discriminar entre títulos altos y bajos de anticuerpos anti-HLA y mediante el estudio de C1q entre aquellos fijadores y no fijadores de complemento. Las especificidades catalogadas como fijadoras de complemento y presentes a título elevados, es decir, aquellas que mostraron valores de MFI positivos en las tres condiciones (neto +, dilución 1/160 + y C1q +) fueron consideradas especificidades de muy alto riesgo en los pacientes y por tanto, antígenos HLA prohibidos en el caso de existir un potencial donante. De la misma manera, todas las especificidades que mostraron resultados positivos en el test de C1q se consideraron de alto riesgo, debido

IV. Resultados

a la elevada probabilidad de dar lugar a resultados positivos en la prueba cruzada mediante CDC.

Es importante destacar también aquellas especificidades positivas al analizar el suero neto y que sin embargo, resultaron negativas cuando se analizó el suero diluido y se llevó a cabo el test de C1q (17,8%) (N+/Dil-/C1q-). Este tipo de especificidades podrían considerarse de bajo riesgo. Por el contrario, se detectaron ciertas especificidades negativas en el suero neto pero que dieron lugar a resultados positivos en el suero diluido, así como en el test de C1q (1,5%) (N-/Dil+/C1q+). Estas especificidades de antígenos HLA, en las que se detectó un efecto prozona, se catalogaron como especificidades de muy alto riesgo y por consiguiente, especificidades prohibidas. En la Figura 36 puede observarse el perfil completo de reactividad de los sueros analizados.

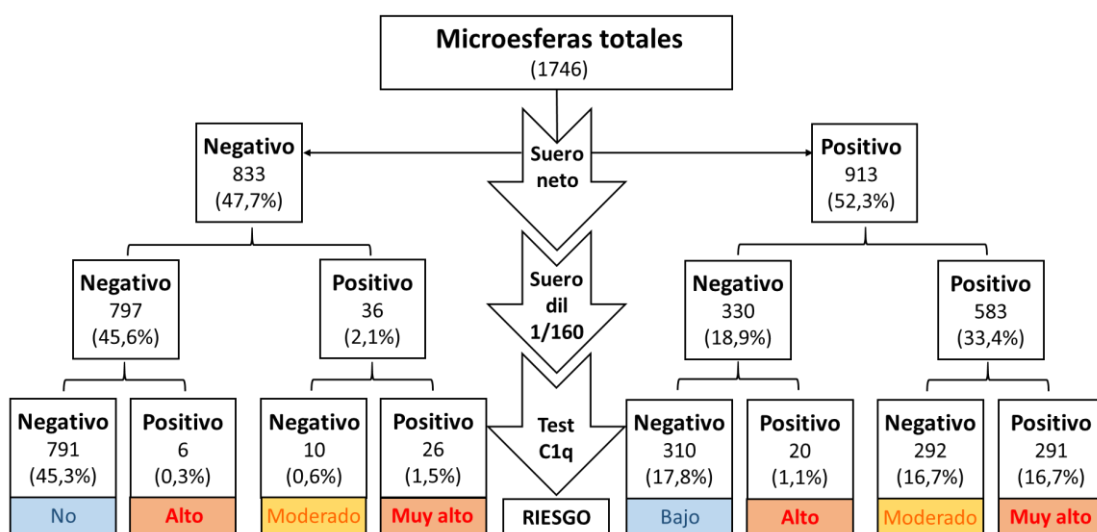


Figura 36. Escala de riesgo. Estratificación del riesgo de los antígenos HLA de clase I en función de los resultados obtenidos tras analizar la presencia de anticuerpos anti-HLA en muestras de suero neto, diluido 1/160 y test de C1q de pacientes hipersensibilizados. El número total de microesferas analizadas fue de 1746, las cuales fueron distribuidas en función del resultado positivo o negativo obtenido tras el análisis de anticuerpos anti-HLA en suero neto, diluido 1/160 y test de C1q. La combinación de resultados permitió establecer diferentes riesgos potenciales. Se muestra el número absoluto de microesferas en cada grupo, así como el porcentaje correspondiente entre paréntesis.

El número medio de especificidades positivas en nuestra cohorte de pacientes hipersensibilizados fue de 51,5 en el suero neto, observándose una reducción

significativa tras el análisis de las mismas en el suero diluido (37,0), así como tras el test de C1q (24,0), $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente (Figura 37). Esto dio lugar a que en 15 de los pacientes hipersensibilizados (83,3%) diversos antígenos HLA fuesen asignados como prohibidos al analizar el suero neto, tratándose en realidad de anticuerpos anti-HLA a título bajo, fruto de su resultado negativo tras el análisis del suero diluido. Por el contrario, se observó un efecto prozona en 7 de los pacientes (38,9%), donde se consideraron negativas ciertas especificidades antigénicas que sin embargo dieron lugar a resultados positivos cuando fueron analizadas en el suero diluido. Además, se confirmó que dichas especificidades eran de muy alto riesgo en 4 de estos pacientes (57,1%), ya que se trataba de especificidades con capacidad de fijación de complemento.

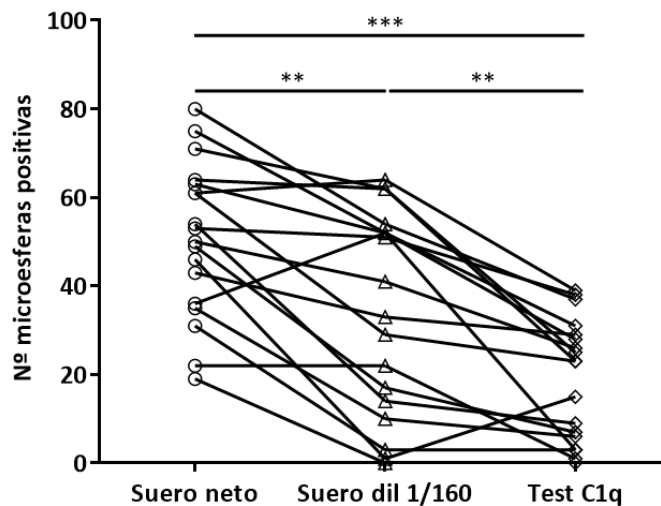


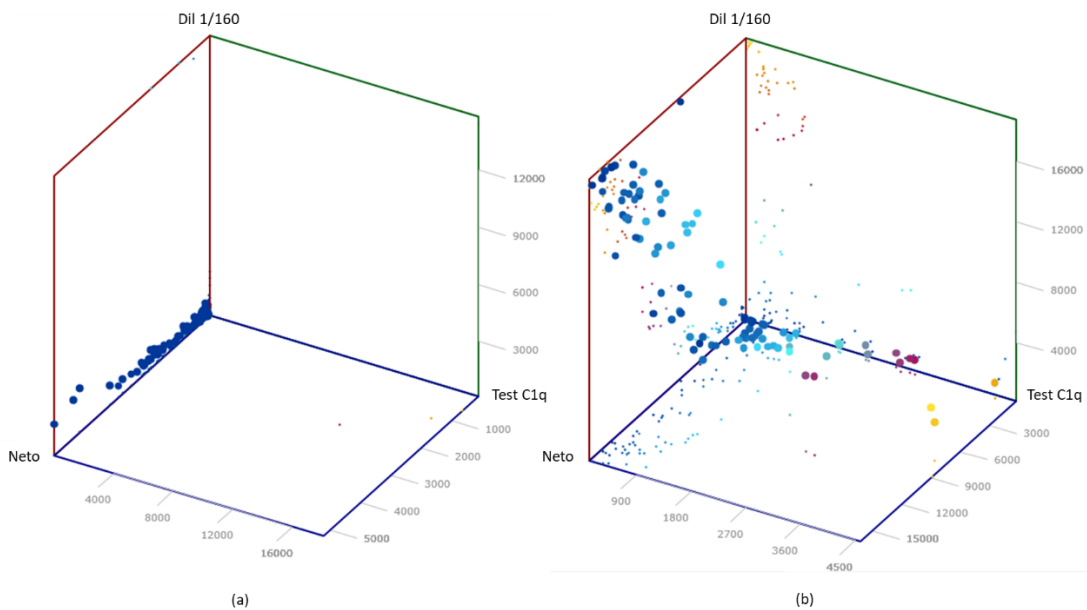
Figura 37. Microesferas positivas. Número de microesferas positivas tras el análisis de la especificidad de los anticuerpos anti-HLA de clase I en el suero neto, diluido 1/160, así como tras el test de C1q. ** Indica $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

2.3. Clasificación de los pacientes hipersensibilizados en función del perfil de anticuerpos anti-HLA de clase I

Tras la definición de los distintos perfiles de riesgo anteriormente descritos, los pacientes hipersensibilizados incluidos en el estudio fueron clasificados en base a ellos gracias a los resultados de los análisis de "single antigen" de clase I llevados a cabo en las tres condiciones, de tal manera que se identificaron distintos tipos de pacientes en función del riesgo de la sensibilización HLA. En primer lugar, desatacan aquellos

IV. Resultados

pacientes con anticuerpos anti-HLA de bajo riesgo, es decir positivos en el suero neto pero negativos tanto en el suero diluido como tras el test de C1q (+/-/-) (Figura 38 a). A continuación, podemos destacar aquellos pacientes de riesgo moderado en los que encontramos anticuerpos anti-HLA tanto en el suero neto como en el diluido pero que no fijan complemento (+/+/-) (Figura 38 b). El tercer nivel de riesgo incluye a los pacientes de alto riesgo, con anticuerpos anti-HLA a título bajo pero con capacidad de fijación de complemento (+/-/+) (Figura 38 c). Y por último, se encuentran los pacientes con un perfil de anticuerpos anti-HLA de riesgo muy alto, entre los que destacan aquellos con anticuerpos positivos tanto en el suero neto como en el diluido y con capacidad de fijación de complemento (+/+/) (Figura 38 d), así como aquellos pacientes en los cuales se confirma un efecto prozona con anticuerpos capaces de activar el sistema del complemento (-/+/) (Figura 38 e).



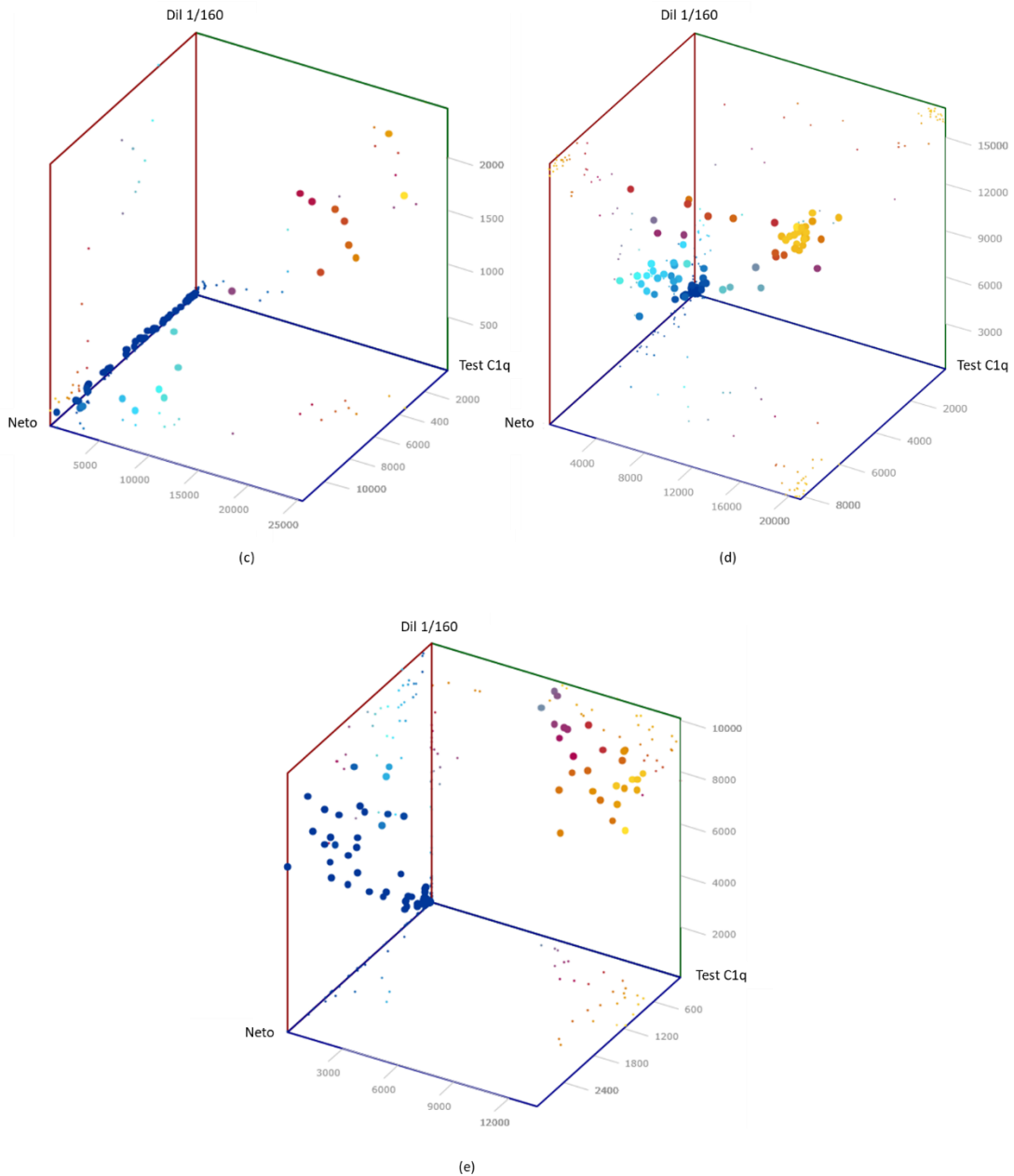


Figura 38. Diagramas de dispersión tridimensionales. Diagramas de dispersión tridimensionales en los que se representan los valores de MFI de los anticuerpos anti-HLA de clase I analizados en suero neto (eje x), suero diluido 1/160 (eje z) y tras el test de C1q (eje y). La escala de colores se basa en los valores de MFI obtenidos en el test de C1q. El color azul indica niveles bajo, el naranja-rojo niveles intermedios y el amarillo niveles elevados. En la figura (a) se representa un paciente con un perfil de bajo riesgo (+/-/-), en la figura (b) un paciente de riesgo moderado (+/+/-), en la figura (c) un paciente de riesgo alto (+/-/+) y en las figuras (d) y (e) dos pacientes hipersensibilizados con un perfil de anticuerpos anti-HLA de clase I de riesgo muy alto (+/+/) y (-/+/+), respectivamente. <http://www.doka.ch/Excel3Dscatterplot.htm>

El riesgo de los diferentes perfiles de anticuerpos anti-HLA fue evaluado mediante prueba cruzada por CDC, así como por citometría de flujo. Para ello, se seleccionar

donantes cuyo tipaje HLA de clase I era compatible con la especificidad y el perfil de reactividad de los anticuerpos anti-HLA que se deseaba testar. De este modo, se evaluaron sueros de pacientes hipersensibilizados con especificidades con un perfil de bajo riesgo (+/-/-), los cuales dieron lugar a pruebas cruzadas negativas tanto por CDC como por citometría en suero diluido. Cuando se evaluó el perfil de riesgo moderado (+/+/-) se obtuvieron resultados negativos mediante CDC aunque positivos mediante citometría de flujo. Los perfiles de riesgo alto (+/-/+) y muy alto (+/+/+ y -/+ /+) se tradujeron en resultados positivos en las pruebas cruzadas por CDC y citometría de flujo en todos los casos. En la Tabla Anexo 3 se muestran los valores de MFI de las distintas especificidades antigénicas testadas en suero neto, diluido y tras el test de C1q de cada uno de los perfiles de anticuerpos anti-HLA de clase I evaluados en pacientes hipersensibilizados, así como los resultados obtenidos en las pruebas cruzadas por CDC y citometría de flujo.

2.4. Evaluación del riesgo clínico de la presencia de anticuerpos anti-HLA pretrasplante en pacientes trasplantados con prueba cruzada positiva por citometría de flujo

Tal y como se ha comentado, cinco de los 18 pacientes hipersensibilizados incluidos en el estudio fueron trasplantados con una prueba cruzada negativa por CDC, pero positiva mediante citometría de flujo. Todos los pacientes presentaron anticuerpos anti-HLA de clase II en el suero neto, siendo en el 80% de los casos anticuerpos presentes a título alto y con capacidad de fijación de complemento. En la Tabla 11 se muestran los distintos perfiles de riesgo de los anticuerpos anti-HLA detectados dirigidos frente a moléculas HLA de los donantes, así como los valores de MFI obtenidos en las distintas condiciones y los resultados de la prueba cruzada por CDC y citometría. En todos los casos se llevó a cabo una biopsia renal con el objetivo de evaluar el desarrollo de AbMR, la cual confirmó la presencia de AbMR en los cuatro pacientes con un perfil pretrasplante de anticuerpos anti-HLA pretrasplante de riesgo alto, siendo éste un perfil -/+ /+ en un paciente y +/+/+ en los tres restantes. Por el contrario, el paciente hipersensibilizado que fue trasplantado con un perfil pretrasplante de anticuerpos anti-

HLA de bajo riesgo (+/-/-) no presentó ningún daño histológico en la biopsia. Todo ello, confirma la importancia de la correcta definición del perfil de anticuerpos anti-HLA en pacientes en lista de espera de trasplante renal.

Tabla 11. Evaluación del perfil de anticuerpos anti-HLA en pacientes hipersensibilizados trasplantados con resultado de CDC negativo y de FCXM positivo.

Caso	Tipaje HLA donante	Perfil (N/D/C1q)	Antígeno HLA con el perfil testado	Suero neto (MFI)	Suero dil (MFI)	Test C1q (MFI)	CDC	FCXM (Ratio ^a Suero neto)	Tipo de biopsia	Tiempo de la biopsia tras el trasplante	Resultado AbMR biopsia
RTR1	DRB1*07,*13 DQB1*02,*06	+ / - / -	DR13	DR13 Positivo (3010)	DR13 Negativo (532)	DR13 Negativo (390)	Negativo	Positivo (2,85)	Protocolo	13 meses	No
RTR2	DRB1*13,*17 DQB1*02,*06	+ / + / +	DQ6	DQ6 Positivo (3655)	DQ6 Positivo (3059)	DQ6 Positivo (3018)	Negativo	Positivo (9,55)	Indicación	2 meses	Sí
RTR3	DRB1*04,*16 DQB1*05,*08	+ / + / +	DQ8	DQ8 Positivo (11517)	DQ8 Positivo (10259)	DQ8 Positivo (15002)	Negativo	Positivo (3,7)	Indicación	1 mes	Sí
RTR4	DRB1*07,*08 DQB1*02,*04	- / + / +	DR7 DQ2	DR7 Negativo (726) DQ2 Negativo (1486)	DR7 Positivo (9457) DQ2 Positivo (11583)	DR7 Positivo (12765) DQ2 Positivo (9700)	Negativo	Positivo (4,91)	Indicación	3 meses	Sí
RTR	DRB1*07,*11 DQB1*02,*03	+ / + / +	DQ2 DQA1*03	DQA1*03 Positivo (7709)	DQA1*03 Positivo (3206)	DQA1*03 Positivo (6054)	Negativo	Positivo (5,57)	Indicación	18 días	Sí

RTR: receptor de trasplante renal; N/D/C1q: suero neto/suero diluido/test C1q; MFI: intensidad media de fluorescencia; CDC: citotoxicidad dependiente de complemento; FCXM: prueba cruzada por citometría de flujo; AbMR: rechazo mediado por anticuerpos

^a Cálculo del ratio: MFI suero/MFI control negativo (Se considera resultado positivo si ratio > 2)

V. *DISCUSIÓN*



En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha evaluado de manera prospectiva el papel de factores solubles implicados en la supervivencia y maduración de los linfocitos B, tales como BAFF y APRIL, y de poblaciones celulares como posibles biomarcadores implicados en el desarrollo de AbMR tras el trasplante renal. Así mismo, se ha analizado el efecto de las terapias de inducción empleadas en receptores de alto riesgo inmunológico, timoglobulina y basiliximab, en la modulación de la dinámica de las subpoblaciones celulares de linfocitos B. Por último, y de manera retrospectiva se han propuesto estrategias para la correcta definición del perfil de anticuerpos anti-HLA en pacientes hipersensibilizados. Para ello, se han incluidos dos series de pacientes. La primera de ellas es una serie prospectiva de pacientes con ERCA sometidos a trasplante de riñón en el HUMV entre 2015 y 2018. La segunda es una serie retrospectiva que incluye pacientes hipersensibilizados en lista de espera de trasplante renal del propio centro.

Cuando se habla de trasplante renal, se piensa en que se trata de la mejor alternativa para los pacientes con enfermedad renal terminal en comparación con el resto de técnicas de TRS, tanto en términos de supervivencia como de calidad de vida del paciente, tratándose además de la técnica de mayor coste-efectividad (158). Es por tanto, una opción terapéutica esperanzadora, en la que sin embargo, hay que estar siempre preparado y alerta para hacer frente a los posibles contratiempos, ya que detrás de un trasplante renal siempre existe el riesgo del rechazo. Por todo ello, buena parte de la investigación en trasplante se ha centrado en la búsqueda de nuevos biomarcadores que faciliten una detección precoz del rechazo.

En las últimas décadas, gracias al gran desarrollo de fármacos inmunosupresores, se ha conseguido reducir la tasa de rechazos mediados por células T, pero sin embargo, se ha puesto de manifiesto la necesidad de realizar avances en el tratamiento del AbMR, en el cual juegan un papel fundamental los linfocitos B, ya que maduran hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos anti-HLA. A día de hoy, el AbMR constituye una de las principales causas de pérdida del injerto renal, observándose que mientras que la supervivencia del mismo durante el primer año tras el trasplante ha mejorado significativamente, esta tasa no se mantiene con el paso del tiempo, sino que se observa

una reducción considerable, estimándose una pérdida aproximada del 5% en cada año que transcurre tras el trasplante (159).

Es importante destacar también la falta de una pauta de inmunosupresión estandarizada y universal para todos los pacientes, por lo que actualmente podemos encontrar gran cantidad de líneas de trabajo dedicadas a la búsqueda de biomarcadores que faciliten la individualización de los tratamientos inmunosupresores, permitiendo establecer un equilibrio entre eficacia y baja toxicidad. Destaca el estudio europeo BIODrIM, iniciado en 2015 y centrado en personalizar la minimización de la inmunosupresión mediante una estrategia basada en biomarcadores, donde tiene gran importancia la monitorización del sistema inmunitario, pero existen gran cantidad de ensayos basados en la cuantificación de poblaciones linfocitarias, así como de niveles de citocinas y otras moléculas del sistema inmunitario con dicho fin (160,161).

Tal y como se ha mencionado, la presencia de anticuerpos anti-HLA, especialmente de aquellos dirigidos frente a moléculas HLA del donante (DSA), constituye una de las características principales del AbMR. El efecto patogénico de estos anticuerpos se conoce desde la década de 1960, como consecuencia de la aparición de rechazos hiperagudos, especialmente en aquellos pacientes que recibieron transfusiones sanguíneas (162). Sin embargo, gracias al desarrollo de técnicas cada vez más precisas, como los ensayos de Luminex, se ha conseguido identificar de una mejor manera a aquellos pacientes sensibilizados, y que por tanto, poseen un mayor riesgo de desarrollar AbMR tanto clínico como subclínico, así como de pérdida del injerto (163). De hecho, la utilización de estas técnicas tanto en estudios retrospectivos como prospectivos ha demostrado una mayor probabilidad de fallo del injerto renal en pacientes que presentan DSA previos al trasplante (80,164), así como en aquellos que desarrollan DSA *de novo* tras el trasplante, a pesar del uso de tratamientos inmunosupresores (165). No obstante, la falta de consenso a la hora de establecer los puntos de corte a partir de los cuales considerar positivas las distintas especificidades de anticuerpos anti-HLA pone de manifiesto la necesidad de desarrollar estrategias que permitan una mejor definición del perfil de estos anticuerpos, especialmente en aquellos pacientes hipersensibilizados y que por consiguiente, tienen una menor

probabilidad de encontrar un donante compatible, para así poder determinar las especificidades clínicamente relevantes.

Existen diferentes situaciones en las que establecer como positiva o negativa una especificidad antigénica puede ser difícil, como ocurre en el caso de intensidades medias de fluorescencia (MFI) cuyos valores están próximos al punto de corte establecido. En estas situaciones, debe tenerse en cuenta la posible interferencia por diversos factores que puede dar lugar a resultados falsos positivos o falsos negativos. Entre las causas de los resultados falsos positivos destaca la reacción frente a antígenos HLA desnaturalizados, también denominados neoepítomos, los cuales se generan como consecuencia del proceso de fijación de estos antígenos HLA en la superficie de las microesferas. Para solucionar este problema se ha propuesto el tratamiento ácido de las microesferas (166,167). Los resultados falsos negativos pueden deberse a la potencial interacción del complemento con anticuerpos anti-HLA de isotipo IgG (168), lo cual puede solucionarse mediante el tratamiento térmico del suero o con EDTA (169). Además, una dilución adicional del suero puede ayudar a desenmascarar un efecto prozona (170,171) y por consiguiente evitar un resultado falso negativo. Así mismo, la detección tanto de anticuerpos con capacidad activadora como no activadora del complemento ha provocado un aumento de los resultados falsos positivos. Por todo ello, es necesario definir correctamente el perfil de anticuerpos anti-HLA en pacientes en lista de espera de trasplante, así como trasplantados.

En el presente trabajo, a pesar de la buena correlación existente entre las MFI detectadas al analizar el suero neto y el suero diluido se observa una reducción significativa del número de especificidades detectadas como positivas tras la dilución elevada del suero en pacientes hipersensibilizados, lo cual indica que el número de especificidades consideradas positivas puede estar sobreestimado, debido posiblemente a especificidades de anticuerpos anti-HLA presentes a título bajo. Para esclarecer el potencial riesgo de dichas especificidades, consideramos que es recomendable determinar la capacidad de los anticuerpos anti-HLA de activar el sistema del complemento, empleando, en nuestro caso, el test de C1q (164). A tenor de los resultados obtenidos en las tres condiciones analizadas (suero neto, diluido y test de C1q) proponemos la estratificación de las especificidades de anticuerpos anti-HLA y por

consiguiente, de los pacientes en función de una escala de riesgo, descrita en la Figura 36. (172) Dichos perfiles de riesgo bajo, moderado y alto fueron corroborados tras la realización de pruebas cruzadas tanto por CDC como por citometría de flujo. Además, como prueba de concepto, cinco de los pacientes incluidos en el estudio, a pesar de ser pacientes hipersensibilizados consiguieron trasplantarse. Cuatro de ellos presentaban un perfil de alto riesgo, mientras que el restante poseía un perfil de bajo riesgo. En todos los casos se llevó a cabo una biopsia, la cual demostró la existencia de AbMR en los cuatro pacientes con un perfil de alto riesgo. El paciente con un perfil de bajo riesgo, por el contrario, no presentó ningún signo de rechazo. No obstante, estos datos deben ser validados en cohortes más amplias de pacientes. Como limitación del presente trabajo debemos destacar el hecho de que la escala de riesgo únicamente fue elaborada mediante el análisis de especificidades antigénicas de clase I, a pesar de que se obtuvieron resultados similares cuando se analizaron las especificidades de clase II. Se decidió optar por este enfoque, ya que la interpretación del perfil de anticuerpos anti-HLA de clase I es más sencillo que el de clase II, donde debe tenerse en cuenta tanto la reacción frente a las cadenas alfa como beta de los diferentes antígenos (DR, DQ y DP).

El tiempo en lista de espera de trasplante renal de los pacientes hipersensibilizados es prolongado, por lo que la definición precisa de los antígenos HLA considerados como aceptables, con un perfil de bajo riesgo, es una prioridad para así conseguir minimizar el tiempo de espera hasta encontrar un donante compatible. Para ello, una mejor definición del perfil de anticuerpos anti-HLA mediante la dilución del suero y el empleo del test de fijación de complemento es esencial en aquellos pacientes hipersensibilizados que presentan un gran número de especificidades HLA a títulos bajos y no fijadoras de complemento, así como para la identificación del efecto prozona, responsable de resultados no deseados en la prueba cruzada virtual.

El estudio de anticuerpos dirigidos frente a moléculas no HLA, es un aspecto descrito en los pacientes trasplantados con sospecha de rechazo en los cuales no se detecta la presencia de anticuerpos anti-HLA. Sin embargo, su papel en pacientes hipersensibilizados no había sido evaluado. Un estudio llevado a cabo por nuestro grupo, demostró la presencia de anticuerpos dirigidos frente a GSTT-1 y LG3 en más del 50% de los pacientes hipersensibilizados, lo cual indica que la concurrencia de anticuerpos anti-

HLA y no anti-HLA en pacientes hipersensibilizados es frecuente, y su detección puede ayudar a la identificación de pacientes con un mayor riesgo de desarrollar AbMR (69).

Otro aspecto que también se ha evaluado ha sido la importancia de las incompatibilidades HLA, así como de *eplets* verificados por anticuerpos entre donante y receptor en el desarrollo de AbMR. Tradicionalmente, se han estudiado las incompatibilidades HLA a nivel antigénico, lo cual limita mucho el rango de posibles valores, por lo que cada día se utilizan más las incompatibilidades de *eplets*, es decir, de epítomos HLA reconocidos por las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anticuerpos. Al tener en cuenta ambas aproximaciones se observó que existe una buena correlación entre ellas en los distintos *loci* HLA.

Diversos estudios han demostrado que una mayor carga de incompatibilidades de *eplets* en *loci* HLA de clase II es un factor de riesgo para el desarrollo de AbMR (189–191), lo cual concuerda con los resultados obtenidos donde se observó que un aumento de incompatibilidades de *eplets* en el locus HLA-DRB1, así como en la suma de incompatibilidades de *eplets* de *loci* HLA de clase II se asocian con el desarrollo de AbMR subclínico en los pacientes trasplantados renales.

Es importante destacar también la escasez y falta de uniformidad en los resultados acerca del estudio de diferentes poblaciones linfocitarias, así como de factores solubles implicados en la supervivencia y diferenciación de las mismas, especialmente en el rechazo tras el trasplante renal. Concretamente, el papel de BAFF en el campo del trasplante es un tema controvertido, a diferencia de lo que ocurre en las enfermedades autoinmunes, donde la importancia de BAFF está consolidada. Está descrito que niveles séricos elevados de BAFF en pacientes con enfermedades autoinmunes se correlacionan con la severidad de la enfermedad (134–137), así como con los niveles de autoanticuerpos patogénicos (135,138,139).

Sin embargo, la importancia de los niveles de BAFF en pacientes trasplantados renales es un tema en el que hay cierta discrepancia, ya que hay autores que afirman que no existen diferencias en los niveles de esta molécula entre pacientes trasplantados y sujetos sanos (153) y por consiguiente, indicarían que no se trata de un marcador pronóstico para la disfunción del injerto. Así mismo, podemos encontrar estudios donde

se muestra que no existe una correlación entre los niveles de BAFF y la producción de DSA pre y post-trasplante (154). Por el contrario, diversas publicaciones muestran una asociación entre los niveles de BAFF y la supervivencia del injerto (173), el AbMR agudo, así como con la presencia de DSA (149,150,174). Del mismo modo, un metaanálisis publicado recientemente indica que la incidencia de AbMR es mayor en aquellos pacientes con niveles más elevados de BAFF (152). Esto nos lleva a pensar que BAFF puede estar generando una desregulación que promueve la expansión de linfocitos B alorreactivos

En lo que respecta al estudio de subpoblaciones celulares implicadas en el desarrollo de rechazo destaca el papel que desempeñan los linfocitos B, los cuales son capaces de orquestrar la respuesta inmunitaria humoral frente al órgano trasplantado, así como de inducir la activación de los linfocitos T actuando como APCs. Concretamente, las células responsables de generación de anticuerpos anti-HLA son tanto los linfocitos B memoria quiescentes como las células plasmáticas de vida larga. Las linfocitos B memoria quiescentes son capaces de reactivarse rápidamente tras una reexposición frente al aloantígeno, tal y como ocurre en individuos sensibilizados que son sometidos a un retrasplante y dando lugar a los DSA *de novo*. Las células plasmáticas de vida larga, por su parte, secretan anticuerpos anti-HLA de manera constitutiva permitiendo el mantenimiento a largo plazo de los DSA, pero no se movilizan tras una reexposición frente al aloantígeno. Un estudio publicado por nuestro grupo demostró un aumento pretrasplante del porcentaje de células B memoria con cambio de isotipo en aquellos pacientes que desarrollaron rechazo agudo tras el trasplante renal (175).

Al igual que en el caso de las células T reguladoras (Tregs), las cuales juegan un papel destacado limitando la aparición de rechazo tras el trasplante renal y promoviendo mecanismos de tolerancia inmunológica, lo cual ha hecho que su monitorización pueda ser un biomarcador para determinar la supervivencia del injerto (176), otro tipo celular con una importancia cada vez mayor en los mecanismos inmunomoduladores son las denominadas células B reguladoras (Bregs). Se trata de células con capacidad supresora y por consiguiente, de promoción de tolerancia inmunológica, las cuales pueden generarse a partir de diferentes estadios de maduración y desarrollo de los linfocitos B, tales como las células B transicionales (177), las células B memoria (178) o los

plasmablastos (179) y se caracterizan por la producción de IL-10. Al contrario de lo que ocurre en los pacientes trasplantados renales que sufren episodios de rechazo del injerto, los individuos tolerantes presentan niveles aumentados de células B transicionales con un fenotipo regulador, así como de linfocitos B naïve y niveles disminuidos de células B memoria (180). Del mismo modo, se ha observado que los pacientes con una mayor supervivencia del injerto renal (181), al igual que aquellos con menor número de episodios de rechazo (182), presentan mayores niveles de células B transicionales productoras de IL-10, por lo que ha propuesto que este subtipo celular puede convertirse en un biomarcador de evolución del injerto renal.

Además, la mayoría de trabajos que analizan el papel de BAFF y de las subpoblaciones celulares son estudios transversales en los cuales no se puede apreciar la dinámica de dichos marcadores.

En base a estos resultados, en el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha evaluado de manera conjunta y prospectiva el papel de BAFF y de las subpoblaciones de linfocitos B y T en el rechazo mediado por anticuerpos en pacientes trasplantados renales (183).

Se ha observado que los pacientes que desarrollan AbMR durante los primeros 12 meses tras el trasplante presentan un aumento de los niveles de BAFF pretrasplante, lo cual indica que la determinación de dichos niveles puede constituir un biomarcador no invasivo para la predicción del desarrollo de AbMR, independientemente del resto de variables clásicamente relacionadas con su desarrollo, tales como la presencia de anticuerpos anti-HLA, DSA, el número de trasplantes previos y de incompatibilidades HLA, el tiempo de isquemia fría o la función retrasada del injerto. Concretamente, cada aumento de 100 pg/mL de los niveles de BAFF pretrasplante supone un incremento de 1,35 veces el riesgo de AbMR durante el primer año post-trasplante. Este riesgo es más importante en aquellos pacientes que presentan niveles más elevados de BAFF, especialmente en aquellos con valores superiores a 782,03 pg/mL, los cuales poseen alrededor de siete veces más riesgo. Los niveles séricos de BAFF permanecen aumentados a los 6, 12 y 24 meses tras el trasplante en los pacientes con AbMR subclínico, detectado en la biopsia de protocolo realizada al año del trasplante. Este hecho es importante, ya que determinados autores afirman que mientras que los niveles de BAFF pretrasplante se asocian significativamente con la aparición de rechazo, los

niveles de BAFF post-trasplante no se encuentran asociados con el rechazo del injerto (146).

El aumento de los niveles de BAFF puede estar asociado con una desregulación del microambiente, promoviendo así la expansión y activación de linfocitos B alorreactivos, con lo que se favorece el desarrollo de AbMR. Se aprecia que los pacientes que desarrollan AbMR, ya sea clínico o subclínico, presentan una distribución característica de las subpoblaciones de linfocitos B, donde destaca la polarización hacia un fenotipo memoria, con la consiguiente disminución de células B naïve y aumento de las células B memoria, así como una reducción de las células B transicionales, tradicionalmente descritas como células con capacidad reguladora. Dicho aumento del número de células B memoria se correlaciona con la mayor presencia de anticuerpos anti-HLA en los pacientes con AbMR, los cuales también poseen niveles más elevados de BAFF, citocina que contribuye a la supervivencia y diferenciación de los linfocitos B maduros.

Un aspecto a destacar y que no se ha evaluado, constituyendo así una limitación del presente trabajo, consiste en la importancia de los niveles de linfocitos T foliculares cooperadores (Tfh). Estas células cooperan con los linfocitos B y son necesarias para que éstos proliferen, se diferencien y maduren hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos. Se ha descrito la existencia de un subtipo de linfocitos Tfh denominado Tfh circulantes, los cuales proceden de la migración de las Tfh presentes en los órganos linfoides secundarios tras entrar en contacto con las células dendríticas, a los tejidos diana, favoreciendo la generación de anticuerpos (184). Dado que los anticuerpos anti-HLA constituyen el biomarcador principal del AbMR y estas células están implicadas en su generación, su monitorización puede ser también un biomarcador de utilidad para la predicción del desarrollo de AbMR, tratándose además de una potencial diana para el tratamiento del AbMR (185). Un estudio publicado recientemente en pacientes trasplantados renales, ha demostrado la presencia de niveles aumentados de linfocitos Tfh circulantes pretrasplante en aquellos pacientes que han estado en contacto con aloantígenos, ya sea por poseer un trasplante previo, recibir transfusiones sanguíneas o presentar anticuerpos anti-HLA. Así mismo, los linfocitos Tfh circulantes se encuentran asociados con la generación de anticuerpos anti-HLA *de novo*, así como con el desarrollo

de rechazo agudo tras el trasplante renal, lo cual demuestra su implicación en la sensibilización HLA y en la aparición de rechazo (186).

A pesar de que en la presente Tesis Doctoral no se ha encontrado una asociación entre los niveles de APRIL y el desarrollo de AbMR, sí que está descrita su implicación en otros procesos que conducen a la pérdida del injerto renal, entre los que destaca la recurrencia de la nefropatía IgA. Tras el AbMR, la recurrencia de las enfermedades glomerulares, especialmente de la nefropatía IgA, es la principal causa de fallo del injerto (187). Un estudio publicado recientemente muestra que aquellos pacientes trasplantados renales que poseen niveles elevados de APRIL a los 6 meses tras el trasplante, así como un aumento de los niveles medios de dicha citocina entre los 6 meses y los 3 años post-trasplante, tienen un mayor riesgo de recurrencia de la nefropatía IgA (188).

Además del estudio de las subpoblaciones celulares y de factores solubles implicados en el desarrollo de AbMR, es importante analizar el efecto de las terapias de inducción en la dinámica de dichas poblaciones linfocitarias. El uso de terapias de inducción con antagonistas del receptor de IL-2 como basiliximab, o con agentes deplecionantes de linfocitos como la timoglobulina, es un procedimiento recomendado como parte del tratamiento inmunosupresor inicial en pacientes sometidos a trasplante renal con el objetivo de modular o deplecionar la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T tras el reconocimiento del aloantígeno. Este tipo de tratamientos contribuyen a la reducción de la tasa de rechazo agudo, mejorando además la supervivencia del injerto en comparación con el uso de placebo, la cual también aumenta en comparación con los pacientes que no reciben terapia de inducción, especialmente en aquellos pacientes de alto riesgo (192,193).

Entre los agentes deplecionantes, la timoglobulina es el fármaco más utilizado en Estados Unidos y el segundo más frecuente en Europa y Australia (38,194). Las diferencias en las tasas de prescripción observadas en los diferentes países y dentro de cada país en los diferentes centros, son indicativas de la inexistencia de protocolos universales establecidos sobre el tratamiento de inducción a utilizar en los distintos receptores de trasplante renal. No obstante, existe cierto consenso y además las guías

clínicas así lo indican, acerca de la utilización de timoglobulina en los pacientes con mayor riesgo de rechazo o con una presumible función retrasada del injerto (7,195).

Tal y como se ha comentado, la respuesta inmunitaria humoral frente al órgano trasplantado ha ganado importancia en la última década y por ello, nos planteamos si la terapia de inducción puede afectar en este proceso, ya que concretamente la timoglobulina se utiliza para la prevención y tratamiento del AbMR, puesto que se ha observado que contribuye a la reducción de los DSA en pacientes sometidos a trasplante renal y cardíaco (47,196,197). Además, la timoglobulina es considerada el agente fundamental implicado en la promoción de tolerancia tanto en modelos animales (198,199) como en humanos (200–202).

A pesar de que su principal mecanismo de acción consiste en la depleción de los linfocitos T, también está descrita su interacción con otros tipos celulares tanto del sistema inmunitario como no inmunitario, tales como los linfocitos B, las células NK, o las células endoteliales (43). Estudios *in vitro* muestran la capacidad de la timoglobulina para promover mecanismos de apoptosis independientes de complemento tanto en células B naïve, activadas, así como en células plasmáticas. Esto se debe a que la timoglobulina se produce tras la inmunización de conejos con células tímicas humanas entre las que se encuentran aunque en un porcentaje minoritario linfocitos B y células plasmáticas. Como consecuencia de ello, la timoglobulina contiene anticuerpos específicos dirigidos frente a marcadores de superficie presentes en estos tipos celulares, como por ejemplo frente a CD138, un marcador específico de células plasmáticas. (203,204). Sin embargo, no está bien descrito su papel *in vivo* sobre las diferentes subpoblaciones de linfocitos B en humanos, incluyendo las células plasmáticas (205), por lo que en el presente trabajo decidimos analizar la dinámica de las subpoblaciones de linfocitos B y de las células plasmáticas en pacientes que recibieron terapia de inducción con timoglobulina y compararla con aquellos que recibieron inducción con basiliximab o que no recibieron tratamiento de inducción alguno.

Nuevamente, vuelve a existir una controversia entre los autores que defienden que el uso de timoglobulina provoca una depleción de los linfocitos B o de las subpoblaciones de linfocitos B, especialmente en los meses iniciales (206–208) y los que no encuentran

cambios significativos (209,210). Estas diferencias pueden deberse a las características de los pacientes trasplantados incluidos en los diferentes estudios, a las dosis de timoglobulina empleadas, a los diferentes tiempos empleados para la toma de muestras, así como a variaciones en la cantidad de antígenos característicos de linfocitos B presentes en los distintos lotes empleados para la producción de timoglobulina.

En esta Tesis Doctoral se observó, tal y como está descrito, una depleción de los linfocitos T en aquellos pacientes que recibieron timoglobulina como terapia de inducción, la cual no se observó en los pacientes tratados con basiliximab ni en aquellos que no recibieron tratamiento alguno. Por el contrario, los números absolutos de linfocitos B permanecieron estables. Al hacer hincapié en el efecto de la timoglobulina sobre las subpoblaciones de linfocitos B, se detectó un descenso de los niveles de células B memoria con cambio de isotipo a los 6 y 12 meses tras el trasplante en aquellos pacientes que recibieron timoglobulina. Del mismo modo, cuando se analizaron los niveles de células plasmáticas circulantes también se detectó un descenso de las mismas en los pacientes tratados con timoglobulina, pero a diferencia del caso anterior, éste no tuvo lugar de manera temprana, sino a los 12 meses post-trasplante. Por consiguiente, podemos afirmar que la timoglobulina induce una depleción tardía de las células plasmáticas, la cual no había sido descrita hasta la fecha (211).

Los potenciales mecanismos implicados en este hallazgo todavía se desconocen. No obstante, está descrito que la timoglobulina puede provocar una depleción tardía de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, a pesar de no existir niveles detectables del fármaco en circulación (212). Un mecanismo similar podría estar ocurriendo en el caso de las células plasmáticas. Así mismo, la modificación de la reconstitución de las subpoblaciones de linfocitos T provocada por la timoglobulina, también afecta a los linfocitos Tfh, los cuales tienen un papel fundamental en el desarrollo y supervivencia de las células plasmáticas (213). De este modo, una depleción de los linfocitos Tfh podría promover una reducción tardía de las células plasmáticas.

El descenso de los niveles de células plasmáticas causado por el uso de timoglobulina como agente de inducción puede ayudar a explicar su contribución en la reducción de la aparición de DSA tras el trasplante renal, ya que es este tipo celular el responsable de su origen y por consiguiente, su papel en la reducción del riesgo de AbMR. Además, esta

V. Discusión

disminución del número de células plasmáticas, ha sido relacionada por otros autores con una situación de tolerancia en pacientes trasplantados renales con una función estable del injerto sin necesidad de inmunosupresión (214).

Para concluir y resumiendo los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral, podemos afirmar que los pacientes con niveles elevados de BAFF y una polarización de las subpoblaciones de linfocitos B hacia un fenotipo de células memoria tienen un mayor riesgo de desarrollar AbMR. Además, el descenso de los niveles de células plasmáticas como consecuencia de la utilización de timoglobulina como tratamiento inducción puede ayudar a minimizar su aparición. Así mismo, la definición exhaustiva del perfil de anticuerpos anti-HLA en pacientes hipersensibilizados en lista de espera de trasplante renal es fundamental para aumentar las posibilidades de un futuro trasplante, disminuyendo el riesgo de aparición de rechazo del injerto.

VI. CONCLUSIONES





1. Los niveles de BAFF pretrasplante se encuentran aumentados en pacientes trasplantados renales que desarrollan un rechazo mediado por anticuerpos durante los primeros 12 meses tras el trasplante.
2. La distribución pretrasplante de las subpoblaciones de linfocitos B en pacientes sometidos a un trasplante de riñón con rechazo clínico mediado por anticuerpos se encuentra alterada, observándose un descenso de las células transicionales y un aumento de las subpoblaciones con un fenotipo de células memoria.
3. La determinación de los niveles de BAFF pretrasplante, así como el estudio de las subpoblaciones de linfocitos B en pacientes trasplantados renales constituyen dos biomarcadores no invasivos para la predicción y diagnóstico del rechazo clínico mediado por anticuerpos.
4. La monitorización post-trasplante de los niveles de BAFF, así como de las subpoblaciones de linfocitos B permite identificar a aquellos pacientes con rechazo subclínico mediado por anticuerpos.
5. El uso de timoglobulina como tratamiento de inducción en pacientes trasplantados renales provoca un descenso tardío del número de células plasmáticas, lo cual contribuye a reducir el riesgo de rechazo mediado por anticuerpos.
6. El estudio de incompatibilidades de *eplets* verificadas por anticuerpos entre donante y receptor de trasplante renal proporciona un valor añadido en el estudio del rechazo mediado por anticuerpos.
7. La mejora técnica en el estudio del perfil de anticuerpos anti-HLA incluyendo una escala de riesgo en pacientes hipersensibilizados renales aumenta las posibilidades de trasplante en este tipo de pacientes, reduciendo el riesgo de aparición de rechazo mediado por anticuerpos.



VII. BIBLIOGRAFÍA



1. Zhang QL, Rothenbacher D. Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: Systematic review. *BMC Public Health*. 2008;8.
2. González AO, de Francisco A, Gayoso P, García F. Prevalence of chronic renal disease in Spain: Results of the EPIRCE study. *Nefrología*. 2010;30(1):78–86.
3. Gorostidi M, Sánchez-Martínez M, Ruilope LM, Graciani A, de la Cruz JJ, Santamaría R, et al. Prevalencia de enfermedad renal crónica en España: impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular. *Nefrología*. 2018 Nov;38(6):606–15.
4. Informes | Registro de Enfermos Renales | <http://www.registrorenal.es/informes/> [Internet]. [cited 2020 Feb 26]. Available from: <http://www.registrorenal.es/informes/>
5. Conde Olasagasti JL, Garcia Diaz JE, Carrasco Benitez P, Mareque Ruiz MÁ, Parras Partido MP, Moreno Alia I, et al. Análisis de costes del programa integrado de tratamiento renal sustitutivo en la provincia de Toledo (2012-2013). *Nefrología*. 2017 May;37(3):285–92.
6. Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: Approaches and initiatives - A position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. In: *Kidney International*. 2007. p. 247–59.
7. Special Issue: KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2009 Nov;9:S1–155.
8. Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, Fernández-Fresnedo G, Galcerán JM, Goicoechea M, et al. Documento de la sociedad española de nefrología sobre las guías KDIGO para la evaluación y el tratamiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrología*. 2014;34(3):302–16.
9. Memorias - Actividad de Donación y Trasplante Renal 2018 [Internet]. [cited 2020 Feb 26]. Available from: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Forms/AllItems.aspx>

VII. Bibliografía

10. Ferguson TW, Tangri N, Rigatto C, Komenda P. Cost-effective treatment modalities for reducing morbidity associated with chronic kidney disease. Vol. 15, Expert Review of Pharmacoeconomics and Outcomes Research. Expert Reviews Ltd.; 2015. p. 243–52.
11. Informe de Diálisis y Trasplante. 2018.
12. Elliott DE, Siddique SS, Weinstock J V. Innate immunity in disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2014;12(5):749–55.
13. Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 1989. p. 1–13.
14. Matzinger P. The danger model: A renewed sense of self. Vol. 296, Science. 2002. p. 301–5.
15. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2 SUPPL. 2).
16. Ochando J, Fayad ZA, Madsen JC, Netea MG, Mulder WJM. Trained immunity in organ transplantation. Am J Transplant [Internet]. 2020 Jan 28 [cited 2020 Feb 1];20(1):10–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ajt.15620>
17. Mazza C, Malissen B. What guides MHC-restricted TCR recognition? Vol. 19, Seminars in Immunology. 2007. p. 225–35.
18. Sánchez-Fueyo A, Domenig CM, Mariat C, Alexopoulos S, Zheng XX, Strom TB. Influence of direct and indirect allorecognition pathways on CD4 +CD25+ regulatory T-cell function in transplantation. Transpl Int. 2007 Jun;20(6):534–41.
19. Lin CM, Gill RG. Direct and indirect allograft recognition: Pathways dictating graft rejection mechanisms. Vol. 21, Current Opinion in Organ Transplantation. Lippincott Williams and Wilkins; 2016.
20. Klein JAN, Sato A. The HLA system: First of two parts. Vol. 343, New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society; 2000. p. 702–9.

21. Klein J, Sato A. Advances in immunology: The HLA system (Second of two parts). Vol. 343, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2000. p. 782–6.
22. Fleury SG, Croteau G, Sékaly RP. CD4 and CD8 recognition of class II and class I molecules of the major histocompatibility complex. *Semin Immunol* [Internet]. 1991 May [cited 2020 Feb 1];3(3):177–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1909595>
23. Foster BJ, Dahhou M, Zhang X, Platt RW, Hanley JA. Relative importance of HLA mismatch and donor age to graft survival in young kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2013;96(5):469–75.
24. Williams RC, West LJ, Opelz G. The risk of failure With HLA mismatch and recipient age in first pediatric (<18 years) kidney transplants. *Transplant Direct*. 2018 Jul 1;4(7).
25. Williams RC, Opelz G, Weil EJ, McGarvey CJ, Chakkerla HA. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts 2. *Transplant Direct*. 2017 May;3(5):e152.
26. Shi X, Lv J, Han W, Zhong X, Xie X, Su B, et al. What is the impact of human leukocyte antigen mismatching on graft survival and mortality in renal transplantation? A meta-analysis of 23 cohort studies involving 486,608 recipients. *BMC Nephrol* [Internet]. 2018 Dec 18 [cited 2020 Feb 1];19(1):116. Available from: <https://bmcnephrol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12882-018-0908-3>
27. Tambur AR. HLA-Epitope Matching or Eplet Risk Stratification: The Devil Is in the Details [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in immunology*. NLM (Medline); 2018 [cited 2020 Mar 3]. p. 2010. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30233594>
28. Thiel M, Wolfs MJ, Bauer S, Wenning AS, Burckhart T, Schwarz EC, et al. Efficiency of T-cell costimulation by CD80 and CD86 cross-linking correlates with calcium entry. *Immunology*. 2010;129(1):28–40.

VII. Bibliografia

29. Hodi FS. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4. Vol. 13, *Clinical Cancer Research*. 2007. p. 5238–42.
30. Heesters BA, van der Poel CE, Das A, Carroll MC. Antigen Presentation to B Cells. Vol. 37, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2016. p. 844–54.
31. Matas AJ, Burke JF, DeVault GA, Monaco A, Pirsch JD. Chronic rejection. *J Am Soc Nephrol*. 1994;4(8).
32. Allison AC. Immunosuppressive drugs: The first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology*. 2000;47(2–3):63–83.
33. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. Vol. 56, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2005. p. 23–46.
34. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. Vol. 351, *New England Journal of Medicine*. 2004. p. 2715–29.
35. Lim MA, Kohli J, Bloom RD. Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going? Vol. 31, *Transplantation Reviews*. W.B. Saunders; 2017. p. 10–7.
36. Coemans M, Süsal C, Döhler B, Anglicheau D, Giral M, Bestard O, et al. Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int*. 2018 Nov 1;94(5):964–73.
37. ERA-EDTA Annual Report 2018 [Internet]. [cited 2020 Jan 21]. Available from: https://www.era-edta.org/annual_report2018.html
38. Hardinger KL, Brennan DC, Klein CL. Selection of induction therapy in kidney transplantation. Vol. 26, *Transplant International*. 2013. p. 662–72.
39. Thervet É, Zuber J, Sberro R, Canaud G, Anglicheau D, Snanoudj R, et al. Immunosuppressive treatments: Mechanisms of action and clinical use. Vol. 7, *Nephrologie et Therapeutique*. Elsevier Masson SAS; 2011. p. 566–81.
40. Vanichanan J, Udomkarnjananun S, Avihingsanon Y, Jutivorakool K. Common viral infections in kidney transplant recipients. Vol. 37, *Kidney Research and Clinical*

- Practice. The Korean Society of Nephrology; 2018. p. 323–37.
41. Rama I, Grinyó JM. Malignancy after renal transplantation: The role of immunosuppression. Vol. 6, *Nature Reviews Nephrology*. 2010. p. 511–9.
 42. Brakemeier S, Kannenkeril D, Dürr M, Braun T, Bachmann F, Schmidt D, et al. Experience with belatacept rescue therapy in kidney transplant recipients. *Transpl Int* [Internet]. 2016 Nov [cited 2020 Feb 1];29(11):1184–95. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tri.12822>
 43. Bamoulid J, Crépin T, Courivaud C, Rebibou JM, Saas P, Ducloux D. Antithymocyte globulins in renal transplantation—from lymphocyte depletion to lymphocyte activation: The doubled-edged sword. Vol. 31, *Transplantation Reviews*. W.B. Saunders; 2017. p. 180–7.
 44. Brennan DC, Daller JA, Lake KD, Cibrik D, Del Castillo D. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2006 Nov 9;355(19):1967–77.
 45. Noël C, Abramowicz D, Durand D, Mourad G, Lang P, Kessler M, et al. Daclizumab versus antithymocyte globulin in high-immunological-risk renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(6):1385–92.
 46. Brennan DC, Schnitzler MA. Long-term results of rabbit antithymocyte globulin and basiliximab induction. Vol. 359, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2008. p. 1736–8.
 47. Brokhof MM, Sollinger HW, Hager DR, Muth BL, Pirsch JD, Fernandez LA, et al. Antithymocyte globulin is associated with a lower incidence of de novo donor-specific antibodies in moderately sensitized renal transplant recipients. *Transplantation*. 2014 Mar 27;97(6):612–7.
 48. Longuet H, Sautenet B, Gatault P, Thibault G, Barbet C, Marliere JF, et al. Risk factors for impaired CD4+ T-cell reconstitution following rabbit antithymocyte globulin treatment in kidney transplantation. *Transpl Int*. 2014 Mar;27(3):271–9.
 49. Mourad G, Rostaing L, Legendre C, Garrigue V, Thervet E, Durand D. Sequential

VII. Bibliografía

- protocols using basiliximab versus antithymocyte globulins in renal-transplant patients receiving mycophenolate mofetil and steroids. *Transplantation* [Internet]. 2004 Aug 27 [cited 2020 Feb 2];78(4):584–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15446319>
50. Couvrat-Desvergues G, Salama A, Le Berre L, Evanno G, Viklicky O, Hrubá P, et al. Rabbit antithymocyte globulin-induced serum sickness disease and human kidney graft survival. *J Clin Invest*. 2015 Dec 1;125(12):4655–65.
 51. Lim WH, Turner RM, Chapman JR, Ma MKM, Webster AC, Craig JC, et al. Acute rejection, T-cell-depleting antibodies, and cancer after transplantation. *Transplantation*. 2014 Apr 27;97(8):817–25.
 52. Hertig A, Zuckermann A. Rabbit antithymocyte globulin induction and risk of post-transplant lymphoproliferative disease in adult and pediatric solid organ transplantation: An update. Vol. 32, *Transplant Immunology*. Elsevier; 2015. p. 179–87.
 53. Jin MK, Cho JH, Kwon O, Hong KD, Choi JY, Yoon SH, et al. Successful kidney transplantation after desensitization using plasmapheresis, low-dose intravenous immunoglobulin, and rituximab in highly sensitized patients: A single-center experience. In: *Transplantation Proceedings* [Internet]. 2012 [cited 2020 Feb 19]. p. 200–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22310614>
 54. Rufino Hernández JM, Cabello Moya E, González-Posada JM, Hernández Marrero D, Pérez Tamajón L, Marrero Miranda D, et al. Induction treatment by combining immunoglobulins, plasmapheresis and rituximab in hypersensitive patients receiving cadaveric renal allograft. *Nefrología* [Internet]. 2010 [cited 2020 Feb 19];30(2):252–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20098463>
 55. Rocha PN, Butterly DW, Greenberg A, Reddan DN, Tuttle-Newhall J, Collins BH, et al. Beneficial effect of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin on renal allograft survival of patients with acute humoral rejection. *Transplantation* [Internet]. 2003 May 15 [cited 2020 Feb 19];75(9):1490–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12792502>

56. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* [Internet]. 2012 Feb [cited 2018 Sep 23];12(2):388–99. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-6143.2011.03840.x>
57. Halloran PF, Reeve JP, Pereira AB, Hidalgo LG, Famulski KS. Antibody-mediated rejection, T cell-mediated rejection, and the injury-repair response: New insights from the Genome Canada studies of kidney transplant biopsies. Vol. 85, *Kidney International*. Nature Publishing Group; 2014. p. 258–64.
58. Furness PN, Philpott CM, Chorbajian MT, Nicholson ML, Bosmans JL, Corthouts BL, et al. Protocol biopsy of the stable renal transplant: A multicenter study of methods and complication rates. *Transplantation*. 2003 Sep 27;76(6):969–73.
59. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation* [Internet]. 1995 Feb 27 [cited 2020 Feb 3];59(4):511–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878755>
60. Rush D. Protocol biopsies for renal transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl* [Internet]. 2010 Jan [cited 2020 Feb 3];21(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20061686>
61. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. 1993;44(2):411–22.
62. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, et al. Antibody-mediated rejection criteria - An addition to the Banff '97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant*. 2003 Jun;3(6):708–14.
63. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative

VII. Bibliografía

- endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant* [Internet]. 2018 Feb [cited 2018 Sep 23];18(2):293–307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29243394>
64. Halloran PF, Chang J, Famulski K, Hidalgo LG, Salazar IDR, Lopez MM, et al. Disappearance of T cell-mediated rejection despite continued antibody-mediated rejection in late kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Jul 1;26(7):1711–20.
65. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-mediated rejection of solid-organ allografts. Vol. 379, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2018. p. 1150–60.
66. Sánchez-Zapardiel E, Castro-Panete MJ, Castillo-Rama M, Morales P, Lora-Pablos D, Valero-Hervás D, et al. Harmful effect of preformed anti-MICA antibodies on renal allograft evolution in early posttransplantation period. *Transplantation*. 2013 Jul 15;96(1):70–8.
67. Delville M, Lamarthée B, Pagie S, See SB, Rabant M, Burger C, et al. Early acute microvascular kidney transplant rejection in the absence of anti-HLA antibodies is associated with preformed IgG antibodies against diverse glomerular endothelial cell antigens. *J Am Soc Nephrol*. 2019 Apr 1;30(4):692–709.
68. Sánchez-Zapardiel E, Mancebo E, Díaz-Ordoñez M, de Jorge-Huerta L, Ruiz-Martínez L, Serrano A, et al. Isolated De Novo Antiendothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection. *Am J Kidney Dis*. 2016 Dec 1;68(6):933–43.
69. Riesco L, Irure J, Rodrigo E, Guiral S, Ruiz JC, Gómez J, et al. Anti-perlecan antibodies and acute humoral rejection in hypersensitized patients without forbidden HLA specificities after kidney transplantation. *Transpl Immunol* [Internet]. 2019 Feb [cited 2019 Oct 14];52:53–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966327418300972>
70. Mengel M, Husain S, Hidalgo L, Sis B. Phenotypes of antibody-mediated rejection in organ transplants. *Transpl Int* [Internet]. 2012 Jun [cited 2020 Feb 3];25(6):611–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432->

2277.2012.01484.x

71. Williams GM, Hume DM, Hudson RP, Morris PJ, Kano K, Milgrom F. "Hyperacute" renal-homograft rejection in man. *N Engl J Med*. 1968;279(12):611–8.
72. Loupy A, Hill GS, Suberbielle C, Charron D, Anglicheau D, Zuber J, et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am J Transplant*. 2011 Jan;11(1):56–65.
73. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates Antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant*. 2009 Oct;9(10):2312–23.
74. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, Fieberg AM, Leduc R, Cosio FC, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation [Internet]*. 2010 Jul 15 [cited 2019 Nov 25];90(1):68–74. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00007890-201007150-00011>
75. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. Vol. 8, *Nature Reviews Nephrology*. 2012. p. 348–57.
76. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969;280(14):735–9.
77. Ilham MA, Winkler S, Coates E, Rizzello A, Rees TJ, Asderakis A. Clinical Significance of a Positive Flow Crossmatch on the Outcomes of Cadaveric Renal Transplants. *Transplant Proc*. 2008 Jul;40(6):1839–43.
78. Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, et al. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *J Am Soc Nephrol [Internet]*. 2001 Dec [cited 2020 Feb 4];12(12):2807–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11729251>
79. Tait BD. Detection of HLA antibodies in organ transplant recipients - triumphs and

VII. Bibliografía

- challenges of the solid phase bead assay. Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation; 2016.
80. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Van Huyen JPD, 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 Jan 1;27(1):293–304.
81. Zhang R. Donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. Vol. 13, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2018. p. 182–92.
82. Valenzuela NM, Schaub S. The biology of IgG subclasses and their clinical relevance to transplantation [Internet]. Vol. 102, *Transplantation*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018 [cited 2020 Feb 7]. p. S7–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29266057>
83. López Hoyos M RSMJSSADRCE. Inmunobiología del Trasplante. Estudios inmunológicos del donante y del receptor del trasplante renal | *Nefrología al día* [Internet]. [cited 2020 Feb 7]. Available from: <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-inmunobiologia-del-trasplante-estudios-inmunologicos-146>
84. Sethi S, Choi J, Toyoda M, Vo A, Peng A, Jordan SC. Desensitization: Overcoming the Immunologic Barriers to Transplantation. Vol. 2017, *Journal of Immunology Research*. Hindawi Publishing Corporation; 2017.
85. Wan SS, Ying TD, Wyburn K, Roberts DM, Wyld M, Chadban SJ. The treatment of antibody-mediated rejection in kidney transplantation: An updated systematic review and meta-analysis. Vol. 102, *Transplantation*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018. p. 557–68.
86. Prendergast MB, Gaston RS. Optimizing medication adherence: An ongoing opportunity to improve outcomes after kidney transplantation. Vol. 5, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2010. p. 1305–11.
87. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: A human perspective. Vol.

- 10, Cell Stem Cell. 2012. p. 120–36.
88. Meffre E, Milili M, Blanco-Betancourt C, Antunes H, Nussenzweig MC, Schiff C. Immunoglobulin heavy chain expression shapes the B cell receptor repertoire in human B cell development. *J Clin Invest.* 2001;108(6):879–86.
89. Van Zelm MC, Szczepański T, Van Der Burg M, Van Dongen JJM. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med.* 2007 Mar 19;204(3):645–55.
90. Lewis SM. The mechanism of V(D)J joining: Lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. Vol. 56, *Advances in Immunology.* Academic Press Inc.; 1994. p. 27–150.
91. van Zelm MC, van der Burg M, de Ridder D, Barendregt BH, de Haas EFE, Reinders MJT, et al. Ig Gene Rearrangement Steps Are Initiated in Early Human Precursor B Cell Subsets and Correlate with Specific Transcription Factor Expression. *J Immunol.* 2005 Nov 1;175(9):5912–22.
92. Radic MZ, Zouali M. Receptor editing, immune diversification, and self-tolerance. Vol. 5, *Immunity.* Cell Press; 1996. p. 505–11.
93. Sandel PC, Monroe JG. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity.* 1999;10(3):289–99.
94. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology.* Nature Publishing Group; 2017. p. 281–94.
95. Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG, et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science (80-).* 2001 Sep 14;293(5537):2108–11.
96. Mihalcik SA, Huddleston PM, Wu X, Jelinek DF. The Structure of the TNFRSF13C Promoter Enables Differential Expression of BAFF-R during B Cell Ontogeny and Terminal Differentiation. *J Immunol.* 2010 Jul 15;185(2):1045–54.
97. Cyster JG. B cell follicles and antigen encounters of the third kind. Vol. 11, *Nature*

VII. Bibliografía

- Immunology. 2010. p. 989–96.
98. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, et al. Human peripheral blood B-Cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. Vol. 78, Cytometry Part B - Clinical Cytometry. 2010.
 99. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, et al. Circulating human b and plasma cells. age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138 plasma cells. *Haematologica*. 2010 Jun;95(6):1016–20.
 100. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol*. 2005 Apr;23(1):487–513.
 101. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*. 1998 Nov 2;188(9):1679–89.
 102. Mackay F, Browning JL. BAFF: A fundamental survival factor for B cells. Vol. 2, *Nature Reviews Immunology*. 2002. p. 465–75.
 103. Schneider P, Mackay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*. 1999 Jun 7;189(11):1747–56.
 104. López-Fraga M, Fernández R, Albar JP, Hahne M. Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep [Internet]*. 2001 Oct [cited 2020 Feb 27];2(10):945–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11571266>
 105. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: A Tutorial on B Cell Survival. *Annu Rev Immunol [Internet]*. 2003 Apr [cited 2019 Nov 25];21(1):231–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427767>
 106. Hengeveld PJ, Kersten MJ. B-cell activating factor in the pathophysiology of

- multiple myeloma: a target for therapy? *Blood Cancer J* [Internet]. 2015 Feb 27 [cited 2018 Sep 23];5(2):e282–e282. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25723853>
107. Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):198–204.
 108. Weldon AJ, Moldovan I, Cabling MG, Hernandez EA, Hsu S, Gonzalez J, et al. Surface APRIL is elevated on myeloid cells and is associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2015 May 1;42(5):749–59.
 109. Varfolomeev E, Kischkel F, Martin F, Seshasayee D, Wang H, Lawrence D, et al. APRIL-Deficient Mice Have Normal Immune System Development. *Mol Cell Biol*. 2004 Feb 1;24(3):997–1006.
 110. Yeramilli VA, Knight KL. Requirement for BAFF and APRIL during B Cell Development in GALT. *J Immunol*. 2010 May 15;184(10):5527–36.
 111. Hahne M, Kataoka T, Schröter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer JL, et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med*. 1998 Sep 21;188(6):1185–90.
 112. Ferrer G, Hodgson K, Montserrat E, Moreno C. B cell activator factor and a proliferation-inducing ligand at the cross-road of chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity. Vol. 50, *Leukemia and Lymphoma*. 2009. p. 1075–82.
 113. Smulski CR, Eibel H. BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Jan 27];9:2285. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30349534>
 114. Vigolo M, Chambers MG, Willen L, Chevalley D, Maskos K, Lammens A, et al. A loop region of BAFF controls B cell survival and regulates recognition by different inhibitors. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 23 [cited 2019 Dec 11];9(1):1199. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29572442>
 115. Hsu BL, Harless SM, Lindsley RC, Hilbert DM, Cancro MP. *Cutting Edge: BLYS*

VII. Bibliografia

- Enables Survival of Transitional and Mature B Cells Through Distinct Mediators. *J Immunol.* 2002 Jun 15;168(12):5993–6.
116. O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, et al. BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma Cells. *J Exp Med.* 2004 Jan 5;199(1):91–7.
117. Mantchev GT, Cortesão CS, Rebrovich M, Cascalho M, Bram RJ. TACI Is Required for Efficient Plasma Cell Differentiation in Response to T-Independent Type 2 Antigens. *J Immunol.* 2007 Aug 15;179(4):2282–8.
118. Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF. Regulated Expression of BAFF-Binding Receptors during Human B Cell Differentiation. *J Immunol.* 2007 Dec 1;179(11):7276–86.
119. Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP, et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med.* 2005 Jan 3;201(1):35–9.
120. Poodt AEJ, Driessen GJA, De Klein A, Van Dongen JJM, Van Der Burg M, De Vries E. TACI mutations and disease susceptibility in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 2009 Apr;156(1):35–9.
121. Sakurai D, Kanno Y, Hase H, Kojima H, Okumura K, Kobata T. TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40. *Eur J Immunol.* 2007 Jan;37(1):110–8.
122. Zhang Y, Li J, Zhang YM, Zhang XM, Tao J. Effect of TACI signaling on humoral immunity and autoimmune diseases. Vol. 2015, *Journal of Immunology Research.* Hindawi Limited; 2015.
123. Rauch M, Tussiwand R, Bosco N, Rolink AG. Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells. *PLoS One* [Internet]. 2009 [cited 2019 Dec 11];4(5):e5456. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19421318>
124. Schweighoffer E, Tybulewicz VL. Signalling for B cell survival. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2018 Apr [cited 2019 Dec 11];51:8–14. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29149682>
125. Hoek KL, Carlesso G, Clark ES, Khan WN. Absence of Mature Peripheral B Cell Populations in Mice with Concomitant Defects in B Cell Receptor and BAFF-R Signaling. *J Immunol* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2019 Dec 11];183(9):5630–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843948>
 126. Tangye SG, Bryant VL, Cuss AK, Good KL. BAFF, APRIL and human B cell disorders. *Semin Immunol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2019 Dec 10];18(5):305–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532306000790>
 127. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Jul [cited 2019 Dec 10];9(7):491–502. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2572>
 128. Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, MacKay F, et al. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity*. 2004 Jun;20(6):785–98.
 129. Vincent FB, Morand EF, Schneider P, Mackay F. The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2014 Jun 11 [cited 2019 Dec 10];10(6):365–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24614588>
 130. Thompson N, Isenberg DA, Jury EC, Ciurtin C. Exploring BAFF: its expression, receptors and contribution to the immunopathogenesis of Sjögren’s syndrome. *Rheumatology* [Internet]. 2016 Sep [cited 2019 Dec 10];55(9):1548–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26790457>
 131. Wei F, Chang Y, Wei W. The role of BAFF in the progression of rheumatoid arthritis. *Cytokine* [Internet]. 2015 Dec [cited 2019 Dec 10];76(2):537–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26198030>
 132. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2006 Jan [cited 2019 Dec 10];54(1):192–201. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.21526>

VII. Bibliografía

133. Kannel K, Alnek K, Vahter L, Gross-Paju K, Uibo R, Kisand K V. Changes in Blood B Cell-Activating Factor (BAFF) Levels in Multiple Sclerosis: A Sign of Treatment Outcome. *PLoS One* [Internet]. 2015 [cited 2019 Dec 10];10(11):e0143393. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26600308>
134. Li WW, Peng X, Liu Y, Liu H, Liu F, He L, et al. TLR9 and BAFF: Their expression in patients with IgA nephropathy. *Mol Med Rep*. 2014;10(3):1469–74.
135. McCarthy EM, Lee RZ, Ní Gabhann J, Smith S, Cunnane G, Doran MF, et al. Elevated B lymphocyte stimulator levels are associated with increased damage in an Irish systemic lupus erythematosus cohort. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2013 Jul [cited 2019 Dec 21];52(7):1279–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479724>
136. Jonsson M V, Szodoray P, Jellestad S, Jonsson R, Skarstein K. Association between circulating levels of the novel TNF family members APRIL and BAFF and lymphoid organization in primary Sjögren's syndrome. *J Clin Immunol* [Internet]. 2005 May [cited 2019 Dec 21];25(3):189–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15981083>
137. Salazar-Camarena DC, Ortiz-Lazareno PC, Cruz A, Oregon-Romero E, Machado-Contreras JR, Muñoz-Valle JF, et al. Association of BAFF, APRIL serum levels, BAFF-R, TACI and BCMA expression on peripheral B-cell subsets with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Lupus* [Internet]. 2016 May [cited 2019 Dec 21];25(6):582–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26424128>
138. Bosello S, Youinou P, Daridon C, Tolusso B, Bendaoud B, Pietrapertosa D, et al. Concentrations of BAFF correlate with autoantibody levels, clinical disease activity, and response to treatment in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2008 Jul;35(7):1256–64.
139. Mariette X, Roux S, Zhang J, Bengoufa D, Lavie F, Zhou T, et al. The level of BLYS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2003 Feb 1;62(2):168–71.

140. Shin W, Lee HT, Lim H, Lee SH, Son JY, Lee JU, et al. BAFF-neutralizing interaction of belimumab related to its therapeutic efficacy for treating systemic lupus erythematosus. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Mar 23 [cited 2018 Sep 23];9(1):1200. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-03620-2>
141. Vincent FB, Morand EF, Mackay F. BAFF and innate immunity: New therapeutic targets for systemic lupus erythematosus. In: *Immunology and Cell Biology*. 2012. p. 293–303.
142. Zhou B, Zhang H, Su X, Luo Y, Li X, Yu C, et al. Therapeutic effects of a novel BAFF blocker on arthritis. *Signal Transduct Target Ther*. 2019 Dec;4(1).
143. McWilliams EM, Lucas CR, Chen T, Harrington BK, Wasmuth R, Campbell A, et al. Anti-BAFF-R antibody VAY-736 demonstrates promising preclinical activity in CLL and enhances effectiveness of ibrutinib. *Blood Adv*. 2019 Feb 12;3(3):447–60.
144. Schuster A, Jung B, Hofbauer J, Kühne L, Zecher D, Banas B, et al. B-cell activating factor BAFF reflects patients' immunological risk profile after kidney transplantation. *Transpl Immunol* [Internet]. 2017 Dec [cited 2019 Dec 11];45:35–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28867309>
145. Friebus-Kardash J, Wilde B, Keles D, Heinold A, Kribben A, Witzke O, et al. Pretransplant serum BAFF levels are associated with pretransplant HLA immunization and renal allograft survival. *Transpl Immunol* [Internet]. 2018 Apr [cited 2019 Dec 11];47:10–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966327417301739>
146. Min JW, Kim KW, Kim B-M, Doh KC, Choi MS, Choi BS, et al. Clinical Significance of Pre- and Post-Transplant BAFF Levels in Kidney Transplant Recipients. *PLoS One* [Internet]. 2016 [cited 2019 Dec 22];11(9):e0162964. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27631619>
147. Xu H, He X, Liu Q, Shi D, Chen Y, Zhu Y, et al. Abnormal high expression of B-cell activating factor belonging to the TNF superfamily (BAFF) associated with long-term outcome in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* [Internet]. 2009

VII. Bibliografía

- Jun [cited 2018 Sep 23];41(5):1552–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134508014474>
148. Sango C, Merino D, San Segundo D, Rodrigo E, Lopez-Hoyos M, Benito A, et al. B-Cell-Activating Factor Levels Are Associated With Antibody-Mediated Histological Damage in Kidney Transplantation. *Transplant Proc* [Internet]. 2016 Nov [cited 2019 Dec 11];48(9):2910–2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134516305498>
149. Banham G, Prezzi D, Harford S, Taylor CJ, Hamer R, Higgins R, et al. Elevated pretransplantation soluble BAFF is associated with an increased risk of acute antibody-mediated rejection. *Transplantation* [Internet]. 2013 Aug 27 [cited 2019 Dec 11];96(4):413–20. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0007890-201308270-00013>
150. Wang X-Z, Wan Z, Xue W-J, Zheng J, Li Y, Ding CG. B-Cell Activating Factor Predicts Acute Rejection Risk in Kidney Transplant Recipients: A 6-Month Follow-Up Study. *Front Immunol* [Internet]. 2019 May 15 [cited 2019 Dec 11];10:1046. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01046/full>
151. Pongpirul W, Chanchaoentana W, Pongpirul K, Leelahavanichkul A, Kittikowit W, Jutivorakool K, et al. B-cell activating factor, a predictor of antibody mediated rejection in kidney transplantation recipients. *Nephrology (Carlton)* [Internet]. 2018 Feb [cited 2019 Dec 11];23(2):169–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/nep.12972>
152. Zhang H, Wang S, Su X, Fu Q, Li J, Wang J, et al. The role of soluble B cell-activating factor in further stratifying the risk of antibody-mediated rejection post-renal transplant: A meta-analysis. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2020 Feb [cited 2019 Dec 26];79:106059. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576919320302>
153. Kościelska-Kasprzak K, Bartoszek D, Myszka M, Kamińska D, Boratyńska M, Krajewska M, et al. B Cell Activating Factor (BAFF) in Long-term Kidney Transplant Recipients Is Not a Prognostic Marker for Allograft Dysfunction or Survival.

- Transplant Proc [Internet]. 2018 Jul [cited 2018 Sep 24];50(6):1750–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30056894>
154. Slavcev A, Brozova J, Slatinska J, Sekerkova Z, Honsova E, Skibova J, et al. Soluble BAFF Cytokine Levels and Antibody-Mediated Rejection of the Kidney Allograft. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) [Internet]. 2016 Dec 12 [cited 2018 Sep 24];64(Suppl 1):47–53. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00005-016-0428-4>
 155. Lehnhardt AM, Strecker M, Eiermann T, Marget M, Thaiss F, Nashan B, et al. High B-cell activating factor is not associated with worse 3-year graft outcome in blood group-incompatible kidney transplantation with rituximab induction. Clin Transplant [Internet]. 2015 Apr [cited 2019 Dec 11];29(4):359–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25627801>
 156. San Segundo D, López-Hoyos M, Arias M. Regulatory B-Cells in Transplantation. Antibodies [Internet]. 2013 Nov 20 [cited 2019 Dec 9];2(4):587–97. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4468/2/4/587>
 157. Sanz I, Wei C, Lee FEH, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. Vol. 20, Seminars in Immunology. NIH Public Access; 2008. p. 67–82.
 158. Axelrod DA, Schnitzler MA, Xiao H, Irish W, Tuttle-Newhall E, Chang S-H, et al. An economic assessment of contemporary kidney transplant practice. Am J Transplant [Internet]. 2018 May 1 [cited 2020 Feb 10];18(5):1168–76. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.14702>
 159. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche H-U. Long-Term Renal Allograft Survival in the United States: A Critical Reappraisal. Am J Transplant [Internet]. 2011 Mar [cited 2018 Oct 6];11(3):450–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20973913>
 160. Prospective Donor Specific T Response Measurement for IS Minimization in de Novo Renal Transplantation [Internet]. [cited 2020 Feb 10]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02540395>

VII. Bibliografía

161. Behnam Sani K, Sawitzki B. Immune monitoring as prerequisite for transplantation tolerance trials [Internet]. Vol. 189, *Clinical and Experimental Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2017 [cited 2020 Feb 10]. p. 158–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28518214>
162. Boehmig HJ, Giles GR, Amemiya H, Wilson CB, Coburg AJ, Genton E, et al. Hyperacute rejection of renal homografts: with particular reference to coagulation changes, humoral antibodies, and formed blood elements. *Transplant Proc* [Internet]. 1971 Jun [cited 2020 Feb 11];3(2):1105–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4944050>
163. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting Kidney Graft Failure by HLA Antibodies: A Prospective Trial. *Am J Transplant*. 2004 Mar;4(3):438–43.
164. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Van Huyen JPD, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med*. 2013;369(13):1215–26.
165. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* [Internet]. 2009 May 27 [cited 2020 Feb 11];87(10):1505–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19461487>
166. Visentin J, Guidicelli G, Bachelet T, Jacquelinet C, Audry B, Nong T, et al. Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: Prevalence, relevance, and impact on organ allocation. *Transplantation* [Internet]. 2014 Oct 15 [cited 2020 Feb 11];98(7):738–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25289917>
167. Grenzi PC, de Marco R, Silva RZR, Campos ÉF, Gerbase-DeLima M. Antibodies against denatured HLA class II molecules detected in luminex-single antigen assay. *Hum Immunol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2020 Feb 11];74(10):1300–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831256>
168. Visentin J, Vigata M, Daburon S, Contin-Bordes C, Fremeaux-Bacchi V, Dromer C,

- et al. Deciphering complement interference in anti-human leukocyte antigen antibody detection with flow beads assays. *Transplantation*. 2014;98(6):625–31.
169. 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(1):19–47.
170. Berth M. Complement Interference Is Not the Same as a Prozone Phenomenon. *Am J Transplant* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2020 Feb 11];16(5):1638–1638. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.13650>
171. 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.
172. Irure J, Asensio E, Rodrigo E, Romón Í, Gómez J, Arias M, et al. Improvement in the definition of anti-HLA antibody profile in highly sensitized patients. *PLoS One*. 2017 Feb 1;12(2).
173. Thibault-Espitia A, Foucher Y, Danger R, Migone T, Pallier A, Castagnet S, et al. BAFF and BAFF-R levels are associated with risk of long-term kidney graft dysfunction and development of donor-specific antibodies. *Am J Transplant* [Internet]. 2012 Oct [cited 2019 Dec 18];12(10):2754–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-6143.2012.04194.x>
174. Xu H, He X, Xu R. B Cell Activating Factor, Renal Allograft Antibody-Mediated Rejection, and Long-Term Outcome. *J Immunol Res* [Internet]. 2018 Jun 6 [cited 2019 Dec 18];2018:5251801. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/5251801/>
175. San Segundo D, Rodrigo E, Kislikova M, Ruiz JC, Fernandez-Fresnedo G, Asensio E, et al. Frequencies of circulating B-cell subpopulations before kidney transplantation identify patients at risk of acute rejection. In: *Transplantation Proceedings* [Internet]. Elsevier USA; 2015 [cited 2020 Feb 16]. p. 54–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25645769>
176. San Segundo D, Galván-Espinoza LH, Rodrigo E, Irure J, Ruiz JC, Fernández-

VII. Bibliografía

- Fresnedo G, et al. Regulatory T-cell Number in Peripheral Blood at 1 Year Posttransplant as Predictor of Long-term Kidney Graft Survival. *Transplant Direct*. 2019 Mar 1;5(3).
177. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*. 2010 Jan 29;32(1):129–40.
178. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* [Internet]. 2011 Jan 13 [cited 2020 Feb 16];117(2):530–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962324>
179. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* [Internet]. 2014 Dec 18 [cited 2020 Feb 16];41(6):1040–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25484301>
180. Newell KA, Asare A, Sanz I, Wei C, Rosenberg A, Gao Z, et al. Longitudinal studies of a B cell-derived signature of tolerance in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2015 Nov 1;15(11):2908–20.
181. Latorre I, Esteve-Sole A, Redondo D, Giest S, Argilaguuet J, Alvarez S, et al. Calcineurin and mTOR inhibitors have opposing effects on regulatory T cells while reducing regulatory B cell populations in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2020 Feb 16];35:1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26836476>
182. Shabir S, Girdlestone J, Briggs D, Kaul B, Smith H, Daga S, et al. Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: A prospective study. *Am J Transplant* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2020 Feb 16];15(5):1384–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25808898>

183. Irure-Ventura J, San Segundo D, Rodrigo E, Merino D, Belmar-Vega L, Ruiz San Millán JC, et al. High Pretransplant BAFF Levels and B-cell Subset Polarized towards a Memory Phenotype as Predictive Biomarkers for Antibody-Mediated Rejection. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Jan 25 [cited 2020 Feb 17];21(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31991734>
184. Walters GD, Vinuesa CG. Follicular helper cells in transplantation [Internet]. Vol. 100, *Transplantation*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016 [cited 2020 Feb 16]. p. 1650–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27362303>
185. Yan L, de Leur K, Hendriks RW, van der Laan LJW, Shi Y, Wang L, et al. T follicular helper cells as a new target for immunosuppressive therapies [Internet]. Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017 [cited 2020 Feb 16]. p. 1510. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29163552>
186. Cano-Romero FL, Laguna Goya R, Utrero-Rico A, Gómez-Massa E, Arroyo-Sánchez D, Suárez-Fernández P, et al. Longitudinal profile of circulating T follicular helper lymphocytes parallels anti-HLA sensitization in renal transplant recipients. *Am J Transplant* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2020 Feb 16];19(1):89–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29947147>
187. Wyld ML, Chadban SJ. Recurrent IgA Nephropathy After Kidney Transplantation. *Transplantation* [Internet]. 2016 Sep 23 [cited 2020 Feb 27];100(9):1827–32. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0007890-201609000-00013>
188. Martín-Penagos L, Benito-Hernández A, San Segundo D, Sango C, Azueta A, Gómez-Román J, et al. A proliferation-inducing ligand increase precedes IgA nephropathy recurrence in kidney transplant recipients. *Clin Transplant* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2020 Feb 27];33(4):e13502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30776158>
189. Tafulo S, Malheiro J, Santos S, Dias L, Almeida M, Martins LS, et al. Degree of HLA class II eplet mismatch load improves prediction of antibody-mediated rejection in living donor kidney transplantation. *Hum Immunol* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited

VII. Bibliografía

- 2020 Feb 18];80(12):966–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31604581>
190. Kishikawa H, Kinoshita T, Hashimoto M, Fukae S, Taniguchi A, Yamanaka K, et al. Class II HLA Eplet Mismatch Is a Risk Factor for De Novo Donor-Specific Antibody Development and Antibody-mediated Rejection in Kidney Transplantation Recipients. *Transplant Proc* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2020 Feb 18];50(8):2388–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30316363>
191. Wiebe C, Kosmoliaptsis V, Pochinco D, Gibson IW, Ho J, Birk PE, et al. HLA-DR/DQ molecular mismatch: A prognostic biomarker for primary alloimmunity. *Am J Transplant*. 2019 Jun 1;19(6):1708–19.
192. Opelz G, Unterrainer C, Süsal C, Döhler B. Efficacy and safety of antibody induction therapy in the current era of kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2020 Feb 17];31(10):1730–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27190386>
193. Hill P, Cross NB, Barnett ANR, Palmer SC, Webster AC. Polyclonal and monoclonal antibodies for induction therapy in kidney transplant recipients [Internet]. Vol. 2017, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2017 [cited 2020 Feb 17]. p. CD004759. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28073178>
194. Rodrigo E, Fernández-Fresnedo G, Robledo C, Palomar R, Cantarell C, Mazuecos A, et al. Heterogeneity of induction therapy in Spain: Changing patterns according to year, centre, indications and results. *NDT Plus* [Internet]. 2010 Jun [cited 2020 Feb 17];3(SUPPL. 2):ii9-ii14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508860>
195. Thiyagarajan UM, Ponnuswamy A, Bagul A. Thymoglobulin and its use in renal transplantation: A review [Internet]. Vol. 37, *American Journal of Nephrology*. 2013 [cited 2020 Feb 17]. p. 586–601. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23774740>
196. Rafiei M, Kittleson M, Patel J, Osborne A, Chang D, Czer L, et al. Anti-thymocyte

- gamma-globulin may prevent antibody production after heart transplantation. *Transplant Proc* [Internet]. 2014 Dec [cited 2020 Feb 17];46(10):3570–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25498091>
197. Bächler K, Amico P, Hönger G, Biemann D, Hopfer H, Mihatsch MJ, et al. Efficacy of induction therapy with ATG and intravenous immunoglobulins in patients with low-level donor-specific HLA-antibodies. *Am J Transplant* [Internet]. 2010 May [cited 2020 Feb 17];10(5):1254–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353473>
198. Hale DA, Gottschalk R, Umemura A, Maki T, Monaco AP. Immunologic mechanisms in tolerance produced in mice with nonradiation-based lymphoablation and donor-specific bone marrow. *Transplantation*. 2002 Aug 27;74(4):477–84.
199. Hale DA, Gottschalk R, Umemura A, Maki T, Monaco AP. Establishment of stable multilineage hematopoietic chimerism and donor-specific tolerance without irradiation. *Transplantation* [Internet]. 2000 Apr 15 [cited 2020 Feb 17];69(7):1242–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10798737>
200. Kawai T, Sachs DH, Sprangers B, Spitzer TR, Saidman SL, Zorn E, et al. Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am J Transplant* [Internet]. 2014 Jul [cited 2020 Feb 17];14(7):1599–611. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903438>
201. Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, Benike C, Sarwal M, Millan MT, et al. Tolerance and withdrawal of immunosuppressive drugs in patients given kidney and hematopoietic cell transplants. *Am J Transplant* [Internet]. 2012 May [cited 2020 Feb 17];12(5):1133–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22405058>
202. Vanikar A V., Trivedi HL, Thakkar UG. Six years' experience of tolerance induction in renal transplantation using stem cell therapy. *Clin Immunol* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2020 Feb 17];187:10–4. Available from:

VII. Bibliografia

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28757451>
203. Zand MS, Vo T, Huggins J, Felgar R, Liesveld J, Pellegrin T, et al. Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. *Transplantation*. 2005 Jun 15;79(11):1507–15.
204. Hofmann WJ, Momburg F, Möller P. Thymic medullary cells expressing B lymphocyte antigens. *Hum Pathol*. 1988 Nov 1;19(11):1280–7.
205. Thauinat O, Koenig A, Leibler C, Grimbert P. Effect of immunosuppressive drugs on humoral allosensitization after kidney transplant [Internet]. Vol. 27, *Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2016 [cited 2020 Feb 17]. p. 1890–900. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26872489>
206. Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, Allam SR, Montague T, Bromberg JS, et al. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant* [Internet]. 2010 Sep [cited 2020 Feb 18];10(9):2132–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20883548>
207. Sageshima J, Ciancio G, Guerra G, Gaynor JJ, Cova D, Zarak A, et al. Prolonged lymphocyte depletion by single-dose rabbit anti-thymocyte globulin and alemtuzumab in kidney transplantation. *Transpl Immunol* [Internet]. 2011 Sep [cited 2020 Feb 18];25(2–3):104–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784152>
208. Vacher-Coponat H, Brunet C, Moal V, Loundou A, Bonnet E, Lyonnet L, et al. Tacrolimus/mycophenolate mofetil improved natural killer lymphocyte reconstitution one year after kidney transplant by reference to cyclosporine/azathioprine. *Transplantation* [Internet]. 2006 Aug 27 [cited 2020 Feb 18];82(4):558–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16926601>
209. Morelon E, Lefrançois N, Besson C, Prévautel J, Brunet M, Touraine JL, et al. Preferential increase in memory and regulatory subsets during T-lymphocyte immune reconstitution after Thymoglobulin induction therapy with maintenance

- sirolimus vs cyclosporine. *Transpl Immunol* [Internet]. 2010 May [cited 2020 Feb 18];23(1–2):53–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20406686>
210. Kho MML, Bouvy AP, Cadogan M, Kraaijeveld R, Baan CC, Weimar W. The effect of low and ultra-low dosages Thymoglobulin on peripheral T, B and NK cells in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2020 Feb 18];26(4):186–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410573>
211. Irure J, Sango C, Segundo DS, Fernández-Fresnedo G, Ruiz JC, Benito-Hernández A, et al. Late Plasma Cell Depletion After Thymoglobulin Induction in Kidney Transplant Recipients. *Exp Clin Transplant* [Internet]. 2019 Apr 9 [cited 2019 Oct 14]; Available from: <http://www.ectrx.org/detail/epub/1/1/1/0/794/0>
212. Waller EK, Langston AA, Lonial S, Cherry J, Somani J, Allen AJ, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-thymocyte globulin in recipients of partially HLA-matched blood hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2003 Jul [cited 2020 Feb 18];9(7):460–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12869960>
213. Ramos-Amaya A, Rodríguez-Bayona B, López-Blanco R, Andújar E, Pérez-Alegre M, Campos-Caro A, et al. Survival of Human Circulating Antigen-Induced Plasma Cells Is Supported by Plasma Cell–Niche Cytokines and T Follicular Helper Lymphocytes. *J Immunol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2020 Feb 18];194(3):1031–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25548228>
214. Chesneau M, Pallier A, Braza F, Lacombe G, Le Gallou S, Baron D, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant* [Internet]. 2014 Jan [cited 2020 Feb 18];14(1):144–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24354874>



VIII. ANEXOS

Tabla Anexo 1. Frecuencia pretrasplante de las subpoblaciones de linfocitos B y T en pacientes trasplantados renales y controles sanos.

	Controles sanos (n = 40)	No Rx clínico (n = 87)	AbMR clínico (n = 11)	Rx clínico celular (n = 5)	Rx clínico mixto (n = 6)
Linfocitos B (CD19+)	11,74 (7,58-15,28)	8,28 (4,79-10,80)	11,67 (7,46-15,27)	8,60 (5,18-12,42)	10,53 (5,23-12,38)
B Transicionales tipo 2	4,87 (3,11-6,74)	1,34 (0,40-2,57)	0,15 (0,09-0,92)	1,01 (0,61-3,53)	1,38 (1,01-3,27)
B Naïve	60,77 (49,19-67,62)	59,33 (43,99-76,90)	27,30 (13,50-33,31)	68,78 (45,20-79,75)	58,63 (47,93-65,31)
B Memoria sin cambio de isotipo	16,36 (11,77-23,38)	10,08 (6,32-17,36)	6,25 (4,71-11,34)	14,91 (9,57-21,73)	14,34 (7,47-15,74)
B Memoria con cambio de	16,04 (12,85-21,07)	18,89 (9,66-27,32)	44,33 (9,26-59,36)	15,58 (11,58-22,56)	18,21 (14,93-28,41)
Bm2	45,13 (39,39-53,48)	51,99 (41,18-61,55)	21,63 (4,56-29,27)	58,06 (37,80-74,09)	51,26 (43,32-56,76)
Bm2'	6,18 (4,35-9,44)	5,92 (3,37-10,55)	6,30 (2,06-11,36)	4,46 (3,92-11,85)	4,93 (2,08-6,33)
Bm5	11,17 (8,15-14,26)	13,28 (8,28-18,69)	8,04 (6,03-20,10)	10,08 (7,85-21,78)	16,25 (10,08-20,72)
eBm5	9,38 (7,18-13,15)	8,83 (4,99-12,79)	8,85 (4,94-15,81)	15,86 (9,08-18,77)	13,58 (10,38-15,72)
Linfocitos T CD4+	43,29 (39,47-52,89)	48,29 (39,84-56,27)	43,02 (39,71-45,32)	43,47 (42,02-47,74)	48,79 (44,81-53,06)
CD4 Naïve	58,33 (39,66-66,58)	42,47 (23,46-59,70)	29,99 (15,49-38,78)	38,69 (31,64-50,52)	43,79 (33,84-51,30)
CD4 TEMRA	0,50 (0,26-1,11)	3,29 (1,40-7,78)	12,90 (4,71-17,95)	7,24 (3,78-12,96)	4,58 (1,61-14,27)
Linfocitos T CD8+	22,16 (17,63-29,15)	22,25 (16,32-30,78)	25,79 (16,35-31,80)	25,71 (15,49-31,80)	20,72 (15,38-24,72)
CD8 Naïve	51,97 (36,14-61,56)	40,02 (26,48-57,31)	25,50 (9,30-38,18)	40,80 (31,17-65,75)	37,93 (27,28-54,46)
CD8 TEMRA	15,22 (9,32-30,77)	31,58 (21,73-53,34)	47,24 (34,38-62,85)	40,53 (15,99-49,76)	39,01 (13,60-57,84)

Rx: rechazo; AbMR: rechazo mediado por anticuerpos

Tabla Anexo 2. Frecuencia de las subpoblaciones de linfocitos B y T a los 6, 12 y 24 meses post-trasplante.

	No rechazo subclínico (n=38)	Rechazo subclínico celular (n=8)	AbMR subclínico (n=5)
Linfocitos B (CD19+)			
6 meses	9,40 (5,49-14,21)	8,70 (5,85-14,67)	9,77 (4,61-23,96)
12 meses	8,71 (5,64-12,56)	11,01 (5,52-12,54)	5,80 (4,28-11,21)
24 meses	9,99 (4,33-13,63)	7,91 (1,83-11,24)	7,46 (5,86-8,54)
B Transicionales tipo 2			
6 meses	1,19 (0,64-2,34)	1,07 (0,16-1,42)	0,22 (0,09-0,58)
12 meses	1,58 (0,80-2,75)	1,16 (0,48-1,40)	0,48 (0,29-0,50)
24 meses	1,20 (0,82-2,39)	0,79 (0,76-1,13)	0,46 (0,27-0,67)
B Naïve			
6 meses	59,67 (31,74-72,42)	46,15 (25,79-59,24)	66,02 (24,45-79,29)
12 meses	64,43 (47,05-77,16)	70,71 (38,78-72,39)	30,27 (23,62-54,71)
24 meses	60,80 (43,14-73,49)	43,83 (25,40-61,77)	28,58 (23,91-54,78)
B Memoria sin cambio de isotipo			
6 meses	10,27 (6,51-15,29)	9,54 (7,43-12,92)	6,17 (1,51-13,92)
12 meses	13,01 (8,95-17,41)	16,54 (7,31-19,82)	6,32 (4,69-11,20)
24 meses	11,18 (7,59-19,05)	18,08 (14,65-18,80)	16,79 (11,31-20,19)
B Memoria con cambio de isotipo			
6 meses	12,34 (5,88-16,92)	24,23 (15,48-29,69)	7,87 (3,62-25,56)
12 meses	13,43 (6,89-20,80)	22,87 (11,24-34,62)	42,61 (22,89-48,56)
24 meses	16,42 (8,55-26,86)	28,72 (17,27-43,12)	33,64 (23,01-46,14)
Bm2			
6 meses	45,75 (25,91-57,25)	41,77 (13,63-57,04)	48,78 (27,84-71,28)
12 meses	47,95 (34,68-57,16)	36,78 (21,11-67,18)	30,14 (27,32-58,36)
24 meses	48,34 (37,13-61,03)	26,96 (15,67-52,66)	22,97 (18,43-30,62)
Bm2'			
6 meses	3,88 (1,92-10,47)	4,31 (2,96-4,78)	1,61 (0,46-5,02)
12 meses	4,75 (2,65-11,42)	2,63 (1,49-7,39)	0,71 (0,46-9,36)
24 meses	5,91 (2,06-8,83)	3,46 (0,51-5,62)	0,37 (0,18-1,56)
Bm5			
6 meses	8,91 (4,19-19,30)	17,25 (8,18-28,47)	13,03 (8,54-60,03)
12 meses	8,43 (6,29-12,10)	19,65 (7,03-43,96)	41,00 (31,27-48,65)
24 meses	11,71 (6,35-17,31)	21,48 (12,30-36,08)	32,67 (26,93-38,41)
eBm5			
6 meses	9,39 (5,23-11,58)	15,30 (9,62-19,09)	7,82 (3,30-8,29)
12 meses	8,23 (5,69-10,53)	13,31 (7,61-16,09)	17,47 (7,95-23,82)
24 meses	8,94 (5,84-15,33)	14,76 (9,72-19,16)	20,56 (17,99-27,65)
Linfocitos T CD4+			
6 meses	32,51 (23,32-48,55)	35,81 (21,34-50,28)	27,33 (14,36-49,18)
12 meses	33,18 (20,51-47,92)	42,09 (27,91-53,08)	27,15 (13,37-36,19)
24 meses	36,10 (24,49-47,16)	29,82 (18,12-36,64)	28,36 (13,64-44,76)
CD4 Naïve			
6 meses	48,39 (18,11-60,87)	19,37 (4,95-63,95)	33,17 (11,82-50,45)
12 meses	34,28 (15,51-52,40)	28,63 (15,99-55,20)	40,08 (18,73-61,18)
24 meses	41,17 (25,58-48,98)	16,80 (9,58-45,92)	33,28 (11,72-44,43)

CD4 TEMRA			
6 meses	2,04 (1,07-5,81)	4,25 (1,02-7,08)	12,91 (4,93-19,88)
12 meses	2,10 (1,02-7,57)	3,31 (2,24-10,79)	3,50 (1,18-8,09)
24 meses	2,92 (1,24-7,22)	3,16 (0,48-9,90)	2,55 (1,16-2,77)
Linfocitos T CD8+			
6 meses	28,18 (20,69-37,24)	33,41 (24,02-38,93)	34,92 (25,13-42,09)
12 meses	29,30 (21,68-42,97)	21,49 (17,23-27,32)	33,04 (25,73-50,95)
24 meses	32,57 (24,27-39,99)	32,44 (19,43-50,88)	41,29 (26,42-54,01)
CD8 Naïve			
6 meses	30,14 (21,24-48,69)	20,54 (13,25-56,89)	24,61 (11,58-29,92)
12 meses	32,46 (19,84-44,24)	46,18 (13,87-60,38)	37,91 (22,35-42,98)
24 meses	27,04 (21,10-50,15)	51,07 (15,59-64,89)	31,08 (23,60-40,18)
CD8 TEMRA			
6 meses	46,79 (28,49-59,73)	43,44 (19,65-74,60)	54,19 (51,36-66,72)
12 meses	48,20 (27,29-65,30)	40,29 (28,71-72,59)	46,27 (41,52-58,90)
24 meses	53,11 (35,59-63,26)	35,46 (20,45-62,26)	41,07 (35,85-60,38)

AbMR: rechazo mediado por anticuerpos

Tabla Anexo 3. Evaluación de los distintos perfiles de anticuerpos anti-HLA en pacientes hipersensibilizados.

Perfil	Tipaje HLA donante	Perfil (Neto/Dil/C1q)	Antígeno HLA con el perfil testado	Resul. Suero neto (MFI)	Resul. Suero dil 1/160 (MFI)	Resul. Test C1q (MFI)	Resul. CDC	Resul. FXCM (Ratio ^a Suero neto)	Resul. FXCM (Ratio ^a Suero dil)
1	A*02,*03 B*18,*44	+/-/-	A*03:02	Pos (4272)	Neg (134)	Neg (36)	Neg	Pos (9,97)	Neg (1,14)
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/-/-	A*02:03	Pos (1555)	Neg (47)	Neg (41)	Neg	Pos (3,12)	Neg (0,98)
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/-/-	B*27:05	Pos (1775)	Neg (491)	Neg (21)	Neg	Pos (4,4)	Neg (1,09)
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/-/-	B*27:08	Pos (2276)	Neg (601)	Neg (27)	Neg	Pos (4,4)	Neg (1,09)
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/-/-	B*44:03	Pos (1779)	Neg (413)	Neg (20)	Neg	Pos (4,4)	Neg (1,09)
	A*24,*26 B*07,*51	+/-/-	B*07:02	Pos (3377)	Neg (1166)	Neg (22)	Neg	Pos (1,51)	NR
2	A*03,*29 B*44,*60	+/+/-	A*03:01	Pos (15047)	Pos (18039)	Neg (145)	Neg	Pos (1,71)	Neg (0,89)
	A*03,*29 B*44,*60	+/+/-	A*29:01	Pos (14410)	Pos (14298)	Neg (656)	Neg	Pos (1,71)	Neg (0,89)
	A*03,*29 B*44,*60	+/+/-	A*29:02	Pos (12296)	Pos (14566)	Neg (1067)	Neg	Pos (1,71)	Neg (0,89)
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/+/-	A*02:01	Pos (14109)	Pos (18281)	Neg (163)	Neg	Pos (5,99)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/+/-	A*02:03	Pos (15156)	Pos (18780)	Neg (219)	Neg	Pos (5,99)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/+/-	A*02:06	Pos (13062)	Pos (18129)	Neg (339)	Neg	Pos (5,99)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/+/-	A*24:02	Pos (14609)	Pos (12901)	Neg (306)	Neg	Pos (5,99)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/+/-	A*24:03	Pos (10604)	Pos (13489)	Neg (432)	Neg	Pos (5,99)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/+/-	B*27:08	Pos (5353)	Pos (1744)	Neg (455)	Neg	Pos (5,99)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/+/-	A*02:01	Pos (3293)	Pos (7030)	Neg (47)	Neg	Pos (3,34)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/+/-	A*02:03	Pos (2468)	Pos (5329)	Neg (55)	Neg	Pos (3,34)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/+/-	A*02:06	Pos (2615)	Pos (6298)	Neg (39)	Neg	Pos (3,34)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/+/-	B*27:05	Pos (4339)	Pos (2566)	Neg (33)	Neg	Pos (3,34)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+/+/-	B*44:02	Pos (5044)	Pos (9799)	Neg (192)	Neg	Pos (3,34)	NR

	A*24,*26 B*07,*51	+ / +/-	A*24:02	Pos (14608)	Pos (12901)	Neg (306)	Neg	Pos (10,16)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / +/-	A*24:03	Pos (10604)	Pos (13489)	Neg (432)	Neg	Pos (10,16)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / +/-	A*26:01	Pos (16065)	Pos (17054)	Neg (418)	Neg	Pos (10,16)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / +/-	B*27:08	Pos (5353)	Pos (1744)	Neg (455)	Neg	Pos (10,16)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / +/-	B*51:01	Pos (15689)	Pos (16431)	Neg (645)	Neg	Pos (10,16)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / +/-	B*51:02	Pos (13805)	Pos (16333)	Neg (492)	Neg	Pos (10,16)	NR
3	A*03,*23 B*40,*60	+ / - / +	B*40:01	Pos (5119)	Pos (1898)	Pos (20456)	Pos	Pos (2,16)	Neg (1,17)
	A*03,*23 B*40,*60	+ / - / +	B*40:02	Pos (4171)	Pos (1686)	Pos (20242)	Pos	Pos (2,16)	Neg (1,17)
	A*24,*26 B*07,*51	+ / - / +	A*24:02	Pos (5570)	Pos (1034)	Pos (12202)	Pos	Pos (1,7)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / - / +	A*24:03	Pos (5910)	Pos (1235)	Pos (11710)	Pos	Pos (1,7)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / - / +	B*07:02	Pos (4609)	Pos (1434)	Pos (21129)	Pos	Pos (2,08)	NR
4	A*03,*29 B*44,*60	- / + / +	A*03:01	Neg (519)	Pos (9298)	Pos (11801)	Pos	Pos (3,92)	Pos (6,26)
	A*03,*29 B*44,*60	- / + / +	A*29:01	Neg (210)	Pos (9985)	Pos (7132)	Pos	Pos (3,92)	Pos (6,26)
	A*03,*29 B*44,*60	- / + / +	A*29:02	Neg (231)	Pos (9917)	Pos (7341)	Pos	Pos (3,92)	Pos (6,26)
5	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+ / + / +	B*27:05	Pos (3654)	Pos (6624)	Pos (9842)	Pos	Pos (4,88)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+ / + / +	B*27:08	Pos (3457)	Pos (7032)	Pos (9857)	Pos	Pos (4,88)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+ / + / +	B*27:05	Pos (6007)	Pos (2074)	Pos (18050)	Pos	Pos (4,86)	NR
	A*02,*24 B*27,*44 C*01,*16	+ / + / +	B*27:08	Pos (5101)	Pos (1899)	Pos (18113)	Pos	Pos (4,86)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / + / +	A*24:02	Pos (21360)	Pos (6193)	Pos (16041)	Pos	Pos (6,27)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / + / +	A*24:03	Pos (22749)	Pos (6798)	Pos (17821)	Pos	Pos (6,27)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / + / +	A*26:01	Pos (24048)	Pos (11671)	Pos (20357)	Pos	Pos (6,27)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / + / +	B*51:01	Pos (24914)	Pos (10332)	Pos (12486)	Pos	Pos (6,27)	NR
	A*24,*26 B*07,*51	+ / + / +	B*51:02	Pos (25112)	Pos (12142)	Pos (14275)	Pos	Pos (6,27)	NR

MFI: intensidad media de fluorescencia; Result: resultado; Neg: negativo; Pos: positivo; CDC: citotoxicidad dependiente de complemento; FCXM: prueba cruzada por citometría de flujo; NR: no realizado

^a Cálculo del ratio: MFI suero/MFI control negativo (Se considera resultado positivo si ratio > 1,5)



Article

High Pretransplant BAFF Levels and B-cell Subset Polarized towards a Memory Phenotype as Predictive Biomarkers for Antibody-Mediated Rejection

Juan Irure-Ventura ¹, David San Segundo ¹, Emilio Rodrigo ², David Merino ³, Lara Belmar-Vega ², Juan Carlos Ruiz San Millán ², Rosalía Valero ², Adalberto Benito ³ and Marcos López-Hoyos ^{1,*}

¹ Immunology Department. University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, 39008 Santander, Spain; juan.irure@scsalud.es (J.I-V.), david.sansegundo@scsalud.es (D.S.S)

² Nephrology Department. University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, 39008 Santander, Spain; emilio.rodrigo@scsalud.es (E.R.), lara.belmar@scsalud.es (L.B.-V.), juancarlos.ruiz@scsalud.es (J.C.R.), rosalia.valero@scsalud.es (R.V.)

³ Health Research Institute-IDIVAL, 39011 Santander, Spain; david.merino@hotmail.com (D.M.), adalberto.benito@scsalud.es (A.B.)

* Correspondence: marcos.lopez@scsalud.es (M.L.-H.); Tel.: +34-942-202520 Ext.: 73225

Received: 27 December 2019; Accepted: 22 January 2020; Published: 25 January 2020

Abstract: Antibody-mediated rejection (AbMR) is one of the leading causes of graft loss in kidney transplantation and B cells play an important role in the development of it. A B-cell activating factor (BAFF) is a cytokine involved in B cell ontogeny. Here, we analyzed whether B cell maturation and the effect of B cell soluble factors, such as BAFF could be involved in AbMR. Serum BAFF levels and B and T cell subpopulations were analyzed 109 kidney transplant patients before transplantation and at 6 and 12 months after kidney transplantation. Pretransplant serum BAFF levels as well as memory B cell subpopulations were significantly higher in those patients who suffered clinical AbMR during the first 12 months after kidney transplantation. Similar results were observed in the prospective analysis of patients with subclinical antibody-mediated rejection detected in the surveillance biopsy performed at 12 months after kidney transplantation. A multivariate analysis confirmed the independent role of BAFF in the development of AbMR, irrespective of other classical variables. Pretransplant serum BAFF levels could be an important non-invasive biomarker for the prediction of the development of AbMR and posttransplant increased serum BAFF levels contribute to AbMR.

Keywords: antibody-mediated rejection; kidney transplantation; BAFF; B cell subpopulations; non-invasive biomarker

1. Introduction

The importance of B cells in kidney transplantation, especially in the case of antibody-mediated rejection (AbMR) and transplantation tolerance, has been highlighted in recent studies [1–3]. It is well known the crucial role of B cells in humoral immunity, but they also contribute in other important processes, such as co-stimulation, antigen presentation, and cytokine secretion, all of them mechanisms that modulate the function of T cells [4]. AbMR is considered the main cause of kidney transplant failure [5–7]. AbMR is characterized by histological findings, like microvasculature inflammation, anti-HLA antibodies, mainly donor-specific antibodies (DSA), and C4d deposition in renal tissue [8]. However, the mechanisms underlying these processes are not well understood, and therefore, the analysis of different B cell subpopulations and cytokines associated with B cell

activation and survival could allow us to improve the knowledge of the pathogenesis, and to predict the allograft outcome.

The B cell homeostasis is modulated by different soluble factors, mainly the B-cell activating factor (BAFF, also known as TNFSF13B or the B lymphocyte stimulator, BLyS) and proliferation-inducing ligand (APRIL). BAFF belonging to the TNF family is a cytokine expressed and secreted by several cells of the immune system, predominantly myeloid cells (monocytes, macrophages, and dendritic cells), neutrophils, and by a subset of T lymphocytes, and is involved in survival, proliferation, differentiation, and maturation of different B cell subpopulations [9,10]. It is able to bind to three receptors, BAFF receptor (BAFFR, also known as TNFRSF13C or BLyS receptor 3), T cell activator and calcium modulating ligand interactor (TACI), and B cell maturation antigen (BCMA). The three receptors are expressed in B cells at different stages of development, being BAFFR the first one to be expressed and the only one required for survival of transitional and naïve B cells. TACI is expressed in B cells upon activation, whereas BCMA is found in germinal center B cells and in terminally differentiated B cells [11].

It has been analyzed that defects in the expression of either BAFF or BAFFR impairs B cell development beyond the immature, transitional type 1 stage and thus, prevents the formation of follicular and marginal zone B cells [12,13]. In the same way, experiments in mice have shown that defects in B cells receptor and BAFFR signaling entail an absence of mature peripheral B cell populations [14]. Thauinat et al. found that BAFF provides survival signals to B cells and allows them to escape rituximab-induced apoptosis in tertiary lymphoid organs [15].

Several studies have demonstrated the important role of BAFF in B cell biology, enhancing humoral immune responses to both T cell dependent and independent antigens, inducing class switch recombination and also, acting as a co-stimulator of T cell activation [16,17]. Furthermore, it is well established the implication of BAFF in the pathogenesis of different autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus [18], Sjögren's syndrome [19], rheumatoid arthritis [20], systemic sclerosis [21], or multiple sclerosis [22], among others.

However, in the context of transplantation, there are less studies and the role of BAFF is more controversial. On the one hand, some authors indicate that BAFF reflects the immunological risk profile of patients after kidney transplantation (KT), considering that pretransplant BAFF levels are associated with pretransplant sensitization and are useful in predicting allograft rejection [23–25]; BAFF expression correlates with pretransplant panel reactive antibody (PRA), indicating that BAFF may be involved in the development of graft loss [26]; elevated levels of BAFF are associated with antibody-mediated clinical damage in KT [27], and with an increased risk of acute AbMR [28–30]. On the other hand, there are authors that affirm that BAFF is not a prognostic marker for allograft dysfunction or survival in KT patients because BAFF serum levels are not related to anti-HLA sensitization [31]; significantly lower levels of BAFF are found in patients experiencing AbMR [32]; or high BAFF is not associated with the graft outcome in KT with rituximab induction [33]. A meta-analysis published recently evaluated the predictive value of serum BAFF for AbMR, indicating that the incidence of AbMR was significantly higher in patients with high levels of BAFF [34].

Another important aspect is the relationship between B and T cells, specifically CD4⁺ T cells, which are crucial for the generation of functional B cells. Unlike naïve T cells, memory T cells are able to activate in the presence of lower costimulatory signals. Following activation, memory T cells proliferate less than primary responding cells but can produce a greater effector response [35]. However, the different expression of T cell subpopulations and their relationship with B cells is not well understood in KT patients.

Taking into account these circumstances, in this study we analyzed the role of pretransplant BAFF levels, as well as at different time points after KT in the development of AbMR, evaluating together the changes that occur in the distribution of different B and T cell subpopulations in these KT patients.

2. Results

2.1. Pretransplant Serum BAFF Levels in Kidney Transplant Patients

Pretransplant serum BAFF levels were higher in KT patients (604.63; IQR 465.18-845.42 pg/mL) than in healthy subjects (HS; 549.88; IQR 495.43-622.97 pg/mL) without reaching statistical significance. However, when KT patients were stratified according to the presence of clinical rejection during the first 12 months after KT, patients who suffered clinical AbMR presented significantly higher pretransplant serum BAFF levels (853.29; IQR 765.37-1545.99 pg/mL) than KT without clinical rejection (594.60; IQR 453.21-803.93 pg/mL) or HS, $p = 0.003$ and $p < 0.001$, respectively (Figure 1a,b).

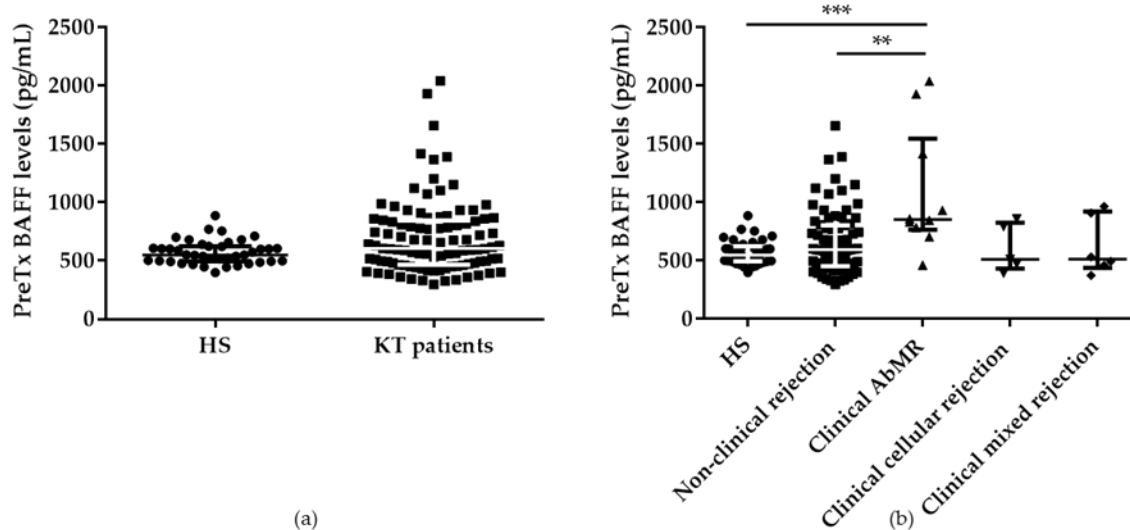


Figure 1. (a) No significant differences were found in the comparison of pretransplant serum BAFF levels between kidney transplant (KT) patients ($n = 109$) and healthy subjects (HS; $n = 40$). (b) Statistically significant differences in pretransplant serum BAFF levels between kidney transplant patients considering the different types of clinical rejection (non-clinical rejection ($n = 87$), antibody-mediated rejection ($n = 11$), cellular rejection ($n = 5$), and mixed rejection ($n = 6$)) and healthy subjects. ** indicates $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$

Furthermore, significantly higher pretransplant serum BAFF levels were observed in those patients that presented pretransplant anti-HLA antibodies (836.22; IQR 594.11-1140.75 pg/mL vs. 568.25; IQR 448.23-778.01 pg/mL) and DSA (1153.09; IQR 914.34-1405.35 pg/mL vs. 601.64; IQR 462.72-833.26 pg/mL), $p = 0.001$ and $p = 0.049$, respectively. A positive association was observed between BAFF levels and pretransplant calculated panel-reactive antibodies (cPRA; $r = 0.355$, $p < 0.001$). When we analyzed the presence of anti-HLA antibodies at 6 months posttransplantation, significantly higher pretransplant BAFF levels were found in this group of patients, $p = 0.001$.

Area under the receiver operational curve (ROC) of pretransplant soluble BAFF for predicting clinical AbMR during the first 12 months after kidney transplantation was 0.784 (95%CI 0.644–0.925). Based on this analysis and applying Youden's index, the optimal cut-off point for distinguishing between low and high BAFF levels was 782.03 pg/mL, with high sensitivity and specificity at 80% and 73.3%, respectively. Considering this cut-off point, KT patients with pretransplant serum BAFF levels higher than 782.03 pg/mL, showed statistically significant less AbMR free survival (log-rank $p < 0.001$; Figure 2a,b).

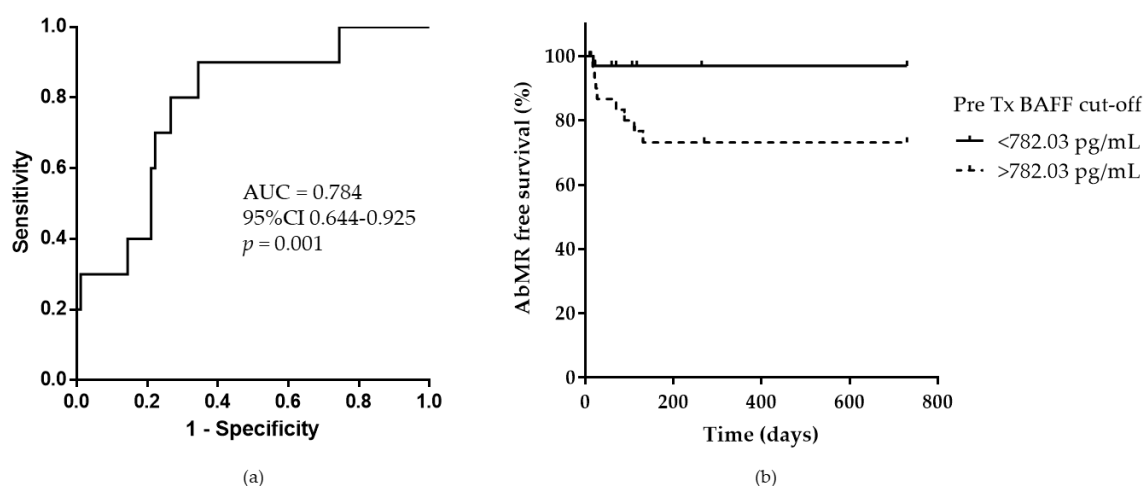


Figure 2. (a) Receiver operational curve analysis of BAFF levels before transplantation and the development of antibody-mediated rejection (AbMR) during the first 12 months after kidney transplantation. The area under curve (AUC) is 78.4%. Based on Youden's index, a cut-off of 782.03 pg/mL pretransplant BAFF levels discriminate between clinical AbMR and non-rejection in the first 12 months after kidney transplantation with a sensitivity and specificity of 80% and 73.3%, respectively. (b) AbMR free survival between patients with BAFF levels higher and lower than 782.03 pg/mL.

Cox regression analysis confirmed a significant, independent role of pretransplant serum BAFF levels in the development of AbMR during the first 12 months after KT, HR 1.002; 95%CI 1.001–1.003, $p = 0.008$. Covariates included in the analysis were pretransplant anti-HLA antibodies, pretransplant DSA, a number of previous transplants, total HLA (HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1) mismatches, induction therapies, cold ischemia time (CIT), and delayed graft function (DGF). A high level of serum BAFF was a risk factor for the development of the event, irrespective of classical variables. An increase of 100 pg/mL of BAFF levels increased 1.35 times the risk of AbMR. When Cox regression analysis was performed after stratifying KT patients according to the cut-off of 782.03 pg/mL, pretransplant serum BAFF levels confirmed their independent role in the development of AbMR in the first 12 months after KT, HR 6.945; 95%CI 1.415–34.082, $p = 0.017$, indicating that patients with pretransplant serum BAFF levels higher than 782.03 pg/mL presented around seven times more risk of developing AbMR.

Similar results were obtained in the multivariate regression analysis in order to determine the independent role of pretransplant serum BAFF levels in the development of AbMR during the first 12 months after KT, HR 1.003; 95%CI 1.001–1.005, $p = 0.004$. The same covariates as in Cox regression analysis were included.

2.2. Pretransplant B Cell Subpopulations Distribution in AbMR Patients

First of all, we performed an extensive immunophenotyping of pretransplant B and T cell repertoires of KT recipients considering the presence of clinical AbMR compared with 40 HS. As in other publications, KT patients showed a significant B-cell depletion that resulted in a reduction of absolute numbers and percentages of pretransplant B cells in the KT group compared with HS. However, absolute B cell numbers of KT patients that developed a clinical AbMR did not differ from stable KT patients.

Analyzing the naïve B cell stage, we found that KT patients who suffered clinical AbMR showed a significant reduction in absolute numbers and percentages of transitional B cells, specifically type 2 (T2), which is characterized by the expression of CD5^{low} when compared with stable KT patients (0.52; IQR 0.11–1.51 cells/ μ L vs. 1.35; IQR 0.54–2.88 cell/ μ L and 0.15; IQR 0.09–0.92% vs. 1.34; IQR 0.40–2.57%, $p = 0.039$ and $p = 0.003$, respectively), and with HS (Figure 3).

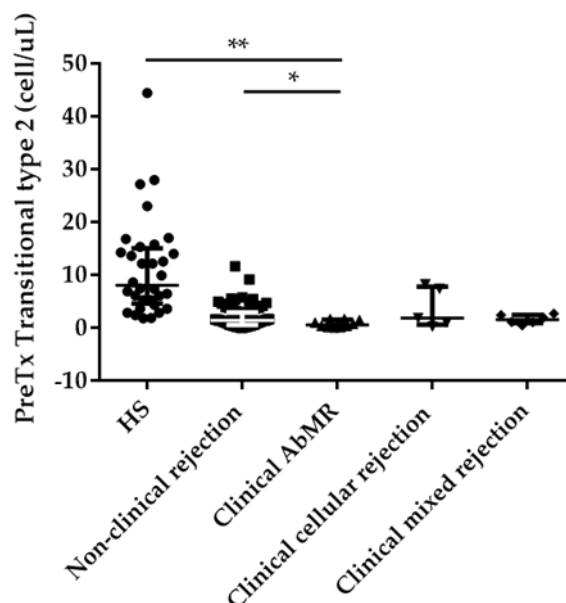


Figure 3. Significant reduction in the absolute number of pretransplant transitional type 2 cells in antibody-mediated rejection (AbMR; $n = 11$) when compared with the non-rejection group ($n = 87$) and healthy subjects (HS; $n = 40$). * indicates $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$

Besides, we observed that AbMR patients showed an abnormal distribution of other pretransplant B-cell subpopulations, such as naïve ($CD19^+ IgD^+ CD27^-$) and switched memory ($CD19^+ IgD^- CD27^+$) B cells. These patients presented significantly lower levels of naïve B cells (33.65; IQR 22.60–61.31 cells/ μ L) when compared with KT patients without clinical rejection (59.61; IQR 32.39–97.07 cells/ μ L), and with HS (128.54; IQR 71.13–172.53 cells/ μ L), $p = 0.04$ and $p < 0.001$, respectively. On the other hand, patients with AbMR had significantly higher levels of switched memory B cells (41.93; IQR 31.03–52.53 cells/ μ L), than the rejection-free group (20.39; IQR 8.28–32.87 cells/ μ L) or HS (30.42; IQR 20.18–45.38 cells/ μ L), $p = 0.001$ and $p = 0.11$, respectively (Figure 4a,b). Considering the ratio between naïve and memory (switched + unswitched) B cells, this ratio is reduced in patients who suffered AbMR in comparison with stable patients and healthy volunteers, $p < 0.001$ in both cases (Figure 4c).

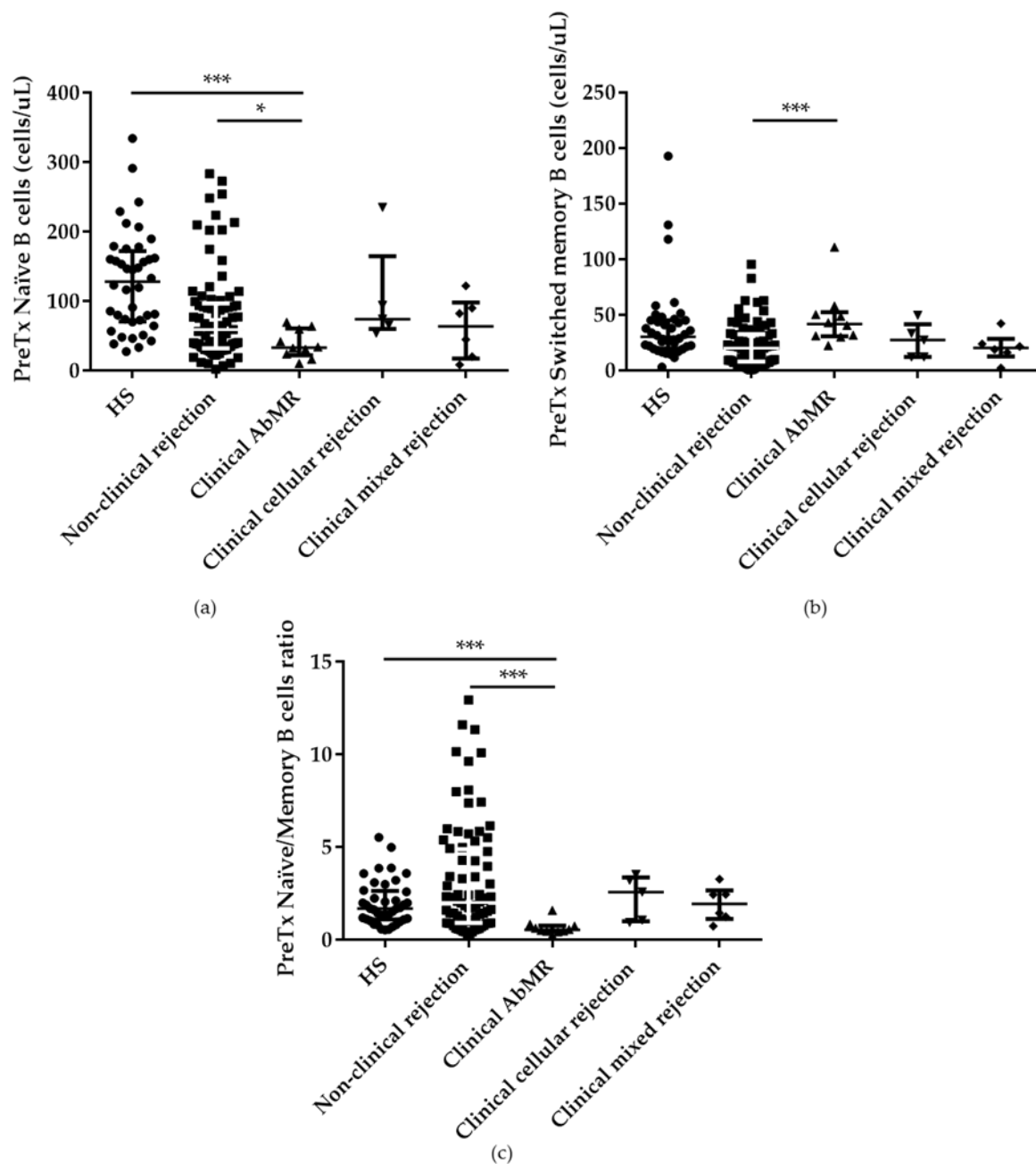


Figure 4. Abnormal ratio between pretransplant naïve and memory B cells. **(a)** Significant reduction of absolute numbers of naïve B cells in antibody-mediated rejection (AbMR) patients ($n = 11$). **(b)** Higher numbers of switched memory B cells in patients that developed AbMR. **(c)** Reduction of pretransplant naïve/memory B cells ratio between AbMR patients and non-clinical rejection group ($n = 87$) and healthy subjects (HS; $n = 40$). * indicates $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$

Similar results were obtained when the B cell compartment was analyzed using the Bm1–Bm5 classification in order to identify different developmental stages from naïve to memory B cells [36]. Bm2 and Bm2' subpopulations corresponded to activated B cells, whereas Bm5 and eBm5 subpopulations grouped memory B cells. As we have seen before, patients with AbMR presented lower levels of activated B cells (Bm2 + Bm2'; 36.07; IQR 16.66–69.21 cells/ μ L) than non-rejection KT group (61.32; IQR 36.96–92.81 cell/ μ L) or HS (105.21; IQR 60.42–161.93 cells/ μ L), $p = 0.045$ and $p = 0.001$, respectively. On the contrary, AbMR patients showed higher levels of memory B cells (Bm5 + eBm5) compared with non-rejection group ($p = 0.05$) and HS ($p = ns$). The ratio (Bm2 + Bm2')/(Bm5 + eBm5) was significantly reduced in patients with AbMR (1.12; IQR 0.61–1.46 cells/ μ L) compared with

non-rejection KT patients (2.80; IQR 1.80–4.96 cells/ μ L) and healthy controls (2.47; IQR 1.60–3.61 cells/ μ L), $p < 0.001$ in both comparisons (Figure 5).

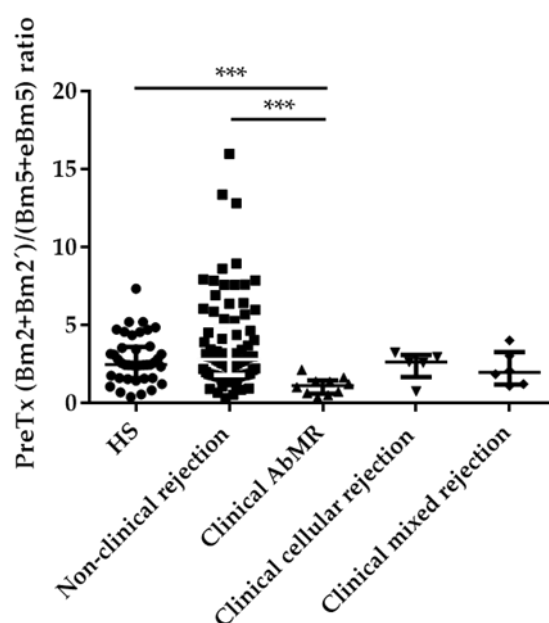


Figure 5. Predominance of pretransplant memory B cells subpopulations (Bm5 + eBm5) in antibody-mediated rejection (AbMR; $n = 11$) in comparison with non-rejection group ($n = 87$) and healthy subjects (HS; $n = 40$). *** indicates $p < 0.001$

To assess the independent role of pretransplant BAFF levels and other B cell subpopulations that showed significant results when they were compared between AbMR and the non-rejection group in the development of clinical AbMR during the first 12 months after kidney transplantation, a multivariate regression analysis was performed including variables classically involved in this process, such as pretransplant anti-HLA antibodies, pretransplant DSA, a number of previous transplants, total HLA (HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1) mismatches, induction therapies, CIT, and DGF. BAFF levels (HR 1.006, 95%CI 1.001–1.011, $p = 0.014$), switched memory B cells (HR 1.050, 95%CI 1.002–1.105, $p = 0.065$) and naïve/memory B cells ratio (HR 0.03, 95%CI 0.001–0.706, $p = 0.03$) were independently associated with AbMR, irrespectively of other classical variables. The higher the BAFF levels and the number of switched memory B cells, the higher the risk of AbMR. Conversely, an increase in the naïve/memory B cells ratio was a protective factor for the development of the clinical event. Collinearity was tested for switched memory B cells and naïve/memory B cells ratio in order to be included in the analysis ($p = 0.775$).

2.3. Pretransplant T cell Subpopulations Distribution in AbMR Patients

T cell compartment was also studied as a result of the cooperation between B and T cells, where T cell responses can be influenced by the activity of B cells through co-stimulation signaling and cytokine production. The absolute numbers of CD4⁺ T cells were reduced in patients with AbMR compared with HS. However, the percentages were similar between patients with AbMR, non-rejection KT patients, and HS. When the different T cell subpopulations (naïve, central memory, effector memory, and TEMRA) were compared, patients with AbMR presented a depletion of CD4⁺ naïve T cells (29.99; IQR 15.49%–38.78%) with respect to non-rejection patients (42.47; IQR 23.46%–59.70%) and healthy controls (58.32; IQR 39.66%–66.58%), $p = 0.038$ and $p < 0.001$, respectively. Conversely, higher levels of CD4⁺ TEMRA T cells were observed in these patients (12.90; IQR 4.71%–17.95%) in comparison with stable patients (3.29; IQR 1.40%–7.78%) and HS (0.50; IQR 0.26%–1.11%), $p = 0.003$ and $p < 0.001$, respectively.

Similar results were found when CD8⁺ T cell subpopulations were studied, KT patients who suffered a clinical AbMR showed a reduction of CD8⁺ naïve T cells and a predominance of CD8⁺ TEMRA T cells.

Considering this different distribution of T cells subpopulations in AbMR patients, a polarization towards a preactivated state was observed in this group of patients, since the naïve/TEMRA ratio was significantly diminished in AbMR patients when compared with non-rejection group and HS, $p = 0.002$ and $p < 0.001$, respectively in CD4⁺ T cells and $p = 0.006$ and $p < 0.001$, respectively in CD8⁺ T cells (Figure 6a,b).

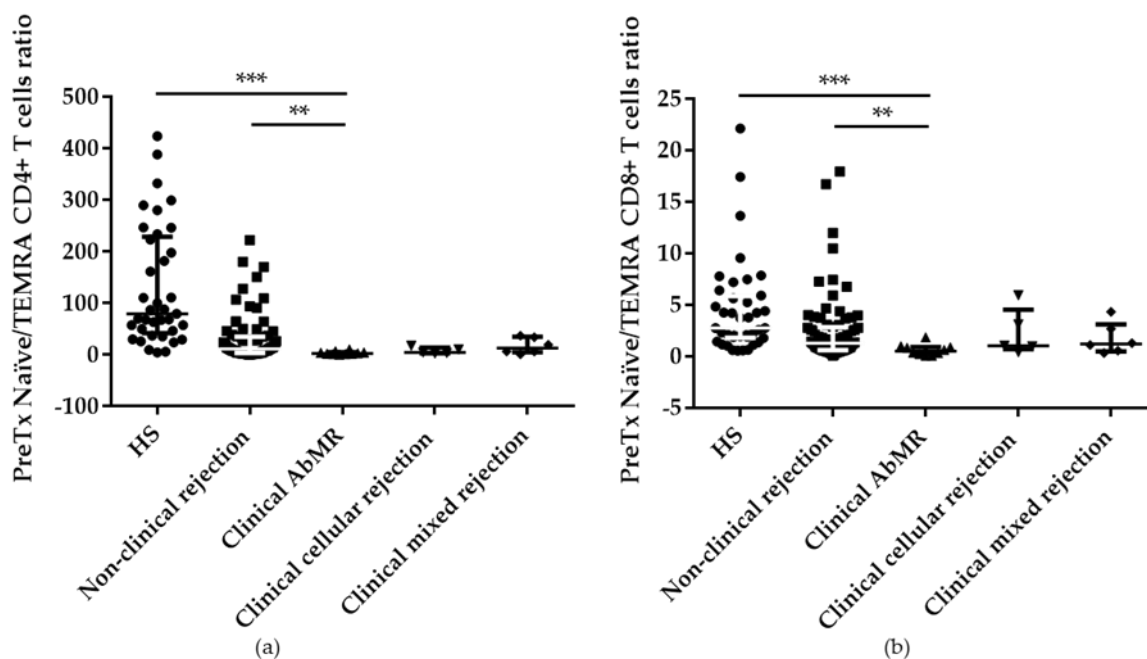


Figure 6. Predominance of a preactivated state in antibody-mediated rejection (AbMR) patients ($n = 11$) in comparison with non-rejection group ($n = 87$) and healthy subjects (HS; $n = 40$), reflected off by a reduction of pretransplant naïve/TEMRA CD4⁺ (a) and CD8⁺ (b) T cells ratio. ** indicates $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$

2.4. Serum BAFF Levels at 6 and 12 Months Posttransplantation in Subclinical AbMR Patients

For the prospective study, the 51 selected patients were included (see Material and Methods). Patients who suffered subclinical AbMR presented higher serum BAFF levels at 6 (895.70; IQR 722.44–1016.02 pg/mL) and 12 months (1035.91; IQR 718.87–1100.12 pg/mL) posttransplantation in comparison with non-rejection patients (577.13; IQR 417.73–812.61 pg/mL and 619.17; IQR 446.38–798.15 pg/mL), $p = 0.048$ and $p = 0.045$, respectively (Figure 7a,b).

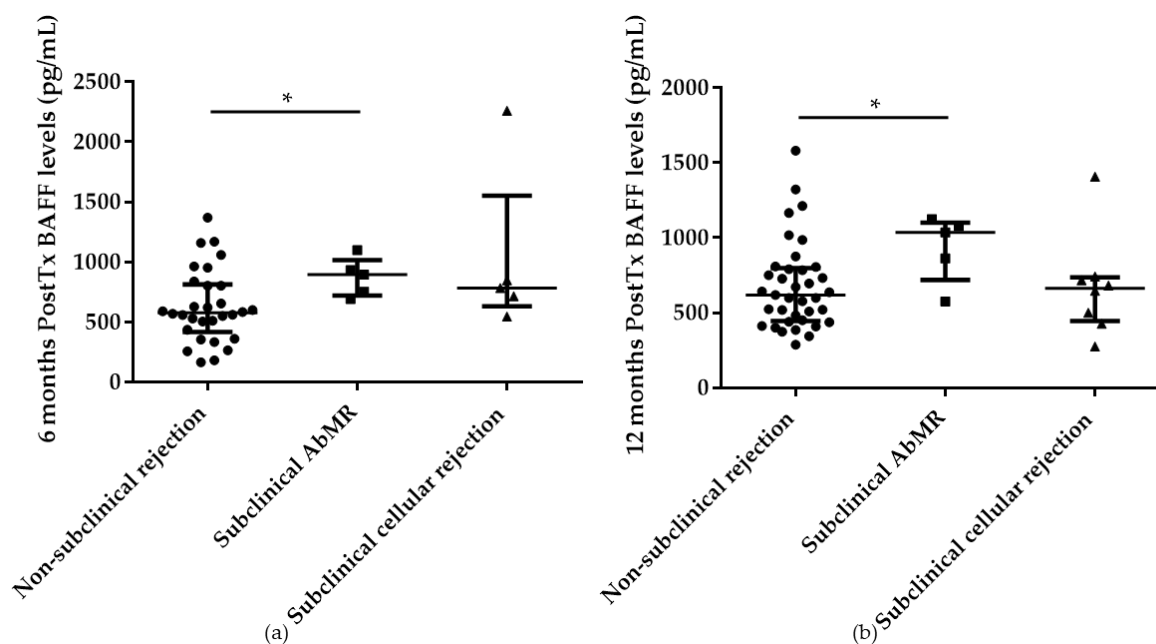


Figure 7. Higher BAFF serum levels at 6 (a) and 12 months (b) after kidney transplantation in patients with subclinical antibody-mediated rejection (AbMR; $n = 5$) detected retrospectively in the surveillance biopsy performed at 1 year after kidney transplantation, in comparison with non-rejection group ($n = 38$). * indicates $p < 0.05$

Area under the ROC curve of soluble BAFF at 6 and 12 months after KT for predicting subclinical AbMR detected retrospectively in the surveillance biopsy performed at 1 year after KT were 0.754 (95%CI 0.604–0.905) and 0.778 (95%CI 0.587–0.968), respectively. Based on this analysis and applying Youden's index, the best cut-off point for a discriminate between low and high BAFF levels at 6 months after KT was 734.22 pg/mL, with a sensitivity and a specificity of 80% and 65.7%, respectively. At 12 months after KT the optimal cut-off point of BAFF levels was 835.94 pg/mL, with a sensitivity of 80% and a specificity of 82.2%.

A multivariate regression analysis confirmed the independent role of serum BAFF levels at 12 months after KT in the development of subclinical AbMR detected in the surveillance biopsy performed at 1 year after KT, HR 1.004; 95%CI 1.001–1.008, $p = 0.026$. Covariates included in the analysis were anti-HLA antibodies and DSA at 6 and 12 months after KT, number of previous transplants, total HLA (HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1) mismatches, induction therapies, CIT, and sustained DGF. When the multivariate analysis was performed after stratifying KT patients according to the cut-off of 835.94 pg/mL, serum BAFF levels at 12 months after KT confirmed their independent role in the development of subclinical AbMR, HR 18.5; 95%CI 1.817–188.389, $p = 0.014$, indicating that high levels of serum BAFF at 12 months after KT increase the risk of developing AbMR.

In order to establish BAFF serum levels as a useful biomarker for evaluating renal function and predicting the development of AbMR a positive correlation was observed between the albumin/creatinine ratio at surveillance biopsy and serum BAFF levels at 6 months ($r = 0.326$, $p = 0.04$) and at 12 months ($r = 0.340$, $p = 0.016$).

2.5.B and T cell Subpopulations Distribution at 6 and 12 Months after Kidney Transplantation in Subclinical AbMR Patients

As it is well known, induction therapy causes significant cell depletion. However, this effect in contrast to CD4⁺ and CD8⁺ T cells does not affect CD19⁺ B cells.

Regarding what we have seen when pretransplant B cell subpopulations were studied, patients with subclinical AbMR presented a reduction in absolute numbers of transitional T2 cells at 6 months

(0.21; IQR 0.08–1.24 cells/ μ L) and 12 months (0.38; IQR 0.11–0.89 cells/ μ L) when compared with the non-rejection group (1.11; IQR 0.72–2.24 cells/ μ L and 1.38; IQR 0.87–2.40 cells/ μ L), $p = 0.067$ and $p = 0.005$, respectively.

A tendency to an increase in memory B cell subpopulations was also detected at 6 months and it was confirmed at 12 months after KT where a statistically significant reduction in the naïve/memory B cells ratio and $(Bm2 + Bm2')/(Bm5 + eBm5)$ ratio were observed in patients with subclinical AbMR in comparison with non-rejection KT patients, $p = 0.05$ and $p = 0.002$, respectively (Figure 8a,b).

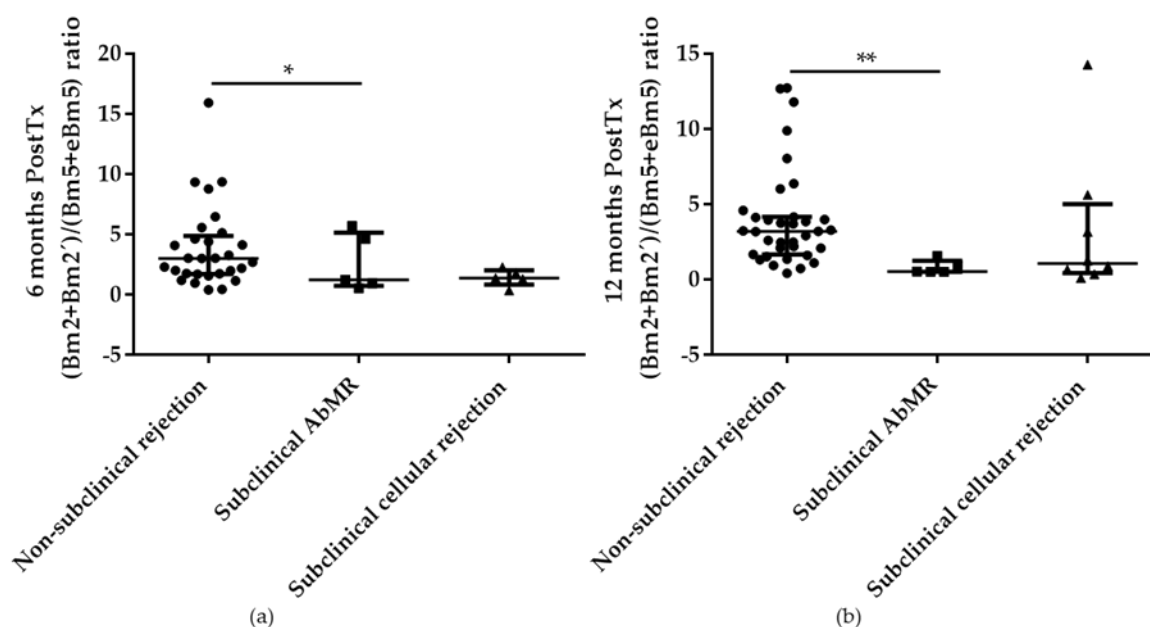


Figure 8. Significant reduction of active/memory B cells ratio between patients with subclinical antibody-mediated rejection (AbMR; $n = 5$) detected retrospectively in the surveillance biopsy performed at 1 year after kidney transplantation, and non-rejection patients ($n = 38$) at 6 months (a) and 12 months (b) after kidney transplantation. * indicates $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$

At 12 months after kidney transplantation no differences were observed in T cells subpopulations between the analyzed groups. Nevertheless, at 6 months posttransplantation an increase in CD4⁺ TEMRA cells and therefore, a reduction in CD4⁺ naïve/TEMRA ratio was observed in patients with subclinical AbMR when compared with non-rejection group, $p = 0.012$.

3. Discussion

Unlike the results showed by different groups where no differences were found in BAFF levels between kidney transplant recipients and controls [31] indicating that this molecule is not a prognostic marker for allograft dysfunction, or that no correlation exists between BAFF and the production of DSA before and after transplantation [32], in the present study we observed that patients with AbMR presented higher levels of BAFF before transplantation, being also elevated BAFF serum levels in those patients with anti-HLA antibodies and DSA. These results are in a relationship published by other authors showing that BAFF is associated with allograft survival [37], acute antibody-mediated rejection as well as the presence of DSA [28,29,38]. A meta-analysis published recently also corroborates our results, indicating that the incidence of antibody-mediated rejection is higher in those patients with higher levels of serum BAFF. BAFF levels are higher in patients with anti-HLA antibodies too [34]. Taking all of this into account and considering the results that we have obtained, we suggest that pretransplant serum BAFF levels could be an important non-invasive biomarker for the prediction of the development of antibody-mediated rejection, independently of classical variables. Even though the effect of an increase of 1 pg/mL of BAFF levels is limited, an increase of 100 pg/mL of BAFF levels increases 1.35 times the risk of developing

antibody-mediated rejection during the first years after kidney transplantation, which is not negligible. In addition, after stratifying kidney transplant patients in high and low groups according to their pretransplant serum BAFF levels, the effect of having higher pretransplant BAFF levels increased around seven times the risk of developing antibody-mediated rejection during the first 12 months after kidney transplantation. We also observed that serum BAFF levels, measured at 6 and at 12 months after transplantation were also higher in those patients with subclinical antibody-mediated rejection detected in the surveillance biopsy, corroborating the possible contribution of BAFF to the pathogenesis of antibody-mediated graft damage. Considering this aspect, Won Min et al. described that while pretransplant BAFF levels showed significant association with early rejection, posttransplant BAFF levels measured at the time of indication biopsy are not associated with allograft rejection [25]. It is important to highlight some relevant aspects of our study such as the prospective monitoring of the kidney transplant patients at 6 and at 12 months after kidney transplantation, which differentiates it from other transversal studies or with a shorter period of follow-up [28,29]. In the same way we would like to emphasize the importance of surveillance biopsy that gives up data about the possible existence of a subclinical rejection. To our knowledge this is the first study that combines the monitoring of serum BAFF levels and B and T cell subpopulations in order to study their association with the development of antibody-mediated rejection in kidney transplant patients.

Another relevant aspect is the well-established role of BAFF in the development of autoimmune diseases. It is known that elevated levels of serum BAFF in patients with autoimmune diseases correlate with the severity of the disease [39–42], as well as with levels of pathogenic autoantibodies [40,43,44]. Therefore, it could be possible to establish an interrelationship between these two different processes, the autoimmune response and the alloresponse in transplantation. BAFF could be an important player in the pathogenesis of both processes, promoting the production of autoantibodies and anti-HLA antibodies, respectively, and with that the outbreak of the autoimmune and rejection processes.

In order to avoid both mentioned situations, tolerance mechanisms are essential and B cells play an important role on them. Several B cell features have been associated with the occurrence of operational tolerance in kidney transplant recipients. Among these features, it should be highlighted that tolerant patients display a redistribution of B cell subsets, with a decrease in memory cells and an increase in transitional and naïve B cells, as well as a gene expression pattern dominated by B cell related genes, that can allow us to discriminate acute kidney allograft rejection from stable graft function [45–47]. In the present study, and in agreement with other publications [48], we observed that kidney transplant patients who suffered antibody-mediated rejection, opposite to tolerant patients, presented lower levels of pretransplant transitional and naïve B cells and higher levels of memory B cells. Therefore, antibody-mediated rejection patients showed reduced levels of transitional B cells, which are described as regulatory cells [49], and increased levels of switched memory B cells that present a strong antigen-presenting capacity and are mainly involved in antibody production. This aspect can be facilitated by the presence of high levels of serum BAFF in this type of patient, which contributes to the survival and differentiation of mature B cells. The promotion of a mature B cell reaction is also dependent on T–B cell cooperation and, accordingly, our data point for a balance toward a more mature phenotype in CD4⁺ T cells.

However, there are some limitations in our study. Despite being similar figures of patients with antibody-mediated rejection to those described in literature, the inclusion of more patients would be needed. In the same way, analysis of samples at multiple time points between transplantation and the appearance of the clinical event could be necessary in order to determine a better knowledge of the dynamics of B cell subpopulations.

In conclusion, in this study we established together the role of BAFF and B cell subsets before and after transplantation in the development of antibody-mediated rejection, proposing that higher BAFF levels as well as an increase in the memory B cell repertoire contribute to the pathogenesis of antibody-mediated graft damage and could be considered as an independent non-invasive biomarker for predicting and diagnosis of rejection.

4. Materials and Methods

4.1. Patients

The study was conducted following the rules of Declaration of Helsinki and approved by the Regional Ethics Committee in our Institution (reference number: 2014/161; 1 August 2014). A total of 109 consecutive kidney transplants performed in HUMV from February 2015 to February 2018 were recruited for the study after given written consent prior kidney transplantation. KT patients treated with rituximab before kidney transplantation were excluded from the study. The main demographic, immunological, and clinical parameters are summarized in Table 1 and Supplementary Table S1. The patients were prospectively monitored prior KT and subsequently 6 and 12 months after KT. Indication graft biopsies were performed due to the presence of a sustained delayed graft function, an increase of serum creatinine or proteinuria development. Surveillance biopsies were routinely carried out at one-year after transplantation. All the biopsies performed were reclassified according to the Banff 2017 criteria. Antibody mediated rejection was diagnosed following the Banff criteria [50]. Forty sex-age matched healthy subjects (HS) were tested for immunological parameters as control.

Table 1. Demographic, clinical, and immunological parameters of kidney transplant patients.

	<i>n</i>	ESRD (<i>n</i> = 109)		
		Mean / Median	SD / IQR	%
Recipient age (years)	109	55	43–62	
Recipient gender (male %)				57.8
Etiology of ESRD ¹ :				
Glomerular	37			33.9
Diabetes mellitus	28			25.7
PKD	16			14.7
Interstitial	9			8.3
Vascular	8			7.3
Non-filiated	7			6.4
Other causes	4			3.7
Retransplantation	23			21.1
Hypersensitized (>90%)	7			6.4
PreTx Anti-HLA Ab	33			30.3
PreTx DSA	3			2.8
Donor age (years)		52	44–62	
DGF	26			23.9
CIT (hours)		17	9–21	
Induction therapy:	78			71.6
Thymoglobulin	53			67.9
Basiliximab	25			32.1
Biopsy C4d+	13			59.1
Biopsy g+ptc ≥ 2	18			81.8
Clinical rejection	22			20.2
Clinical AbMR	11			10.1
HLA-A Mismatches		1.21	0.63	
HLA-B Mismatches		1.50	0.62	
HLA-C Mismatches		1.37	0.62	
HLA-DRB1 Mismatches		1.32	0.67	
HLA-DQB1 Mismatches		1.04	0.67	

ESRD: end-stage renal disease; PKD: polycystic kidney disease; DGF: delayed graft function; CIT: cold ischemia time; AbMR: antibody-mediated rejection; PreTx: pre transplantation.

Surveillance biopsy was routinely performed at one year after KT in 70 patients after given written informed consent.

For the prospective analysis at 6 and 12 months after KT, 51 patients without clinical rejection during the first 12 months, which did not received any treatment (thymoglobulin, rituximab, plasmapheresis, or intravenous immunoglobulin) apart from induction therapies and maintenance immunosuppressive treatments, and with a surveillance biopsy that showed the possibility of the development of a subclinical AbMR were included. Results from surveillance biopsies showed that five of these patients (9.8%) developed a subclinical AbMR.

4.2. ELISA serum BAFF levels

The BAFF serum levels were measured by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) following the manufacturer instructions. The sensitivity for BAFF serum levels was 62.5–4000 pg/mL.

4.3. Anti-HLA Antibodies and DSA

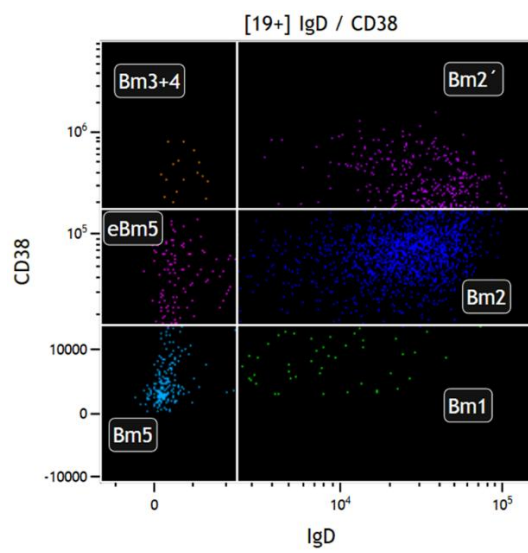
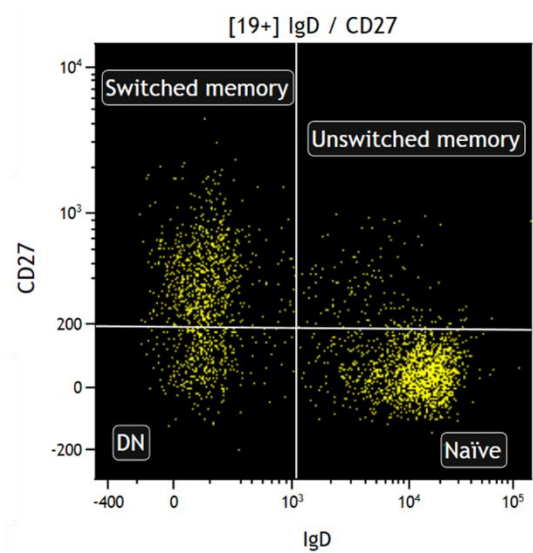
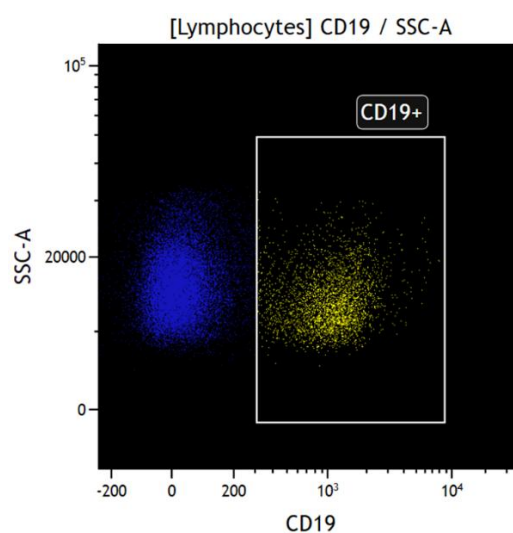
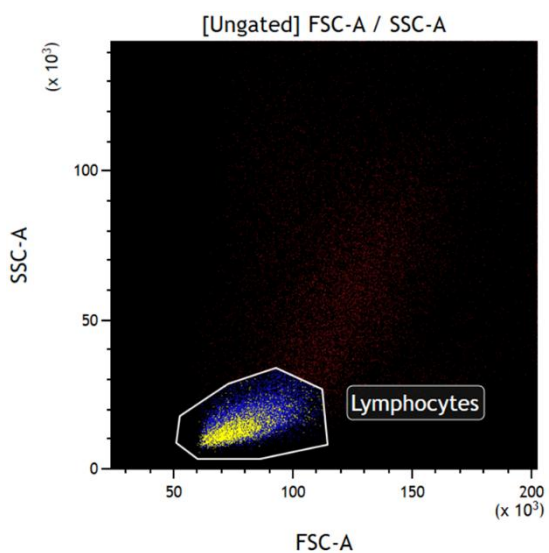
The presence of anti-HLA antibodies was tested using LABScreen Single Antigen Class I and II (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, United States), according to manufacturer's instructions, and analyzed on a Luminex platform (LabScan100, One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA).

HLA typing was performed for HLA locus A, B, C, DRB1, and BQB1 in all patients using sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP) and in all donors by low resolution sequence-specific primers (SSP; One Lambda Inc., Canoga Park, CA, United States).

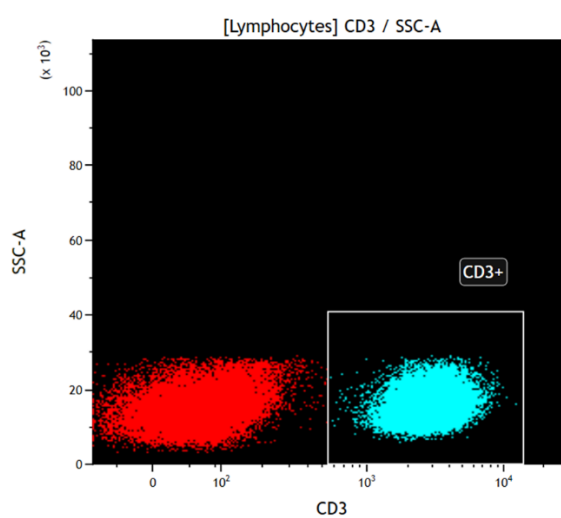
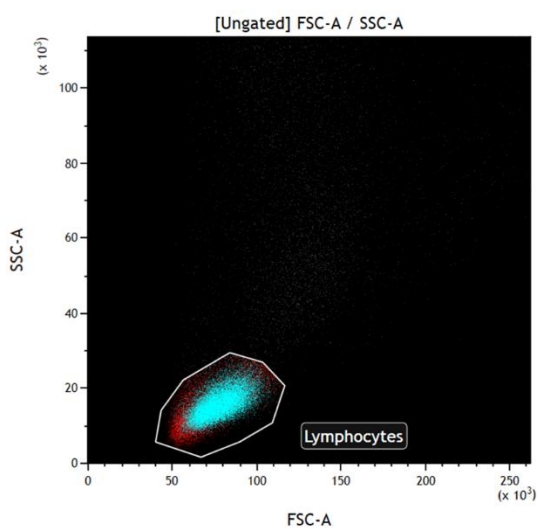
DSA was defined as the anti-HLA antibodies of the recipient corresponding with HLA types of the donor.

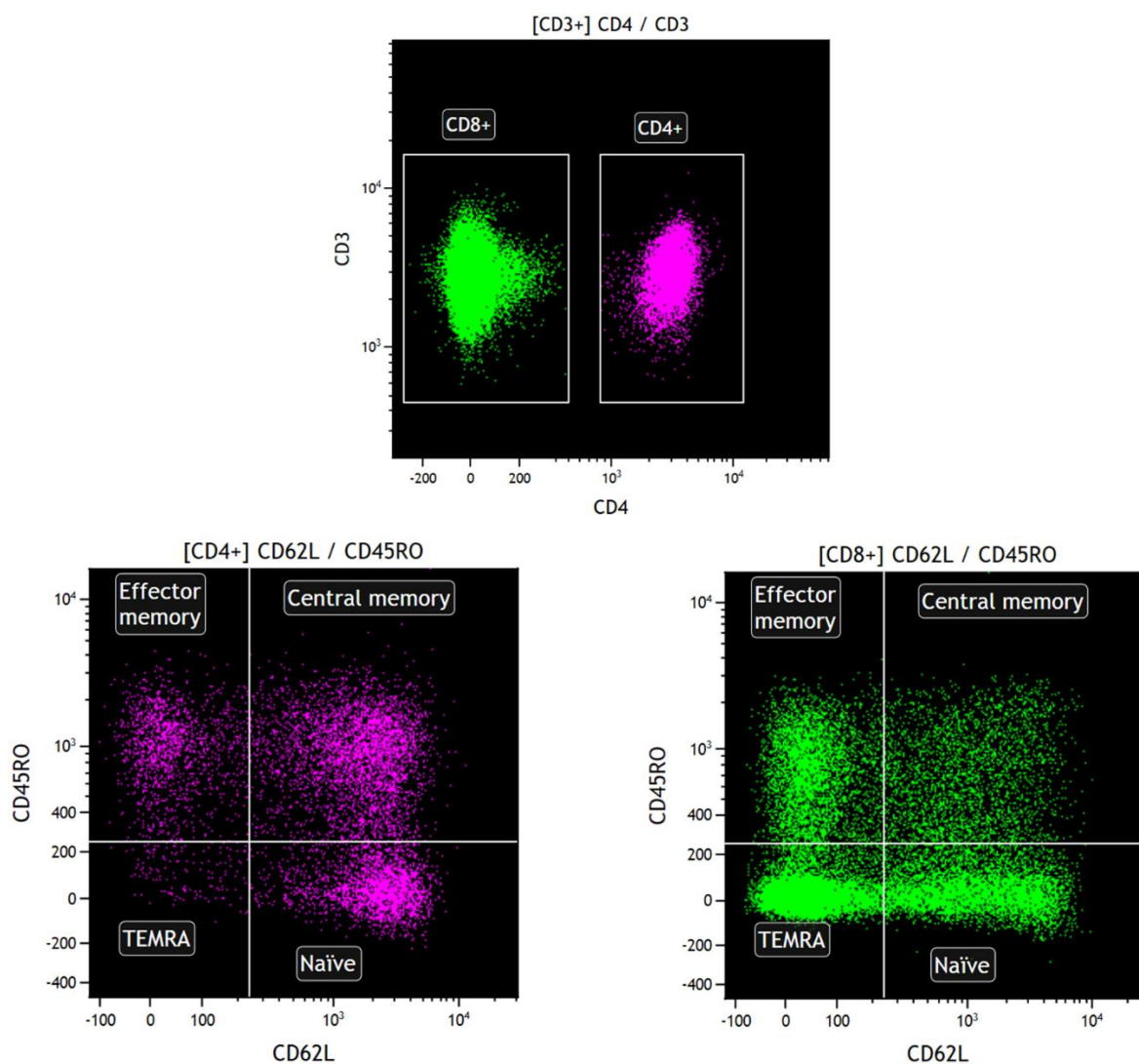
4.4. Flow Cytometry for B Cell Subsets

Peripheral blood samples were freshly stained and processed following standard procedures, as previously described [51]. The following monoclonal antibodies were: anti-CD27-fluorescein isothiocyanate (FITC) clone M-T271, CD138-FITC clone MI15, CD24-phycoerythrin (PE) clone ML5, CD268-PE clone 11C1 and IgM-allophycocyanin (APC) clone G20-127 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), CD19-phycoerythrin-cyanine 5.5 (PC5.5) clone J3-119 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), CD38-PE cyanine 7 (Cy7) clone HIT2, CD5-APC clone UCHT2, CD10-APC Cy7 clone HI10a, CD25-Pacific Blue clone BC96 and IgD-Brilliant Violet 510 clone IA6-2 (BioLegend, San Diego, CA) and CD27-APC Vio770 clone M-T271, CD21-VioBlue clone HB5, and CD20-VioGreen clone LT20 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), to identify different B cell subsets. The following monoclonal antibodies were used to T cell subpopulations identification: anti-CD62L-FITC clone DREG56 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), CD45RO-PE clone UCHL1 (BD Biosciences, San Diego, CA), CD28-PC5.5 clone L293, CD27-PE Cy7 Vio770 clone 1A4CD27, CCR7-APC clone REA108 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), CD4-APC Vio770 clone VIT4, and CD3-VioBlue clone UCHT1 (Immunostep, Salamanca, Spain). The immunophenotype for B and T cell subsets identification were performed as described [52] and are detailed in Supplementary Tables S2 and S3. Gating strategy used for the different B and T cell subpopulations selection is described in Figure 9. Percentages of the different B and T cell subpopulations before transplantation and at 6 and 12 months after kidney transplantation in each of the groups are described in Supplementary Tables S4 and S5.



(a)





(b)

Figure 9. (a). Gating strategy of B cell subpopulations. Lymphocytes were identified by FSC (forward scatter) and SSC (side scatter). From lymphocyte population, CD19⁺ cells were selected, and based on them and according to IgD and CD27 markers, naïve (IgD⁺ CD27⁻), unswitched memory (IgD⁺ CD27⁺), and switched memory (IgD⁻ CD27⁺) B cells were identified. Furthermore, based on CD19⁺ cells and according to IgD and CD38 markers, Bm1 (IgD⁺ CD38⁻), Bm2 (IgD⁺ CD38⁺), Bm2' (IgD⁺ CD38^{high}), Bm3Bm4 (IgD⁻ CD38^{high}), eBm5 (IgD⁻ CD38⁺), and Bm5 (IgD⁻ CD38⁻) cells were identified. Transitional type 2 cells were selected using a different gating strategy in order to obtain a pure population. For this gating strategy, CD19⁺ lymphocytes were selected, and from them those cells CD10⁺, CD20⁺, CD21⁺, CD5⁻, CD24⁺, and CD38⁺. **(b).** Gating strategy of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subpopulations. Lymphocytes were identified by FSC (forward scatter) and SSC (side scatter). From lymphocyte population, CD3⁺ cells were selected, and based on them, CD4⁺ and CD8⁺ cells. Since CD4⁺ and CD8⁺ cells, and according to CD62L and CD45RO markers, naïve (CD62L⁺ CD45RO⁻), central memory (CD62L⁺ CD45RO⁺), effector memory (CD62L⁻ CD45RO⁺), and TEMRA (CD62L⁻ CD45RO⁻) T cells were identified.

4.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS v.22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) and Graph Pad Prism software. The distribution of continuous variables was assessed using Kolmogorov–Smirnov/Shapiro–Wilk tests where indicated. Results were expressed as mean ± standard deviation or median + interquartile range (IQR) for continuous variables and percentages for categorical data.

Comparisons were based on the chi squared test for categorical data and Mann–Whitney test for nonparametric continuous data. Within-group comparison of quantitative variables was undertaken using the Wilcoxon matched-pair test. Spearman rank correlation was used to quantify associations between continuous variables. Receiver operating characteristic (ROC) analysis and Youden’s index were used to determine the optimal cut-point with higher sensitivity and specificity. Rejection free survival was tested by the Kaplan–Meier survival test. Cox and multivariate regression analysis was performed to assess the independent role of the studied variables in the development of AbMR. Collinearity between variables included in the multivariate analysis was also tested. A two-sided p value ≤ 0.05 was considered statistically significant. In the figures * indicates $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/1422-0067/21/3/779/s1.

Author Contributions: All authors have read and agree to the published version of the manuscript. Conceptualization, D.S.S. and M.L.-H.; Methodology, J.I.-V., D.S.S. and M.L.-H.; Software, J.I.-V. and D.M.; Validation, J.I.-V., D.M. and A.B.; Formal Analysis, J.I.-V., D.S.S. and L.B.-V.; Investigation, J.I.-V., D.S.S., E.R. L.B.-V., J.C.R., R.V., D.M., A.B. and M.L.-H.; Resources, D.S.S. and M.L.-H.; Data curation, J.I.-V., E.R., L.B.-V., J.C.R. and R.V.; Writing—Original Draft Preparation, J.I.-V., D.S.S., and M.L.-H.; Writing—Review and Editing, J.I.-V., D.S.S., E.R. J.C.R. and M.L.-H.; Funding Acquisition, D.S.S. and M.L.-H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was partially supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII-FEDER (PI14/00378, PI16/01585 and RD16/0009/0027) and IDIVAL.

Acknowledgments: We are grateful to Sandra Raso and Consuelo Agüero for their excellent technical help.

Conflicts of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Abbreviations

AbMR	Antibody-mediated rejection
DSA	Donor-specific antibodies
BAFF	B-cell activating factor
BAFFR	BAFF receptor
KT	Kidney transplantation
PRA	Panel-reactive antibodies
IQR	Interquartile range
SD	Standard deviation
HS	Healthy subjects
cPRA	Calculated-panel reactive antibodies
ROC	Receiver operational curve
AUC	Area under curve
CI	Confidence interval
Tx	Transplantation
CIT	Cold ischemia time
DGF	Delayed graft function
HR	Hazard ratio
ESRD	End stage renal disease
PKD	Polycystic kidney disease
PreTx	Pre-transplantation
PostTx	Post-transplantation
SSOP	Sequence-specific oligonucleotide probes
SSP	Sequence-specific primers
FITC	Fluorescein isothiocyanate
PE	Phycoerythrin
APC	Allophycocyanin
Cy5.5	Cyanine 5.5
Cy7	Cyanine 7

References

1. Clatworthy, M.R. Targeting B Cells and Antibody in Transplantation. *Am. J. Transplant.* **2011**, *11*, 1359–1367, doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03554.x.
2. Redfield, R.R.; Rodriguez, E.; Parsons, R.; Vivek, K.; Mustafa, M.M.; Noorchashm, H.; Naji, A. Essential Role for B Cells in Transplantation Tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* **2011**, *23*, 685–691, doi:10.1016/J.COI.2011.07.011.
3. Kirk, A.D.; Turgeon, N.A.; Iwakoshi, N.N. B Cells and Transplantation Tolerance. *Nat. Rev. Nephrol.* **2010**, *6*, 584–593, doi:10.1038/nrneph.2010.111.
4. Lund, F.E.; Randall, T.D. Effector and Regulatory B Cells: Modulators of CD4+ T Cell Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 236–247, doi:10.1038/nri2729.
5. Gaston, R.S.; Cecka, J.M.; Kasiske, B.L.; Fieberg, A.M.; Leduc, R.; Cosio, F.C.; Gourishankar, S.; Grande, J.; Halloran, P.; Hunsicker, L.; et al. Evidence for Antibody-Mediated Injury as a Major Determinant of Late Kidney Allograft Failure. *Transplantation* **2010**, *90*, 68–74, doi:10.1097/TP.0b013e3181e065de.
6. Baldwin, W.M.; Valujskikh, A.; Fairchild, R.L. Mechanisms of Antibody-Mediated Acute and Chronic Rejection of Kidney Allografts. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **2016**, *21*, 7–14, doi:10.1097/MOT.0000000000000262.
7. Sellarés, J.; de Freitas, D.G.; Mengel, M.; Reeve, J.; Einecke, G.; Sis, B.; Hidalgo, L.G.; Famulski, K.; Matas, A.; Halloran, P.F. Understanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody-Mediated Rejection and Nonadherence. *Am. J. Transplant* **2012**, *12*, 388–399, doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03840.x.
8. Roufosse, C.; Simmonds, N.; Clahsen-van Groningen, M.; Haas, M.; Henriksen, K.J.; Horsfield, C.; Loupy, A.; Mengel, M.; Perkowska-Ptasińska, A.; Rabant, M.; et al. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation* **2018**, *102*, 1795–1814, doi:10.1097/TP.0000000000002366.
9. Mackay, F.; Schneider, P.; Rennert, P.; Browning, J. BAFF AND APRIL: A Tutorial on B Cell Survival. *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *21*, 231–264, doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141152.
10. Hengeveld, P.J.; Kersten, M.J. B-Cell Activating Factor in the Pathophysiology of Multiple Myeloma: A Target for Therapy? *Blood Cancer J.* **2015**, *5*, e282, doi:10.1038/bcj.2015.3.
11. Vigolo, M.; Chambers, M.G.; Willen, L.; Chevalley, D.; Maskos, K.; Lammens, A.; Tardivel, A.; Das, D.; Kowalczyk-Quintas, C.; Schuepbach-Mallepell, S.; et al. A Loop Region of BAFF Controls B Cell Survival and Regulates Recognition by Different Inhibitors. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1199, doi:10.1038/s41467-018-03323-8.
12. Rauch, M.; Tussiwand, R.; Bosco, N.; Rolink, A.G. Crucial Role for BAFF-BAFF-R Signaling in the Survival and Maintenance of Mature B Cells. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5456, doi:10.1371/journal.pone.0005456.
13. Schweighoffer, E.; Tybulewicz, V.L. Signalling for B Cell Survival. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2018**, *51*, 8–14, doi:10.1016/j.ceb.2017.10.002.
14. Hoek, K.L.; Carlesso, G.; Clark, E.S.; Khan, W.N. Absence of Mature Peripheral B Cell Populations in Mice with Concomitant Defects in B Cell Receptor and BAFF-R Signaling. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 5630–5643, doi:10.4049/jimmunol.0901100.
15. Thauinat, O.; Patey, N.; Gautreau, C.; Lechaton, S.; Fremeaux-Bacchi, V.; Dieu-Nosjean, M.-C.; Cassuto-Viguié, E.; Legendre, C.; Delahousse, M.; Lang, P.; et al. B Cell Survival in Intragraft Tertiary Lymphoid Organs after Rituximab Therapy. *Transplantation* **2008**, *85*, 1648–1653, doi:10.1097/TP.0b013e3181735723.
16. Tangye, S.G.; Bryant, V.L.; Cuss, A.K.; Good, K.L. BAFF, APRIL and Human B Cell Disorders. *Semin. Immunol.* **2006**, *18*, 305–317, doi:10.1016/j.smim.2006.04.004.
17. Mackay, F.; Schneider, P. Cracking the BAFF Code. *Nat. Publ. Group* **2009**, *9*, 491–502, doi:10.1038/nri2572.
18. Vincent, F.B.; Morand, E.F.; Schneider, P.; Mackay, F. The BAFF/APRIL System in SLE Pathogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2014**, *10*, 365–373, doi:10.1038/nrrheum.2014.33.
19. Thompson, N.; Isenberg, D.A.; Jury, E.C.; Ciurtin, C. Exploring BAFF: Its Expression, Receptors and Contribution to the Immunopathogenesis of Sjögren’s Syndrome. *Rheumatology* **2016**, *55*, 1548–1555, doi:10.1093/rheumatology/kev420.
20. Wei, F.; Chang, Y.; Wei, W. The Role of BAFF in the Progression of Rheumatoid Arthritis. *Cytokine* **2015**, *76*, 537–544, doi:10.1016/j.cyto.2015.07.014.

21. Matsushita, T.; Hasegawa, M.; Yanaba, K.; Kodera, M.; Takehara, K.; Sato, S. Elevated Serum BAFF Levels in Patients with Systemic Sclerosis: Enhanced BAFF Signaling in Systemic Sclerosis B Lymphocytes. *Arthritis Rheum.* **2006**, *54*, 192–201, doi:10.1002/art.21526.
22. Kannel, K.; Alnek, K.; Vahter, L.; Gross-Paju, K.; Uibo, R.; Kisand, K.V. Changes in Blood B Cell-Activating Factor (BAFF) Levels in Multiple Sclerosis: A Sign of Treatment Outcome. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143393, doi:10.1371/journal.pone.0143393.
23. Schuster, A.; Jung, B.; Hofbauer, J.; Kühne, L.; Zecher, D.; Banas, B.; Bergler, T. B-Cell Activating Factor BAFF Reflects Patients' Immunological Risk Profile after Kidney Transplantation. *Transpl. Immunol.* **2017**, *45*, 35–41, doi:10.1016/j.trim.2017.08.006.
24. Friebus-Kardash, J.; Wilde, B.; Keles, D.; Heinold, A.; Kribben, A.; Witzke, O.; Heinemann, F.M.; Eisenberger, U. Pretransplant Serum BAFF Levels Are Associated with Pretransplant HLA Immunization and Renal Allograft Survival. *Transpl. Immunol.* **2018**, *47*, 10–17, doi:10.1016/j.trim.2017.12.004.
25. Min, J.W.; Kim, K.W.; Kim, B.-M.; Doh, K.C.; Choi, M.S.; Choi, B.S.; Park, C.W.; Yang, C.W.; Kim, Y.-S.; Oh, E.-J.; et al. Clinical Significance of Pre- and Post-Transplant BAFF Levels in Kidney Transplant Recipients. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162964, doi:10.1371/journal.pone.0162964.
26. Xu, H.; He, X.; Liu, Q.; Shi, D.; Chen, Y.; Zhu, Y.; Zhang, X. Abnormal High Expression of B-Cell Activating Factor Belonging to the TNF Superfamily (BAFF) Associated with Long-Term Outcome In. *TPS* **2009**, *41*, 1552–1556, doi:10.1016/j.transproceed.2008.10.024.
27. Sango, C.; Merino, D.; San Segundo, D.; Rodrigo, E.; Lopez-Hoyos, M.; Benito, A.; Ángeles Ramos, M.; Gómez-Román, J.; Arias, M. B-Cell-Activating Factor Levels Are Associated with Antibody-Mediated Histological Damage in Kidney Transplantation. *Transplant. Proc.* **2016**, *48*, 2910–2912, doi:10.1016/j.transproceed.2016.09.019.
28. Banham, G.; Prezzi, D.; Harford, S.; Taylor, C.J.; Hamer, R.; Higgins, R.; Bradley, J.A.; Clatworthy, M.R. Elevated Pretransplantation Soluble BAFF Is Associated with an Increased Risk of Acute Antibody-Mediated Rejection. *Transplantation* **2013**, *96*, 413–420, doi:10.1097/TP.0b013e318298dd65.
29. Wang, X.-Z.; Wan, Z.; Xue, W.-J.; Zheng, J.; Li, Y.; Ding, C.G. B-Cell Activating Factor Predicts Acute Rejection Risk in Kidney Transplant Recipients: A 6-Month Follow-Up Study. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1046, doi:10.3389/fimmu.2019.01046.
30. Pongpirul, W.; Chanchaoentana, W.; Pongpirul, K.; Leelahavanichkul, A.; Kittikowit, W.; Jutivorakool, K.; Nonthasoot, B.; Avihingsanon, Y.; Eiam-Ong, S.; Praditpornsilpa, K.; et al. B-Cell Activating Factor, a Predictor of Antibody Mediated Rejection in Kidney Transplantation Recipients. *Nephrology* **2018**, *23*, 169–174, doi:10.1111/nep.12972.
31. Kościelska-Kasprzak, K.; Bartoszek, D.; Myszka, M.; Kamińska, D.; Boratyńska, M.; Krajewska, M.; Klinger, M. B Cell Activating Factor (BAFF) in Long-Term Kidney Transplant Recipients Is Not a Prognostic Marker for Allograft Dysfunction or Survival. *Transplant. Proc.* **2018**, *50*, 1750–1754, doi:10.1016/j.transproceed.2018.03.121.
32. Slavcev, A.; Brozova, J.; Slatinska, J.; Sekerkova, Z.; Honsova, E.; Skibova, J.; Striz, I.; Viklicky, O. Soluble BAFF Cytokine Levels and Antibody-Mediated Rejection of the Kidney Allograft. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2016**, *64* (Suppl. 1), 47–53, doi:10.1007/s00005-016-0428-4.
33. Lehnhardt, A.M.; Strecker, M.; Eiermann, T.; Marget, M.; Thaiss, F.; Nashan, B.; Koch, M. High B-Cell Activating Factor Is Not Associated with Worse 3-Year Graft Outcome in Blood Group-Incompatible Kidney Transplantation with Rituximab Induction. *Clin. Transplant.* **2015**, *29*, 359–364, doi:10.1111/ctr.12523.
34. Zhang, H.; Wang, S.; Su, X.; Fu, Q.; Li, J.; Wang, J.; Deng, R.; Wu, C.; Huang, Q.; Liu, L.; et al. The Role of Soluble B Cell-Activating Factor in Further Stratifying the Risk of Antibody-Mediated Rejection Post-Renal Transplant: A Meta-Analysis. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *79*, 106059, doi:10.1016/j.intimp.2019.106059.
35. MacLeod, M.K.L.; Kappler, J.W.; Marrack, P. Memory CD4 T Cells: Generation, Reactivation and Re-Assignment. *Immunology* **2010**, *130*, 10–15, doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03260.x.
36. Bohnhorst, J.Ø.; Bjørgan, M.B.; Thoen, J.E.; Natvig, J.B.; Thompson, K.M. Bm1–Bm5 Classification of Peripheral Blood B Cells Reveals Circulating Germinal Center Founder Cells in Healthy Individuals and Disturbance in the B Cell Subpopulations in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 3610–3618, doi:10.4049/jimmunol.167.7.3610.
37. Thibault-Espitia, A.; Foucher, Y.; Danger, R.; Migone, T.; Pallier, A.; Castagnet, S.; G-Gueguen, C.; Devys, A.; C-Gautier, A.; Giral, M.; et al. BAFF and BAFF-R Levels Are Associated with Risk of Long-Term Kidney

- Graft Dysfunction and Development of Donor-Specific Antibodies. *Am. J. Transpl.* **2012**, *12*, 2754–2762, doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04194.x.
38. Xu, H.; He, X.; Xu, R. B Cell Activating Factor, Renal Allograft Antibody-Mediated Rejection, and Long-Term Outcome. *J. Immunol. Res.* **2018**, *2018*, 5251801, doi:10.1155/2018/5251801.
 39. Li, W.W.; Peng, X.; Liu, Y.; Liu, H.; Liu, F.; He, L.; Liu, Y.; Zhang, F.; Guo, C.; Chen, G.; et al. TLR9 and BAFF: Their Expression in Patients with IgA Nephropathy. *Mol. Med. Rep.* **2014**, *10*, 1469–1474, doi:10.3892/mmr.2014.2359.
 40. McCarthy, E.M.; Lee, R.Z.; Ní Gabhann, J.; Smith, S.; Cunnane, G.; Doran, M.F.; Howard, D.; O’Connell, P.; Kearns, G.; Jefferies, C.A. Elevated B Lymphocyte Stimulator Levels Are Associated with Increased Damage in an Irish Systemic Lupus Erythematosus Cohort. *Rheumatology* **2013**, *52*, 1279–1284, doi:10.1093/rheumatology/ket120.
 41. Jonsson, M.V.; Szodoray, P.; Jellestad, S.; Jonsson, R.; Skarstein, K. Association between Circulating Levels of the Novel TNF Family Members APRIL and BAFF and Lymphoid Organization in Primary Sjögren’s Syndrome. *J. Clin. Immunol.* **2005**, *25*, 189–201, doi:10.1007/s10875-005-4091-5.
 42. Salazar-Camarena, D.C.; Ortiz-Lazareno, P.C.; Cruz, A.; Oregon-Romero, E.; Machado-Contreras, J.R.; Muñoz-Valle, J.F.; Orozco-López, M.; Marín-Rosales, M.; Palafox-Sánchez, C.A. Association of BAFF, APRIL Serum Levels, BAFF-R, TACI and BCMA Expression on Peripheral B-Cell Subsets with Clinical Manifestations in Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* **2016**, *25*, 582–592, doi:10.1177/0961203315608254.
 43. Bosello, S.; Youinou, P.; Daridon, C.; Tolusso, B.; Bendaoud, B.; Pietrapertosa, D.; Morelli, A.; Ferraccioli, G.F. Concentrations of BAFF Correlate with Autoantibody Levels, Clinical Disease Activity, and Response to Treatment in Early Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* **2008**, *35*, 1256–1264.
 44. Mariette, X.; Roux, S.; Zhang, J.; Bengoufa, D.; Lavie, F.; Zhou, T.; Kimberly, R. The Level of BLYS (BAFF) Correlates with the Titre of Autoantibodies in Human Sjögren’s Syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* **2003**, *62*, 168–171, doi:10.1136/ard.62.2.168.
 45. Newell, K.A.; Asare, A.; Kirk, A.D.; Gisler, T.D.; Bourcier, K.; Suthanthiran, M.; Burlingham, W.J.; Marks, W.H.; Sanz, I.; Lechler, R.I.; et al. Identification of a B Cell Signature Associated with Renal Transplant Tolerance in Humans. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 1836–1847, doi:10.1172/JCI39933.
 46. Sagoo, P.; Perucha, E.; Sawitzki, B.; Tomiuk, S.; Stephens, D.A.; Miqueu, P.; Chapman, S.; Craciun, L.; Sergeant, R.; Brouard, S.; et al. Development of a Cross-Platform Biomarker Signature to Detect Renal Transplant Tolerance in Humans. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 1848–1861, doi:10.1172/JCI39922.
 47. Heidt, S.; Vergunst, M.; Anholts, J.D.H.; Reinders, M.E.J.; De Fijter, J.W.; Eikmans, M.; Claas, F.H.J. B Cell Markers of Operational Tolerance Can Discriminate Acute Kidney Allograft Rejection from Stable Graft Function. *Transplantation* **2015**, *99*, 1058–1064, doi:10.1097/TP.0000000000000465.
 48. Nouël, A.; Ségalen, I.; Jamin, C.; Doucet, L.; Caillard, S.; Renaudineau, Y.; Pers, J.-O.; Le Meur, Y.; Hillion, S. B Cells Display an Abnormal Distribution and an Impaired Suppressive Function in Patients with Chronic Antibody-Mediated Rejection. *Kidney Int.* **2014**, *85*, 590–599, doi:10.1038/ki.2013.457.
 49. Blair, P.A.; Noreña, L.Y.; Flores-Borja, F.; Rawlings, D.J.; Isenberg, D.A.; Ehrenstein, M.R.; Mauri, C. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* **2010**, *32*, 129–140, doi:10.1016/j.immuni.2009.11.009.
 50. Haas, M.; Loupy, A.; Lefaucheur, C.; Roufosse, C.; Glotz, D.; Seron, D.; Nankivell, B.J.; Halloran, P.F.; Colvin, R.B.; Akalin, E.; et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised Diagnostic Criteria for Chronic Active T Cell-Mediated Rejection, Antibody-Mediated Rejection, and Prospects for Integrative Endpoints for next-Generation Clinical Trials. *Am. J. Transpl.* **2018**, *18*, 293–307, doi:10.1111/ajt.14625.
 51. San Segundo, D.; Millán, O.; Muñoz-Cacho, P.; Boix, F.; Paz-Artal, E.; Talayero, P.; Morales, J.M.; Muro, M.; De Cos, M.Á.; Guirado, L.; et al. High Proportion of Pretransplantation Activated Regulatory T Cells (CD4+CD25highCD62L+CD45RO+) Predicts Acute Rejection in Kidney Transplantation: Results of a Multicenter Study. *Transplantation* **2014**, *98*, 1213–1218, doi:10.1097/TP.0000000000000202.
 52. San Segundo, D.; López-Hoyos, M.; Arias, M. Regulatory B-Cells in Transplantation. *Antibodies* **2013**, *2*, 587–597, doi:10.3390/antib2040587.



Late Plasma Cell Depletion After Thymoglobulin Induction in Kidney Transplant Recipients

Juan Irure,^{1*} Cristina Sango,^{2*} David San Segundo,¹ Gema Fernández-Fresnedo,²
 Juan Carlos Ruiz,² Adalberto Benito-Hernández,² Esther Asensio,¹
 Marcos López-Hoyos,^{1†} Emilio Rodrigo^{2†}

Abstract

Objectives: Induction therapy with rabbit antithymocyte globulin is frequently used in kidney transplant recipients and contributes to regulating the humoral alloantibody response. However, the effect of rabbit antithymocyte globulin on B-cell subpopulations, including plasma cells, has not been previously studied in humans in vivo.

Materials and Methods: We prospectively studied a cohort of 39 adult kidney transplant recipients. Twenty patients received rabbit antithymocyte globulin as induction therapy. Peripheral blood samples were obtained pretransplant and at 6 and 12 months posttransplant. T and B cells were acquired by flow cytometry.

Results: Total lymphocytes and CD3 and CD4 cells significantly decreased at 6 and 12 months only in patients who received rabbit antithymocyte globulin. In contrast, the CD19 population did not change after rabbit antithymocyte globulin induction. One-year circulating plasma cells remained significantly lower than pretransplant levels in patients who received rabbit antithymocyte globulin. We observed significant differences in plasma cell numbers at 12 months after transplant between patients who received rabbit antithymocyte globulin and those patients who did not receive it (median of 5 and interquartile range of 3-17 vs median of 25 and interquartile range of 12-35; $P = .001$).

Conclusions: Rabbit antithymocyte globulin induction leads to a late reduction in the number of circulating plasma cells at 1 year after kidney transplant. This effect can contribute to down-regulation of the humoral alloantibody response.

Key words: Induction, Lymphocyte subpopulation, Renal transplantation

Introduction

Induction therapy with an interleukin 2 receptor antagonist or a lymphocyte-depleting agent has been strongly recommended as part of the initial immunosuppressive regimen in kidney transplantation to modulate or deplete T-cell responses while alloantigen presentation occurs.^{1,2} Induction drugs contribute to reducing acute rejection rate and to improving graft survival compared with placebo or no induction, especially in high-risk patients.³⁻⁵ Among lymphocyte-depleting agents, rabbit antithymocyte globulin (rATG) is the most frequently used induction drug in the United States and the second most frequently used in Europe and Australia/New Zealand.⁶⁻⁹ Differences in prescription rates among different countries and centers point to no definite indications for selecting rATG instead of other induction agents in a specific transplant recipient. However, common consensus and guidelines suggest using rATG at least in patients with a higher risk of rejection and/or delayed graft function.^{1,8,10}

In the past decade, the humoral alloimmune response against the graft has regained importance. On the one hand, the significant role of donor-specific antibodies has been recognized in the development of antibody-mediated rejection (AbMR) that drives further kidney graft loss.^{11,12} On the other hand, several studies have demonstrated a specific B-cell subpopulation signature in tolerant patients.¹³⁻¹⁷ In relation to both aspects, we suspected that rATG

From the ¹Immunology Service, and the ²Nephrology Service, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, University of Cantabria, Santander, Spain

Acknowledgements: This work was partially supported by grants for Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII (PI1100990, PI1400378, PI1601585, and RD16/0009/0027) and IDIVAL. The authors have no conflicts of interest to declare. We are grateful to Sandra Raso and Consuelo Agüero for their excellent technical help. The authors are indebted to Robbie Vincent for his linguistic assistance.

*Juan Irure and Cristina Sango contributed equally to this work.

†Marcos López-Hoyos and Emilio Rodrigo shared senior authorship for this work.

Corresponding author: Emilio Rodrigo, Nephrology Service, University Hospital "Marqués de Valdecilla", University of Cantabria, Avda. Valdecilla sn. 39008, Santander, Spain
 Phone: +34 942202738 E-mail: nefrce@humv.es

Experimental and Clinical Transplantation (2019)

could influence the humoral side of the alloimmune response. First, rATG is used to prevent and treat AbMR and contributes to reducing donor-specific antibodies and HLA antibodies in kidney and heart transplant recipients.^{10,18-21} Second, rATG has become a cornerstone agent to promote tolerance in both animal models²²⁻²⁴ and humans.²⁵⁻²⁷ Although it is well known that T-cell depletion constitutes the main mechanism of action of rATG, it also interacts with different immune and nonimmune cell types, such as B cells, natural killer cells, and endothelial cells.^{28,29} Thus, rATG triggers complement-independent apoptosis of naive, activated, and plasma B cells *in vitro*.³⁰ However, the effect of rATG on B-cell subpopulations, including plasma cells, has not been previously studied in humans *in vivo*.³¹ Our aim was to analyze changes in B-cell subpopulations in kidney transplant recipients treated with rATG as induction therapy.

Materials and Methods

A cohort of 39 consecutive adult kidney transplant recipients, with procedures performed at the Marqués de Valdecilla University Hospital from February 2015 to January 2016, was prospectively studied during the first 12 months after transplant. Four patients were excluded due to pretransplant use of rituximab or because they received rATG (Thymoglobulin; Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) to treat acute rejection. Standard initial immunosuppression consisted of tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone. Twenty patients received rATG as induction therapy due to simultaneous pancreas-kidney transplant ($n = 3$), donation after cardiac death ($n = 11$), high risk of delayed graft function ($n = 19$), and/or hypersensitization ($n = 5$). Five patients received induction therapy with basiliximab. Relevant information about recipient, donor, and transplant characteristics was extracted from the prospectively maintained database of renal transplant patients at our center. One-year estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the CKD-EPI equation. Diagnosis of acute rejection was proven with biopsy. This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of our hospital. All patients included in the study gave written informed consent.

Peripheral blood samples in EDTA containers were obtained pretransplant and at months 6 and 12 after transplant. Flow cytometry was performed according to standard protocol by using CytoFLEX (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Blood cells were freshly stained with the following monoclonal antibodies: CD27-FITC clone M-T271, CD138-FITC clone MI15, CD24-PE clone ML5, CD268-PE clone 7H22-E16, and immunoglobulin M-APC clone G20-127 (from BD Biosciences, San Jose, CA, USA); CD19-PC5.5 clone J3-119 (from Beckman Coulter); CD38-PC7 clone HIT2, CD5-APC clone UCHT2, CD10-APC Cy7 clone HII10a, CD25-Pacific Blue clone BC96, and IgD-Brilliant Violet 510 clone IA6-2 (from BioLegend, San Diego, CA, USA); and CD27-APC Cy7 clone M-T271, CD21-VioBlue clone HB5, and CD20-VioGreen clone REA780 (from Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). These were used to identify different B-cell subsets.

Naïve B cells were defined as CD19+IgD+CD27- (CD19-positive, immunoglobulin D positive, CD27 negative), different subsets of transitional B cells as CD19+CD24+CD38+ (CD19, CD24, CD38 positive), unswitched memory B cells as CD19+IgD+CD27+ (CD19, immunoglobulin D positive, CD19 positive), switched memory B as CD19+IgD-CD27+ (CD19 positive, immunoglobulin D negative, CD27 positive), plasmablasts as CD19^{low}CD20-CD27+CD38^{high}, and plasma cells as CD19-CD20-CD27^{high}CD38^{high}CD138+.

Statistical analyses

We performed statistical analyses using SPSS version 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). According to the Kolmogorov-Smirnov test, all continuous variables did not show normal distribution. Therefore, non-parametric tests were used for all continuous variables. Continuous variables are shown as medians and interquartile ranges (IQR), whereas qualitative variables are shown as total number of observations and percentages.

Results

Main patient characteristics are shown in Table 1. Median rATG dose was 6.6 mg/kg (IQR, 5.1-8.0 mg/kg). Lymphocyte subpopulation changes are reported in Table 2 (no rATG group) and Table 3 (rATG group) and in Figures 1 and 2. Total lymphocytes, CD3 cells, and CD4 cells were significantly decreased at 6

and 12 months only in the group of patients who received rATG. In contrast, the CD19 population did not change at 6 and 12 months after rATG induction. Of note, 1-year circulating plasma cells remained significantly lower than pretransplant levels only in patients who received rATG. Other B-cell subpopulations (naïve, unswitched/switched memory B cells, mature) did not change significantly after rATG induction therapy.

	No rATG (n = 15)	rATG (n = 20)	P Value (Mann-Whitney)
Recipient age, y	53 (44-65)	52 (41-60)	.499
Male recipient	60%	60%	1.000
SPK	0%	15%	.117
Hypersensitized	0%	25%	.036
Donor age, y	53 (48-59)	51 (38-64)	.681
DCD	0%	55%	.001
cPRA > 20%	0%	25%	.036
Mismatches, No.	4 (4-5)	5 (3-5)	.882
Retransplant	13.3%	25.0%	.393
Cold ischemia time, min	19 (17-21)	12 (8-19)	.074
DGF	33.3%	30.0%	.833
1-year creatinine, mg/dL	1.37 (1.00-1.95)	1.37 (1.04-1.91)	.934
1-year eGFR, mL/min/1.73 m ²	69.4 (38.9-75.8)	56.5 (40.5-81.6)	.856
1-year proteinuria, mg/day	270 (206-945)	384 (221-846)	.784
1-year acute rejection	20.0%	25.0%	.727
1-year tacrolimus	100%	95%	.380
1-year mycophenolate	93.3%	95.0%	.833
1-year mTOR inhibitor	0%	5%	.380
1-year prednisone	86.7%	80.0%	.605

Abbreviations: cPRA, calculated panel reactive antibody; DCD, donation after cardiac death; DGF, delayed graft function; eGFR, estimated glomerular filtration rate; mTOR, mammalian target of rapamycin; rATG, rabbit antithymocyte globulin; SPK, simultaneous pancreas-kidney transplant
Data are shown as frequency (qualitative variables) or median and interquartile range (quantitative variables).

Subpopulation	Median (Interquartile Range)		
	Pretransplant	6 Months	12 Months
Total lymphocytes	1515 (1182-1953)	1724 (1243-1994)	1630 (1360-2294)
CD3	1116 (920-1648)	1435 (910-1632)	1254 (1014-1975)
CD4	800 (549-1008)	756 (453-953)	757 (608-892)
CD19	90 (63-229)	91 (41-165)	92 (69-163)
Naïve	8 (2-33)	5 (1-22)	13 (7-30)
Unswitched memory B	6 (4-11)	6 (4-15)	7 (5-9)
Switched memory B	15 (6-26)	12 (5-19)	18 (9-41)
Mature B	6 (1-14)	2 (1-4) ^a	4 (2-12)
Plasma cells	39 (6-50)	24 (10-35)	25 (12-35)

^aP = .030 for pretransplant vs 6 months (Wilcoxon test).

We observed significant differences in plasma cell numbers at 12 months after transplant between patients who received rATG and patients who did

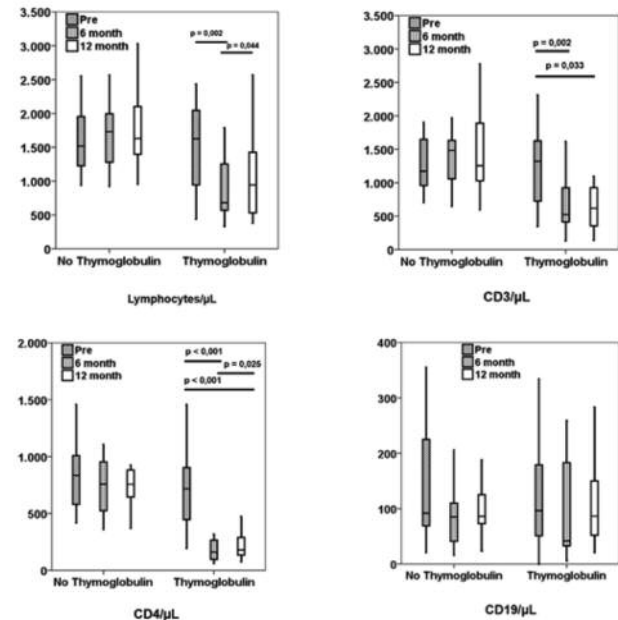
not receive it (median and IQR of 5 [3-17] vs 25 [12-35]; P = .001). In contrast, we observed no significant differences in plasma cells pretransplant (median and IQR of 22 [12-84] vs 39 [6-50]; P = .461) or at 6 months (median and IQR of 21 [8-30] vs 24 [10-35]; P = .433) between both groups of patients.

Table 3. Evolution of Peripheral Blood Lymphocyte Subpopulation in Patients Receiving Induction With Rabbit Antithymocyte Globulin (n = 20)

Subpopulation	Median (Interquartile Range)		
	Pretransplant	6 Months	12 Months
Total lymphocytes	1626 (898-2063)	681 (555-1294) ^a	943 (530-1457) ^c
CD3	1322 (707-1627)	524 (412-959) ^a	617 (343-984) ^b
CD4	717 (446-931)	161 (95-270) ^a	180 (130-306) ^{b,c}
CD19	97 (51-192)	42 (33-185)	87 (53-152)
Naïve	12 (5-19)	7 (2-23)	8 (4-20)
Unswitched memory B	5 (3-28)	5 (2-16)	10 (2-22)
Switched memory B	14 (5-25)	12 (3-35)	14 (4-19)
Mature B	3 (2-7)	2 (0.4-8)	5 (3-12)
Plasma cells	22 (12-84)	21 (8-30)	5 (3-17) ^{d,e}

^aP = .05, pretransplant vs 6 months; ^bP < .05, pretransplant vs 12 months; ^cP < .05, 6 months vs 12 months; ^dP = .007, pretransplant vs 12 months; ^eP = .015, 6 months vs 12 months (Wilcoxon test).

Figure 1. Changes in Lymphocyte Subpopulation (Total Lymphocytes and CD3, CD4, and CD19 Cells) in Peripheral Blood From Patients Treated and Not Treated With Rabbit Antithymocyte Globulin

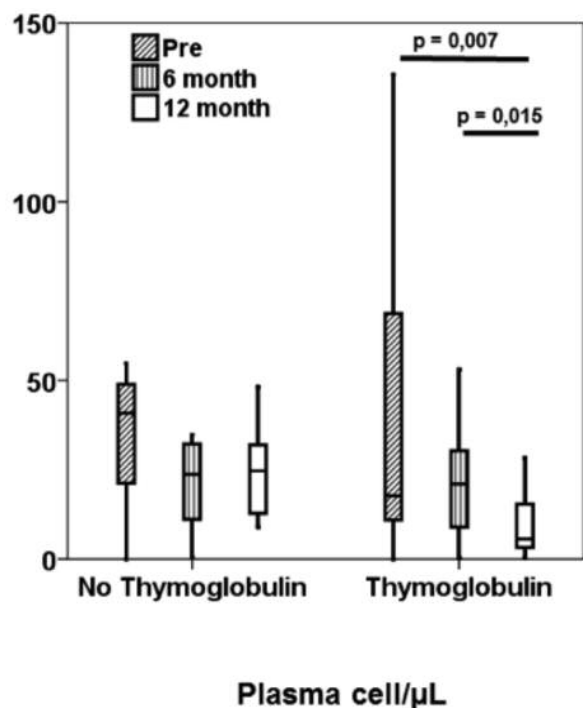


Variables related to 1-year levels of peripheral blood plasma cells in patients treated with rATG were the number of circulating CD4 cells at 12 months (r = 0.522, P = .022), the number of circulating CD19 cells (r = 0.691, P = .001), and eGFR at 12 months (r = 0.648, P = .003). However, recipient age

($P = .393$), sex ($P = .196$), steroid use ($P = .885$), calculated panel reactive antibody $> 20\%$ ($P = .262$), donation after cardiac death ($P = .968$), and acute rejection ($P = .219$) were not significantly associated with peripheral blood plasma cell level. After linear regression analysis, CD19 (0.076, 95% confidence interval [95% CI], 0.026-0.127; $P = .006$) and eGFR (0.167, 95% CI, 0.039-0.295; $P = .014$) remained independently related to peripheral blood plasma cell level at 12 months.

Variables related to levels of 1-year circulating plasma cells in patients not treated with rATG were the number of circulating CD4 and CD19 cells at 12 months ($r = 0.763$, $P = .001$ and $r = 0.597$, $P = .024$, respectively). However, eGFR at 12 months ($P = .751$), recipient age ($P = .082$), sex ($P = .898$), steroid use ($P = .549$), and acute rejection ($P = .555$) were not related.

Figure 2. Changes in Number of Peripheral Blood Plasma Cells in Patients Treated and Not Treated With Rabbit Antithymocyte Globulin



Discussion

Although it is well known that rATG exerts its main immunosuppressive effects by depleting T cells, some of these effects are driven through B-cell depletion and down-regulation of cell surface expression of some leukocyte adhesion molecules (previously reviewed^{28,29}). The influence on the

B-cell population is due to the presence of B cells and some B-cell surface antigens in the thymic preparation used for rATG production. In this sense, Zand and associates reported that CD20-positive B cells could be found in the pediatric thymus.³⁰ Consequently, rATG preparations have different antibodies against B-cell populations that can promote apoptosis in these cells in vitro at clinically relevant concentrations.³⁰⁻³³ The influence of rATG on B cells has been demonstrated in animal models. Prévile and associates reported that rATG treatment induced a partial B-cell depletion in a cynomolgus monkey model.³⁴ However, this effect has not been consistently shown in in vivo studies performed in humans. Although some authors detected some depletion of B cells or B-cell subsets in humans, mainly in the initial months,³⁵⁻³⁷ we and others found no significant changes in B-cell lymphocytes or in B-cell subsets.^{38,39} Differences in transplant patient characteristics, rATG dose, sample timing, and batch-to-batch variations in the quantity of B-cell antigens in the thymic preparation can partly explain these differences.^{30,35-39}

Similar findings would be expected regarding plasma cells. Plasma cell antigens, mainly CD138, are found in pediatric thymic parenchyma, and plasma cell apoptosis induced by rATG has been reported in in vitro studies by some but not all authors.^{30,33,40,41} Considering this potential role of rATG, we could have found an early effect of rATG that reduced the number of circulating plasma cells, but we detected no significant change in the number of peripheral blood plasma cells at month 6. In contrast, the main finding of our study was that rATG induced a late depletion on circulating plasma cells that was only detected at month 12. No previous studies have analyzed the long-term effects of rATG on B-cell subsets including plasma cells. Potential mechanisms that explain this finding are not known. On the one hand, regarding T cells, rATG exerts a late effect that influences the different T-cell subsets beyond the period in which rATG can be detected in blood.⁴² Although not explored, a similar mechanism could be possible for plasma cells. On the other hand, rATG modifies the reconstitution of T-cell subpopulations (as reviewed previously^{28,29,35}); among them, T-follicular helper cells have a strong influence on the development and maintenance of human circulating antigen-induced plasma cells.^{43,44} Hence, T-follicular helper cell depletion and T-cell subset changes

promoted by rATG could favor a late (12 month) reduction in circulating plasma cells, whereas long-lived plasma cells were not affected earlier (that is, at 6 months). Although this mechanism was not explored in our study, the positive correlation between CD4-positive cells and plasma cells that we found could support this hypothesis.

Kidney transplant induction with rATG contributes to the reduction of acute rejection in the short and long term compared with placebo or no treatment and with interleukin 2 receptor monoclonal antibodies in high-risk patients.^{4,5,45-48} Because of this, current guidelines suggest using a lymphocyte-depleting agent for kidney transplant recipients at high immunologic risk.^{1,2} This beneficial effect of rATG is mainly explained by its potent effect on the T-cell compartment, but a potential role in B-cell subpopulations cannot be discarded; for example, rATG has been used to treat and prevent AbMR.^{21,49} Because rATG is preferentially used in patients with high immunologic risk and the yearly rate of donor-specific antibody appearance is low, until recently, it has been difficult to demonstrate that rATG helps to reduce the development of donor-specific antibodies. Brokhof and colleagues reported that rATG induction is associated with a lower incidence of de novo donor-specific antibodies in moderately sensitized renal transplant recipients.¹⁸ Because bone marrow plasma cells are the origin of donor-specific antibodies and circulating plasma cells reflect this population, our finding of lower peripheral blood plasma cells in patients who received rATG could explain how it contributes to controlling donor-specific antibody appearance.

As previously reported, rATG is a key component of several immunosuppressive regimens designed to induce tolerance in kidney transplant recipients.²⁵⁻²⁷ In these therapeutic protocols, rATG is mainly used because it has potent unspecific immunosuppressive effects. However, rATG may also promote some tolerogenic mechanisms. For example, treatment with rATG induced a significant proliferation of regulatory T cells.^{50,51} Because certain B-cell subpopulations relate to a “tolerant” state, we analyzed changes in B-cell subsets after rATG induction. Although we did not find an increase in the number of naïve B cells, the low number of plasma cells that we found has also been previously related to a tolerant situation with stable kidney graft function in the absence of immunosuppression.¹⁶ In contrast, patients who were treated with alemtuzumab as

induction therapy showed a “tolerant” B signature with higher rate of naïve and transitional B cells at month 6, but this was not shown in plasma cells.⁵² Although kidney transplant outcomes are similar with both induction drugs, they have different long-term effects on B-cell subpopulations.⁵³

Our study has several limitations. First, like in similar single-center studies,^{38,39,52} the number of patients included was low. Second, patients received rATG due to different indications, mainly because of high risk for delayed graft function. Interestingly, the results did not change after exclusion of hypersensitized patients whose plasma cells were not significantly different at any moment. Last, it would have been interesting to draw intermediate blood samples between the transplant procedure and month 6 to know the initial changes of B-cell subsets due to rATG. Budget constraints required limiting the number of samples and patients analyzed. Conversely, the strengths of our study are its prospective nature, the complete follow-up of all patients up to month 12, and the significant number of B-cell subpopulations studied.

To conclude, we analyzed the effects of rATG induction on B-cell subpopulations, including plasma cells, in vivo in humans for the first time. We disclosed a not previously reported late reduction of plasma cells induced by rATG. This effect can contribute to diminishing the development of donor-specific antibodies and further AbMR and graft loss, which could also promote tolerance. Although the underlying mechanisms are not known, T-cell (specifically CD4-positive) depletion may interfere in the T-B cell cooperation necessary for long-lived plasma cell formation.

References

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work G. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009;9 Suppl 3:S1-S155.
2. Heemann U, Abramowicz D, Spasovski G, Vanholder R, European Renal Best Practice Work Group on Kidney T. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines on kidney transplantation: a European Renal Best Practice (ERBP) position statement. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(7): 2099-2106.
3. Opelz G, Unterrainer C, Susal C, Dohler B. Efficacy and safety of antibody induction therapy in the current era of kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(10):1730-1738.
4. Hill P, Cross NB, Barnett AN, Palmer SC, Webster AC. Polyclonal and monoclonal antibodies for induction therapy in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;1:CD004759.
5. Webster AC, Ruster LP, McGee R, et al. Interleukin 2 receptor antagonists for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010(1):CD003897.

6. ANZDATA Registry Web site. 39th Report CTAaNZDaTR, Adelaide, Australia; 2017. <http://www.anzdata.org.au>. Accessed July 9, 2017.
7. OPTN/SRTR 2015 Annual Data Report: Introduction. *Am J Transplant*. 2017;17 Suppl 1:11-20.
8. Rodrigo E, Fernandez-Fresnedo G, Robledo C, et al. Heterogeneity of induction therapy in Spain: changing patterns according to year, centre, indications and results. *NDT Plus*. 2010;3(Suppl_2):ii9-ii14.
9. Hardinger KL, Brennan DC, Klein CL. Selection of induction therapy in kidney transplantation. *Transpl Int*. 2013;26(7):662-672.
10. Thiyagarajan UM, Ponnuswamy A, Bagul A. Thymoglobulin and its use in renal transplantation: a review. *Am J Nephrol*. 2013;37(6):586-601.
11. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012;12(2):388-399.
12. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant*. 2012;12(5):1157-1167.
13. Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1836-1847.
14. Newell KA, Asare A, Sanz I, et al. Longitudinal studies of a B cell-derived signature of tolerance in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2015;15(11):2908-2920.
15. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1848-1861.
16. Chesneau M, Pallier A, Braza F, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant*. 2014;14(1):144-155.
17. Shabir S, Girdlestone J, Briggs D, et al. Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study. *Am J Transplant*. 2015;15(5):1384-1391.
18. Brokhof MM, Sollinger HW, Hager DR, et al. Antithymocyte globulin is associated with a lower incidence of de novo donor-specific antibodies in moderately sensitized renal transplant recipients. *Transplantation*. 2014;97(6):612-617.
19. Kanter Berga J, Pallardo Mateu LM, Beltran Catalan S, et al. Donor-specific HLA antibodies: risk factors and outcomes after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2011;43(6):2154-2156.
20. Rafiei M, Kittleson M, Patel J, et al. Anti-thymocyte gamma-globulin may prevent antibody production after heart transplantation. *Transplant Proc*. 2014;46(10):3570-3574.
21. Bachler K, Amico P, Honger G, et al. Efficacy of induction therapy with ATG and intravenous immunoglobulins in patients with low-level donor-specific HLA-antibodies. *Am J Transplant*. 2010;10(5):1254-1262.
22. Maki T, Gottschalk R, Wood ML, Monaco AP. Specific unresponsiveness to skin allografts in anti-lymphocyte serum-treated, marrow-injected mice: participation of donor marrow-derived suppressor T cells. *J Immunol*. 1981;127(4):1433-1438.
23. Hale DA, Gottschalk R, Umemura A, Maki T, Monaco AP. Immunologic mechanisms in tolerance produced in mice with nonradiation-based lymphoablation and donor-specific bone marrow. *Transplantation*. 2002;74(4):477-484.
24. Hale DA, Gottschalk R, Umemura A, Maki T, Monaco AP. Establishment of stable multilineage hematopoietic chimerism and donor-specific tolerance without irradiation. *Transplantation*. 2000;69(7):1242-1251.
25. Kawai T, Sachs DH, Sprangers B, et al. Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am J Transplant*. 2014;14(7):1599-1611.
26. Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, et al. Tolerance and withdrawal of immunosuppressive drugs in patients given kidney and hematopoietic cell transplants. *Am J Transplant*. 2012;12(5):1133-1145.
27. Vanikar AV, Trivedi HL, Thakkar UG. Six years' experience of tolerance induction in renal transplantation using stem cell therapy. *Clin Immunol*. 2018;187:10-14.
28. Bamouid J, Crepin T, Courivaud C, et al. Antithymocyte globulins in renal transplantation-from lymphocyte depletion to lymphocyte activation: The doubled-edged sword. *Transplant Rev (Orlando)*. 2017;31(3):180-187.
29. Pascual J, Zuckermann A, Djamali A, Hertig A, Naesens M. Rabbit antithymocyte globulin and donor-specific antibodies in kidney transplantation—A review. *Transplant Rev (Orlando)*. 2016;30(2):85-91.
30. Zand MS, Vo T, Huggins J, et al. Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. *Transplantation*. 2005;79(11):1507-1515.
31. Thauinat O, Koenig A, Leibler C, Grimbert P. Effect of immunosuppressive drugs on humoral allo-sensitization after kidney transplant. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(7):1890-1900.
32. Clatworthy MR. Targeting B cells and antibody in transplantation. *Am J Transplant*. 2011;11(7):1359-1367.
33. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*. 2007;21(7):1387-1394.
34. Preville X, Flacher M, LeMauff B, et al. Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation*. 2001;71(3):460-468.
35. Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, et al. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant*. 2010;10(9):2132-2141.
36. Sageshima J, Ciancio G, Guerra G, et al. Prolonged lymphocyte depletion by single-dose rabbit anti-thymocyte globulin and alemtuzumab in kidney transplantation. *Transpl Immunol*. 2011;25(2-3):104-111.
37. Vacher-Coponat H, Brunet C, Moal V, et al. Tacrolimus/mycophenolate mofetil improved natural killer lymphocyte reconstitution one year after kidney transplant by reference to cyclosporine/azathioprine. *Transplantation*. 2006;82(4):558-566.
38. Morelon E, Lefrancois N, Besson C, et al. Preferential increase in memory and regulatory subsets during T-lymphocyte immune reconstitution after Thymoglobulin induction therapy with maintenance sirolimus vs cyclosporine. *Transpl Immunol*. 2010;23(1-2):53-58.
39. Kho MM, Bouvy AP, Cadogan M, et al. The effect of low and ultra-low dosages Thymoglobulin on peripheral T, B and NK cells in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol*. 2012;26(4):186-190.
40. Perry DK, Burns JM, Pollinger HS, et al. Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant*. 2009;9(1):201-209.
41. Ramos EJ, Pollinger HS, Stegall MD, et al. The effect of desensitization protocols on human splenic B-cell populations in vivo. *Am J Transplant*. 2007;7(2):402-407.
42. Waller EK, Langston AA, Lonial S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-thymocyte globulin in recipients of partially HLA-matched blood hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9(7):460-471.
43. Ramos-Amaya A, Rodriguez-Bayona B, Lopez-Blanco R, et al. Survival of human circulating antigen-induced plasma cells is supported by plasma cell-niche cytokines and T follicular helper lymphocytes. *J Immunol*. 2015;194(3):1031-1038.
44. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):160-171.
45. Lentine KL, Schnitzler MA, Xiao H, Brennan DC. Long-term safety and efficacy of antithymocyte globulin induction: use of integrated national registry data to achieve ten-year follow-up of 10-10 Study participants. *Trials*. 2015;16:365.
46. Hellemans R, Hazzan M, Durand D, et al. Daclizumab versus rabbit antithymocyte globulin in high-risk renal transplants: five-year follow-up of a randomized study. *Am J Transplant*. 2015;15(7):1923-1932.
47. Brennan DC, Daller JA, Lake KD, et al. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2006;355(19):1967-1977.

48. Willoughby LM, Schnitzler MA, Brennan DC, et al. Early outcomes of thymoglobulin and basiliximab induction in kidney transplantation: application of statistical approaches to reduce bias in observational comparisons. *Transplantation*. 2009;87(10):1520-1529.
49. Shah A, Nadasdy T, Arend L, et al. Treatment of C4d-positive acute humoral rejection with plasmapheresis and rabbit polyclonal antithymocyte globulin. *Transplantation*. 2004;77(9):1399-1405.
50. Valdez-Ortiz R, Bestard O, Llaudo I, et al. Induction of suppressive allogeneic regulatory T cells via rabbit antithymocyte polyclonal globulin during homeostatic proliferation in rat kidney transplantation. *Transpl Int*. 2015;28(1):108-119.
51. Shimony O, Nagler A, Gellman YN, et al. Anti-T lymphocyte globulin (ATG) induces generation of regulatory T cells, at least part of them express activated CD44. *J Clin Immunol*. 2012;32(1):173-188.
52. Heidt S, Hester J, Shankar S, Friend PJ, Wood KJ. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells. *Am J Transplant*. 2012;12(7):1784-1792.
53. Sampaio MS, Chopra B, Sureshkumar KK. Depleting antibody induction and kidney transplant outcomes: a paired kidney analysis. *Transplantation*. 2017;101(10):2527-2535.

RESEARCH ARTICLE

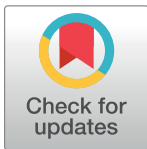
Improvement in the definition of anti-HLA antibody profile in highly sensitized patients

Juan Irure^{1,2}, Esther Asensio^{1,2}, Emilio Rodrigo³, Íñigo Romón², Javier Gómez⁴, Manuel Arias³, Marcos López-Hoyos^{1,2}, David San Segundo^{1,2}*

1 Immunology Service, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain, **2** Tissue Typing Laboratory, University Hospital Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, **3** Nephrology Service, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain, **4** Pathology Service, University Hospital Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain

☞ These authors contributed equally to this work.

* dsansegundo@hum.es



OPEN ACCESS

Citation: Irure J, Asensio E, Rodrigo E, Romón Í, Gómez J, Arias M, et al. (2017) Improvement in the definition of anti-HLA antibody profile in highly sensitized patients. PLoS ONE 12(2): e0171463. doi:10.1371/journal.pone.0171463

Editor: Jose C. Crispin, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, MEXICO

Received: July 13, 2016

Accepted: January 20, 2017

Published: February 3, 2017

Copyright: © 2017 Irure et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: **ABMR**, antibody-mediated rejection; **C1q**, C1q test; **CDC**, complement-

Abstract

The definition of anti-HLA antibody profile in highly sensitized patients on a waiting list is crucial when virtual crossmatch is used in organ allocation systems, but also when used to identify the true deleterious anti-HLA antibodies. Here we propose different levels of risk based on the results of anti-HLA antibody testing in neat serum (N) and after sera dilution (DIL) and C1q test in 18 highly sensitized patients. This group was heterogeneous in terms of anti-HLA antibody titers and their ability to fix complement. After dilution, 15 out of 18 patients (83.3%) showed a reduction of positive bead counts whereas 4 patients showed a prozone effect and complement fixation was demonstrated. The high dilution of sera and ascertaining the complement fixation allow the accurate definition of risk anti-HLA antibody profiles in highly sensitized patients, as demonstrated in 5 of the sensitized patients who were transplanted.

Introduction

The anti-HLA antibody testing was revolutionized by solid-phase assays (SPA) based on Luminex, increasing the sensitivity and the ability to detect low levels of anti-HLA antibodies[1]. With Luminex data, unacceptable HLA antigens from potential donors could be assigned and virtual crossmatch (vXM) was addressed[2]. This is especially interesting in the case of highly-sensitized patients because vXM has allowed the development of specific programs to reduce the waiting list for organ transplantation, and an accurate profile of unacceptable HLA antigens should be defined[3].

Despite the improvement of anti-HLA antibody detection by Luminex being well accepted, several questions have risen with the potential pitfalls[4]. When doubtful HLA antigens are considered as unacceptable with mean fluorescence intensities (MFI) near the cut-off value, the knowledge of potential interfering factors should be kept in mind. Two different kinds of errors could appear; a) false positive results: due to a reaction against denatured HLA antigens (neo-epitopes generated during the process of coating the beads with HLA antigens), or due to

dependent cytotoxicity; **cPRA**, calculated-panel reactive of antibodies; **DIL**, diluted serum; **DSA**, donor-specific anti-HLA antibodies; **FCXM**, flow cytometry crossmatches; **MFI**, mean fluorescence intensity; **N**, neat serum; **PBMCs**, peripheral blood mononuclear cells; **PBS**, phosphate buffer saline; **SPA**, Solid phase assay; **vXM**, virtual crossmatching.

the lack of consensus about cut-off values to determine positive or negative specificities explained in part to wide intra- and inter-laboratory variability[5]. A significant example is the assessment of unexpected anti-HLA antibodies in non-sensitized, non-transfused males using different cut-off values[6]; on the other hand b) false negative results: due to the potential interaction of complement with IgG anti-HLA antibodies[7] easily overcome after EDTA or heat treatment[8], or due to a prozone effect which could be solved after dilution of the sera [9,10]. Therefore, the overestimation of unacceptable HLA antigens in a patient could lead to an increased time on the waiting list, and an accurate definition of unacceptable and permitted HLA antigens should be addressed.

There is an increasing interest in a clear definition of the anti-HLA antibody profile due to their use in vXM, but also in donor-pair living donors and highly-sensitized programs in order to allocate an organ with negative vXM results. However, in some undesired situations with positive complement-dependent crossmatches, a negative vXM result is found [11]. This discordance could be improved with further study of the IgG anti-HLA antibodies profile.

Sometimes the definition of the anti-HLA antibodies profile is difficult due to low-titer anti-HLA antibodies that produce variable results in sequential serum studies. Another situation that must be completely ruled out in highly-sensitized patients is the prozone effect where high titers of antibodies compete for the antigen and are not detected in SPA. For this reason, it is crucial to assign these dubious specificities as unacceptable or permitted antigens. In order to facilitate this assignment, two recent publications have demonstrated different strength of anti-HLA antibodies[9,10] as an approach to better defining the anti-HLA antibodies profile.

Here we propose an anti-HLA rating based on anti-HLA antibody strength and the ability to fix the complement in highly-sensitized patients. Such a rating is validated in complement-dependent cytotoxicity (CDC) and flow cytometry crossmatch (FCXM) against peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from blood donors with HLA specificities which are recognized by the sensitized patients' sera and is further probed in 5 patients who could be transplanted.

Materials and methods

The work has been conducted according to the principles expressed by the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of our institution (Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria). The patient on the waiting list signed their informed consent and the sera collection is registered in ISCIII with number: C.0003580.

Patients and samples

Serum from 18 highly-sensitized patients, with >98% of calculated panel reactive of antibodies (cPRA) and who did not receive any desensitization treatment with Rituximab or intravenous immunoglobulins, were studied for anti-HLA class-I antibodies by Single Antigen (LABScreen Single Antigen Class-I, One Lambda, Canoga Park, CA) at neat (N) and at a 1/160 serum dilution (DIL) based on a previous report[9] where further dilutions did not find any prozone effect. For identification of fixing-complement anti-HLA antibodies, the C1q test was performed (C1qScreen, One Lambda). A total number of 1,746 class-I antigens on beads were evaluated and raw MFI were compared after N, DIL and C1q assays.

The cut-off value was set at 3000 MFI and every single bead with MFI below the cut off value was considered as negative. The number of beads with a positive result was counted in each condition (N, DIL and C1q).

The main demographic, clinical and immunological parameters of the highly-sensitized patients tested are summarized in [Table 1](#).

Table 1. Demographic and clinical parameters of highly-sensitized patients.

Age (years mean, SD ^a)	(54.6, 12.3)
Gender (Female/Male)	(5 / 13)
Renal disease (Glomerular/Interstitial/Systemic/Congenital/Unknown)	(10/4/2/1/1)
Transfusions (No / Yes)	(8 / 10)
cPRA ^b	98%
Dialysis (Hemodialysis/Peritoneal)	(16 / 2)
Number of previous transplants (0/1/2/3)	(2 / 6 / 9 / 1)

^aSD: Standard deviation

^bcPRA: calculated Panel Reactive of Antibodies

doi:10.1371/journal.pone.0171463.t001

Five out of the 18 kidney transplant recipients (KTR) could be transplanted with negative CDC but positive FCXM and they were biopsied because of clinical suspicion of antibody-mediated rejection (ABMR) or protocol biopsy. Sera at transplantation from these five recipients were retrospectively studied for anti-HLA antibodies, taking into account the three previously-mentioned conditions (N, DIL, C1q) and the risk for rejection was scored/calculated.

Complement-dependent cytotoxicity crossmatch

Crossmatch was performed by CDC. Donors' lymphocytes were separated from whole blood by Ficoll gradient. Cells were suspended in phosphate buffer saline (PBS) to achieve a concentration of 2×10^6 /mL. 1ul of patients' serum was dispensed in the wells of an oiled Terasaki plate. 1/2 and 1/4 serum dilutions were also used. All samples and dilutions were in duplicate. Negative and positive control samples were dispensed in the same way. Then, 1ul of lymphocytes and 5ul of rabbit complement (One Lambda) were dispensed in each well. After incubation (90 minutes, 22°C), eosin was added to each well and the plate was read in an inverted microscope.

Flow cytometry crossmatch

PBMC isolated by Ficoll gradient were incubated with pronase during 20 minutes in a 37°C water bath. Neat and 1/160 diluted serum was added to pronase-treated PBMC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) and the mix was incubated during 30 minutes at room temperature. Anti-CD3 Pacific Blue (clone UCHT-1, Immunostep, Salamanca, SPAIN), CD19 APC (clone SJ25C1, BD Biosciences, San Jose, CA) and subsequently Fab'-IgG FITC (Dako, Glostrup, DENMARK) were added and samples were acquired using a FACS-Canto II (BD Biosciences). Flow cytometry crossmatch for class-I antigens was considered positive in the CD3+ gate when the ratio: median fluorescence value Serum / median fluorescence value Negative Control was > 1.5; for class-II antigens, the FCXM was considered positive in CD19+ gate when the ratio was > 2.0.

HLA typing

Donors were typed for HLA locus A, B and DRB1 by low resolution SSP (Life Technologies, Brown Deer, WI).

Donor selection

Once a donor HLA-typing was confirmed, the anti-HLA antibody profile was assessed for all sera. If one serum was eligible for anti-HLA antibody profile testing, subsequent CDC and FCXM was performed.

Statistical analysis

The correlation of mean fluorescence intensities among N, DIL and C1q was assessed by the Spearman test. The number of positive beads was compared by the Wilcoxon test and $p < 0.05$ was considered significant. All the tests were performed using GraphPad software version 5.0 (San Diego, CA).

Results

Correlation of raw MFI data

In order to assess the relationship of raw MFI data of neat sera (N), diluted (DIL) and C1q test (C1q), the MFI values of 1,746 beads with HLA-class-I antigens were compared (Fig 1). A positive correlation of raw MFI data between N and DIL serum was observed ($r = 0.72$; $p < 0.001$), whereas the correlation between N and C1q raw MFI values was poorer ($r = 0.45$; $p < 0.001$). Nevertheless, a better correlation of raw MFI data C1q and DIL serum was observed ($r = 0.58$; $p < 0.001$).

Anti-HLA antibody profiles in highly sensitized patients

Serum reactivity was stratified based on the combination of N, DIL and C1q positive-beads. The results allowed us to discriminate in high or low titer with DIL serum and fixing and non-fixing antibodies after the C1q test. The persistence of high-titer and fixing-complement antibodies, positive results in N, DIL and C1q (N/DIL/C1q) (+/+ /+) profile identified specificities at a very high risk in patients and should be considered unacceptable HLA antigens for a potential donor. The absolute number of beads tested is summarized in Fig 2 and a wider range of risk can be defined. Theoretically, all C1q positive beads have a high risk of CDC positive result, whereas other combinations can be stratified in low, moderate and high risk. Interestingly, 310 (36.1%) N positive-beads had negative results after DIL and C1q tests and could be considered as low risk specificities. Inversely, a prozone effect was confirmed in 26 (3.1%) N negative-beads, being positive in both after DIL and C1q tests. The HLA antigens associated with this profile (-/+ /+) should be considered as very high risk and, consequently, as prohibited specificities.

Description of highly-sensitized group

In our cohort of highly sensitized patients, the median of single antigen class-I positive beads was 51.5 beads in neat serum. After 1/160 dilution of the sera, a significant reduction in the

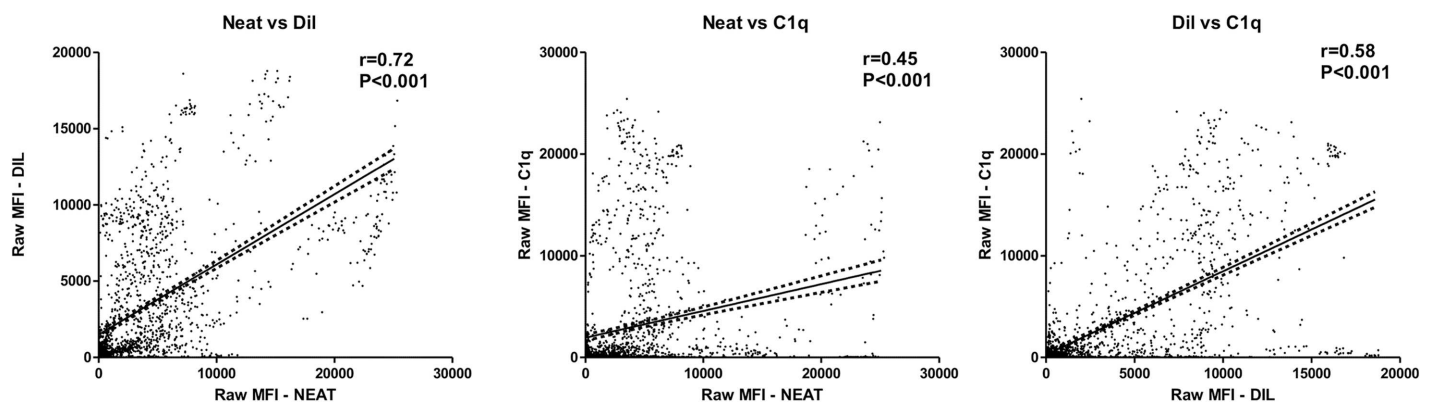


Fig 1. Correlation of raw MFI values after neat, diluted serum and C1q test. The raw MFI value after neat serum (neat), 1/160 diluted serum (DIL) and C1q test (C1q) were compared. The linear regression line and 95% confidence intervals in each plot are depicted (The correlation of MFI values was assessed by Spearman test (***, $p < 0.001$)).

doi:10.1371/journal.pone.0171463.g001

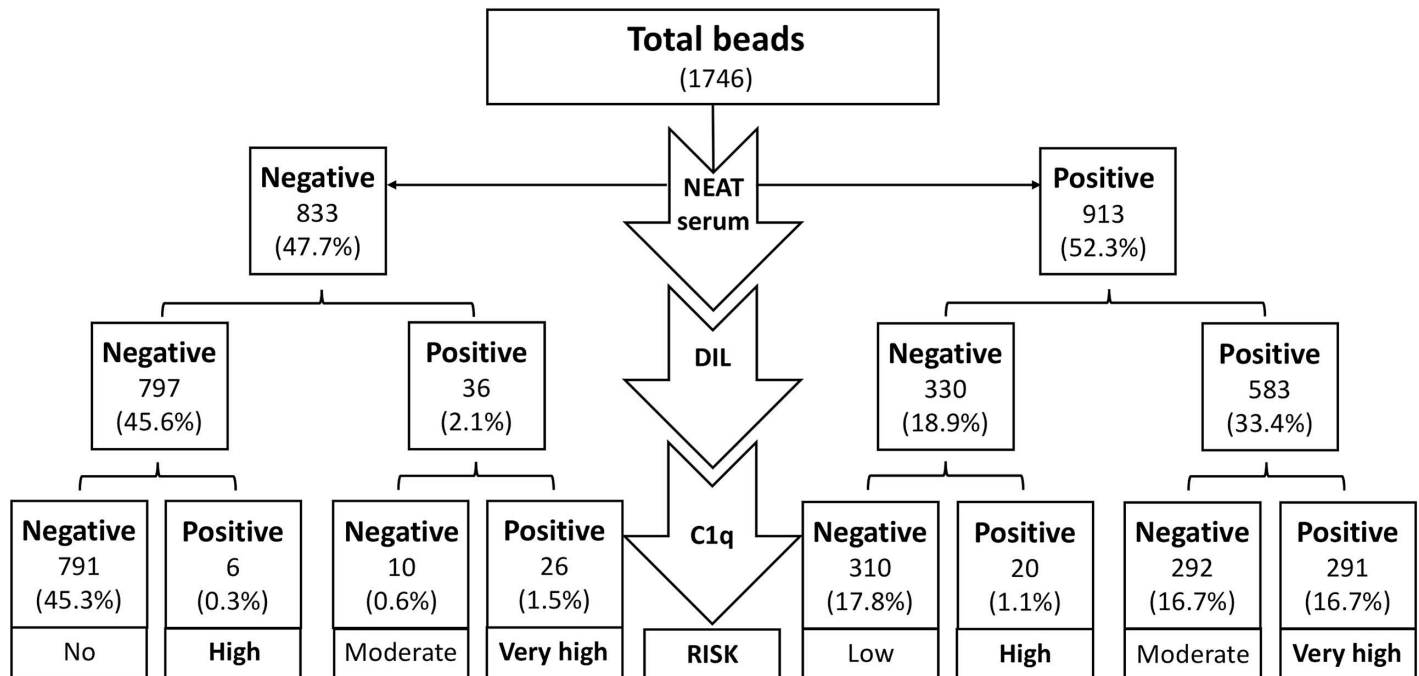


Fig 2. Stratification of the risk regarding positive bead results after neat serum, diluted serum and C1q test. A total number of 1746 beads were distributed according positive (+) and negative (-) results after neat (N), 1/160 diluted (DIL) serum and C1q test. The combination of the results render 8 profiles with potential different risk. The absolute number of beads are in parentheses and the percentage of total beads in every profile are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0171463.g002

median of positive beads was observed, 37.0 beads (Fig 3, $p < 0.01$). In 15 out of 18 highly-sensitized patients (83.3%), a number of unacceptable HLA antigens assigned with N serum with the Single Antigen test were negative after DIL, suggesting that these antibodies could be considered as low-titer antibodies. On the contrary, the prozone effect was observed in 7 out of 18 patients (38.8%) (at least one bead was considered negative in N serum and positive after DIL). Importantly, the ability to fix the complement was confirmed in 4 patients. The values of raw MFI of beads in N, DIL and C1q test are summarized in S1 Table. Furthermore, C1q analysis revealed a significant decrease in the median of the positive beads (24.0) in highly sensitized patients compared with positive beads after N serum test (Fig 3, $p < 0.001$).

From the beads to the patients

After the definition of profiles based on bead-results (Fig 2), in our cohort, we identified patients with different profiles based on the results of Single Antigen beads (N/DIL/C1q). In general, the behavior of most beads individually within a patient lowered the level of sensitization. Several examples are shown in S1 Fig. Thus, a highly-sensitized patient, defined only by testing neat serum with Single Antigen assay, could have a low risk profile when most of the beads have negative results after dilution and C1q test (+/-/-) (S1 Fig, panel A). The next risk level could be a patient with moderate risk (+/+/-) when most of the beads are negative in C1q test, despite confirmation of high titer with positive results after dilution (S1 Fig, panel B). The third risk level might be when the beads with anti-HLA antibodies are at low titer but are able to fix the complement (+/-/+), (S1 Fig, panel C). And finally, the most problematic case is a false negative in neat serum after Single Antigen, confirmed in the dilution (prozone effect) and which is able to fix the complement by C1q test (-/+ /+) (S1 Fig, panel D and S1 Table).

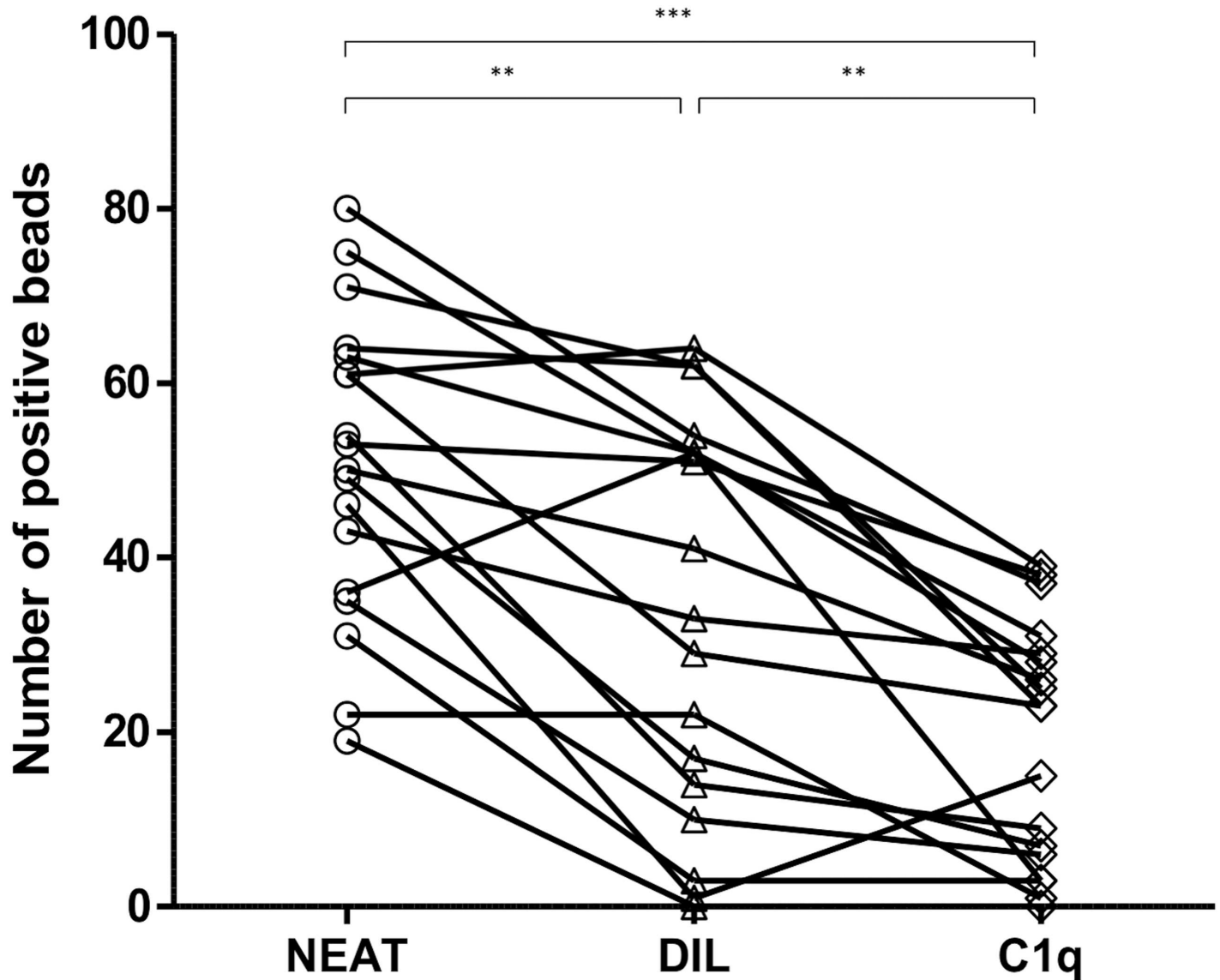


Fig 3. Number of positive beads after study of neat, diluted serum and C1q in highly-sensitized patients. The number of positive beads in 18 highly sensitized patients are depicted after Single Antigen anti-HLA class-I test in neat serum (neat, open circles), in 1/160 diluted serum (DIL, open triangles) and after C1q test (C1q, open diamonds) using the cut off value described in Material and Methods section. Differences of the medians were assessed by Wilcoxon test, (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pone.0171463.g003

Assessment of the risk for different anti-HLA antibodies profiles in complement-dependent cytotoxicity and flow cytometry crossmatches

We have tried to assess the risk of different anti-HLA antibody profiles defined in the previous section. In order to test the low-risk profile (+/-/-), donors with compatible HLA class-I antigens and sera with at least one HLA class-I antigen with (+/-/-) profile were selected. The MFI of N, DIL and C1q of specific donor-HLA antigens are summarized in Table 2 (profile #1). Subsequent CDC and FCXM were performed with negative results (in diluted sera). Furthermore, the moderate risk profile (+/+/-) was designed based on the same fashion (profile #2). Twenty reactions were tested and all CDC were negative, whereas the FCXM rendered a

Table 2. Assessment of different anti-HLA antibody profiles in highly- sensitized patients.

Profile	Donor type	Profile (Neat/ DIL/C1q)	HLA antigen with profile tested	Result Neat (MFI)	Result Dil (MFI)	Result C1q (MFI)	CDC Result	FXCM Result (Ratio ^a Neat)	FXCM Result (Ratio ^a Dil)
1	A*02,*03; B*18, *44	+/-/-	A*03:01	Positive (4272)	Negative (134)	Negative (36)	Negative	Positive (9.97)	Negative (1.14)
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/-/-	A*02:03	Positive (1555)	Negative (47)	Negative (41)	Negative	Positive (3.12)	Negative (0.98)
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/-/-	B*27:05	Positive (1775)	Negative (491)	Negative (21)	Negative	Positive (4.4)	Negative (1.09)
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/-/-	B*27:08	Positive (2276)	Negative (601)	Negative (27)	Negative	Positive (4.4)	Negative (1.09)
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/-/-	B*44:03	Positive (1779)	Negative (413)	Negative (20)	Negative	Positive (4.4)	Negative (1.09)
	A*24,*26; B*07, *51	+/-/-	B*07:02	Positive (3377)	Negative (1166)	Negative (22)	Negative	Positive (1.51)	NP
2	A*03,*29; B*44, *60	+/+/-	A*03:01	Positive (15047)	Positive (18039)	Negative (145)	Negative	Positive (1.71)	Negative (0.89)
	A*03,*29; B*44, *60	+/+/-	A*29:01	Positive (14410)	Positive (14298)	Negative (656)	Negative	Positive (1.71)	Negative (0.89)
	A*03,*29; B*44, *60	+/+/-	A*29:02	Positive (12296)	Positive (14566)	Negative (1067)	Negative	Positive (1.71)	Negative (0.89)
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/+/-	A*02:01	Positive (14109)	Positive (18281)	Negative (163)	Negative	Positive (5.99)	NP
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/+/-	A*02:03	Positive (15156)	Positive (18780)	Negative (219)	Negative	Positive (5.99)	NP
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/+/-	A*02:06	Positive (13062)	Positive (18129)	Negative (339)	Negative	Positive (5.99)	NP
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/+/-	A*24:02	Positive (14609)	Positive (12901)	Negative (306)	Negative	Positive (5.99)	NP
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/+/-	A*24:03	Positive (10604)	Positive (13489)	Negative (432)	Negative	Positive (5.99)	NP
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/+/-	B*27:08	Positive (5353)	Positive (1744)	Negative (455)	Negative	Positive (5.99)	NP
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/+/-	A*02:01	Positive (3293)	Positive (7030)	Negative (47)	Negative	Positive (3.34)	NP
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/+/-	A*02:03	Positive (2468)	Positive (5329)	Negative (55)	Negative	Positive (3.34)	NP
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/+/-	A*02:06	Positive (2615)	Positive (6298)	Negative (39)	Negative	Positive (3.34)	NP
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/+/-	B*27:05	Positive (4339)	Positive (2566)	Negative (33)	Negative	Positive (3.34)	NP
	A*02,*24; B*27, *44; C*01,*16	+/+/-	B*44:02	Positive (5044)	Positive (9799)	Negative (192)	Negative	Positive (3.34)	NP
	A*24,*26; B*07, *51	+/+/-	A*24:02	Positive (14608)	Positive (12901)	Negative (306)	Negative	Positive (10.16)	NP
	A*24,*26; B*07, *51	+/+/-	A*24:03	Positive (10604)	Positive (13489)	Negative (432)	Negative	Positive (10.16)	NP
	A*24,*26; B*07, *51	+/+/-	A*26:01	Positive (16065)	Positive (17054)	Negative (418)	Negative	Positive (10.16)	NP
	A*24,*26; B*07, *51	+/+/-	B*27:08	Positive (5353)	Positive (1744)	Negative (455)	Negative	Positive (10.16)	NP
	A*24,*26; B*07, *51	+/+/-	B*51:01	Positive (15689)	Positive (16431)	Negative (645)	Negative	Positive (10.16)	NP
	A*24,*26; B*07, *51	+/+/-	B*51:02	Positive (13805)	Positive (16333)	Negative (492)	Negative	Positive (10.16)	NP

(Continued)

Table 2. (Continued)

Profile	Donor type	Profile (Neat/DIL/C1q)	HLA antigen with profile tested	Result Neat (MFI)	Result Dil (MFI)	Result C1q (MFI)	CDC Result	FCXM Result (Ratio ^a Neat)	FCXM Result (Ratio ^a Dil)
3	A*03,*23; B*40,*60	+/-/+	B*40:01	Positive (5119)	Positive (1898)	Positive (20456)	Positive	Positive (2.16)	Negative (1.17)
	A*03,*23; B*40,*60	+/-/+	B*40:02	Positive (4171)	Positive (1686)	Positive (20242)	Positive	Positive (2.16)	Negative (1.17)
	A*24,*26; B*07,*51	+/-/+	A*24:02	Positive (5570)	Positive (1034)	Positive (12202)	Positive	Positive (1.7)	NP
	A*24,*26; B*07,*51	+/-/+	A*24:03	Positive (5910)	Positive (1235)	Positive (11710)	Positive	Positive (1.7)	NP
	A*24,*26; B*07,*51	+/-/+	B*07:02	Positive (4609)	Positive (1434)	Positive (21129)	Positive	Positive (2.08)	NP
4	A*03,*29; B*44,*60	-/+/+	A*03:01	Negative (519)	Positive (9298)	Positive (11801)	Positive	Positive (3.92)	Positive (6.26)
	A*03,*29; B*44,*60	-/+/+	A*29:01	Negative (210)	Positive (9985)	Positive (7132)	Positive	Positive (3.92)	Positive (6.26)
	A*03,*29; B*44,*60	-/+/+	A*29:02	Negative (231)	Positive (9917)	Positive (7341)	Positive	Positive (3.92)	Positive (6.26)
5	A*02,*24; B*27,*44; C*01,*16	+/+/+	B*27:05	Positive (3654)	Positive (6624)	Positive (9842)	Positive	Positive (4.88)	NP
	A*02,*24; B*27,*44; C*01,*16	+/+/+	B*27:08	Positive (3457)	Positive (7032)	Positive (9857)	Positive	Positive (4.88)	NP
	A*02,*24; B*27,*44; C*01,*16	+/+/+	B*27:05	Positive (6007)	Positive (2074)	Positive (18050)	Positive	Positive (4.86)	NP
	A*02,*24; B*27,*44; C*01,*16	+/+/+	B*27:08	Positive (5101)	Positive (1899)	Positive (18113)	Positive	Positive (4.86)	NP
	A*24,*26; B*07,*51	+/+/+	A*24:02	Positive (21360)	Positive (6193)	Positive (16041)	Positive	Positive (6.27)	NP
	A*24,*26; B*07,*51	+/+/+	A*24:03	Positive (22749)	Positive (6798)	Positive (17821)	Positive	Positive (6.27)	NP
	A*24,*26; B*07,*51	+/+/+	A*26:01	Positive (24048)	Positive (11671)	Positive (20357)	Positive	Positive (6.27)	NP
	A*24,*26; B*07,*51	+/+/+	B*51:01	Positive (24914)	Positive (10332)	Positive (12486)	Positive	Positive (6.27)	NP
	A*24,*26; B*07,*51	+/+/+	B*51:02	Positive (25112)	Positive (12142)	Positive (14275)	Positive	Positive (6.27)	NP

^a The ratio was calculated: median fluorescence value Serum / median fluorescence value Negative Control. Positive when ratio >1.5

N: neat serum

DIL: Diluted serum

NP: Not performed

doi:10.1371/journal.pone.0171463.t002

positive result. The high risk (+/-/+) and very high risk profiles (-/+/) and (+/+/+) were confirmed with positive CDC and FCXM results (profile #3, #4 and #5 respectively, Table 2).

Clinical risk-assessment of the presence of anti-HLA antibodies before kidney transplant recipients with positive FCXM

Five out of the 18 KTR from the study cohort with positive FCXM, but negative CDC, were transplanted. Graft biopsy was performed in four patients to discard ABMR and a protocol biopsy was done/carried out in one recipient. All of them presented class-II donor specific anti-HLA antibodies (DSA) in neat serum. Four of these five patients maintained their high titers of DSA in DIL serum, confirmed by C1q test (Table 3).

Table 3. Summary of anti-HLA antibody profile assessment in kidney transplant recipients with negative CDC and positive FCXM.

Case	Donor type	Profile (NEAT/DIL/C1q)	HLA antigen with profile	Neat (MFI)	Dii (MFI)	MFI C1q	CDC	FCXM (Ratio ^a Neat)	Biopsy indication	Biopsy time after KT	Biopsy result	Plasmapheresis Y/ N (number of plasmapheresis)
KTR1	DR*07,13DQ*02,06	+ / - / -	DR13	DR13 Positive (3010)	DR13 Negative (532)	DR13 Negative (390)	Negative	Positive (2.85)	Protocol	13 months	t0, i0, g0, v0, ct0, ci0, cg0, cv0, ptc0, ah0, mm1, C4d0	No
KTR2	DR*13,17DQ*02,06	+ / + / +	DQ6	DQ6 Positive (3655)	DQ6 Positive (3059)	DQ6 Positive (3018)	Negative	Positive (9.55)	Rejection suspicion	2 months	t1, i0, g1, v0, cg0, ci1, ct0, cv1, cg0, ah0, ptc1, mm0, C4d1	Yes (3)
KTR3	DR*04,16DQ*05,08	+ / + / +	DQ8	DQ8 Positive (11517)	DQ8 Positive (10259)	DQ8 Positive (15002)	Negative	Positive (3.7)	Rejection suspicion	1 month	t0, i0, g2, v0, cg0, ci1, ct1, cv0, ptc2, ah0, mm0, C4d3	Yes (6)
KTR4	DR*07,08DQ*02,04	- / + / +	DR7 DQ2	DR7 Negative (726) DQ2 Negative (1486)	DR7 Positive (9457) DQ2 Positive (11583)	DR7 Positive (12765) DQ2 Positive (9700)	Negative	Positive (4.91)	Rejection suspicion	3 months	t1, i0, g1, v0, cg1, ci1, ct1, cv0, ah0, mm0, ptc3, C4d1	Yes (6)
KTR5	DR*07,11DQ*02,03	+ / + / +	DQ2 DQA1*03	DQA1*03 Positive (7709)	DQA1*03 Positive (3206)	DQA1*03 Positive (6054)	Negative	Positive	Rejection suspicion	18 days	t0, i0, g0, v0, ci0, ct0, cg0, cv0, ah2, mm0, ptc1, C4d2	Yes (7)

KT: Kidney transplantation

KTR: Kidney Transplant Recipient

^aRatio FCXM: (median fluorescence channel of neat serum / median fluorescence channel negative control serum); cut off: >2.0

doi:10.1371/journal.pone.0171463.t003

Table 4. Summary of risk-scale proposed based on neat, diluted serum and C1q test results.

Neat	Diluted	C1q	Risk	Number of reactions tested	% of positive CDC	% of positive FCXM
-	-	-	Low	NP	NA	NA
+	-	-	Low	6	0	100*
-	+	-	Moderate	NP	NA	NA
+	+	-	Moderate	20	0	100**
-	-	+	High	NP	NA	NA
+	-	+	High	5	100	100***
-	+	+	Very high	3	100	100
+	+	+	Very high	9	100	100

NP: not performed

NA: not applicable

*5 sera with Negative FCXM after dilution

**3 sera with Negative FCXM after dilution

***2 sera with Negative FCXM after dilution

doi:10.1371/journal.pone.0171463.t004

The biopsy confirmed ABMR in the four patients with a high risk profile (1 patient with -/+/+ and 3 patients with +/+/+ profiles) DSA prior transplantation, whereas the patient with low titer and non-fixing complement DSA (+/-/- profile) showed no histological damage in protocol biopsy, without any impairment of graft function. These data confirm the risk-scale for anti-HLA antibodies, proposed and summarized in [Table 4](#).

Conclusions

The accurate assessment of anti-HLA antibody is mandatory for every tissue-typing laboratory which reports anti-HLA antibodies to identify patients who are eligible for highly-sensitized programs.

There are situations where assigning a positive antigen can be difficult due to low fluorescence signal, and further dilution studies should be performed to rule out a prozone effect[12].

The increased sensitivity of the Luminex test in comparison with earlier ELISA tests has the drawback of using the denatured HLA antigens coated on beads. Besides, the detection of both fixing and non-fixing complement antibodies have led to an increase in false positive results and/or low CDC test, routinely performed in tissue typing laboratories.

Despite the positive correlation between raw MFI data from N and DIL sera shown in this study, a reduction in the number of positive beads was observed after DIL sera in highly-sensitized patients. This demonstrates that in a group of highly-sensitized patients the number of positive beads could be overestimated, possibly due to low titer of anti-HLA antibodies. However, to figure out the potential risk of the low titer of anti-HLA antibodies (negative specificities after DIL) we suggest performing C1q assay. The complement-binding assay is useful in monitoring kidney transplant recipients at risk for allograft loss[13]. The readout of the possible combinations proposed here opens different scenarios other than just positive or negative specificities. We propose a gradual risk of the specificities derived from the results in N/DIL/C1q sera, summarized in [Fig 2](#) and [Table 4](#).

In order to assess the low risk of the specificities of sera with positive N results, but negative after DIL and C1q, we performed CDC and FCXM tests with PBMC with reactive HLA specificities. These sera resulted negative in the CDC, confirming the low risk specificities of the profile (+/-/-) ([Table 2](#)).

In contrast, in our cohort we observed a high rate of highly-sensitized patients (22.2%) with at least one HLA class-I specificity with prozone effect and complement-fixing antibodies (S1 Table). The detection of this phenomenon is crucial for accurate definition of an anti-HLA antibody profile. This is especially important to avoid negative vXM results that would render a final positive CDC crossmatch. The limitation of this observation is based on a single serum test, but patients on the renal waiting list are frequently monitored and this situation could be detected in other sera. Recently, the complement interference as a cause of fluctuations of serum anti-HLA antibody strength has been demonstrated [12,14].

As proof of concept, five patients from our cohort could be transplanted despite their hypersensitized status. In four of them, ABMR was demonstrated by biopsy and all of them showed a high risk profile as defined here. On the contrary, the one patient with a low profile who was transplanted from our cohort did not suffer ABMR or graft loss. Due to the scarce number of highly-sensitized patients finally transplanted in our institution, where only 5 patients were tested, a larger number of highly-sensitized patients should be monitored to confirm these findings.

A limitation of the present study was the use of only class-I coated beads for simplicity. Similar results were observed in class-II antigens coated beads (S1 File). However the interpretation of the anti-HLA antibody profile is more complex, based on reactions against the alpha and/or beta chains (DQA, DQB, DPA and/or DPB antigens) and consequently the assessment of the risk profile results are more difficult to demonstrate. Moreover, in our cohort of kidney transplant recipients, all anti-HLA antibody profiles tested were against class-II antigens with similar findings (Table 3).

We consider maintaining HLA-antigens with the (+/+/-) antibody profile (moderate risk) as unacceptable. Non-fixing IgG4 or IgG2 anti-HLA antibodies might sustain this profile, although in the present study we did not perform specific IgG subclass to confirm it. Irrespective of the IgG subclass, the IgG class switch cannot be ruled out and the change to a complement fixing IgG1 or IgG3 would increase the risk of a rejection event. Indeed, the recommendation from recent guidelines is to assign HLA mismatches from previous transplants as unacceptable antigens, despite the lack of complement binding antibodies [8].

The highly-sensitized patients spend prolonged periods of time on the waiting list, and the accurate definition of acceptable HLA antigens with low risk should be a priority in order to minimize the time waiting for an organ to be able to be allocated.

The better definition of anti-HLA antibody profile after dilution and C1q test could open up new opportunities in those highly-sensitized patients with a high number of HLA specificities at low titers and non-complement fixing antibodies but would also allow identification of the prozone effect with undesirable consequences in organ allocation systems based on vXM.

Supporting information

S1 Table. Highly sensitized patients with prozone beads detected.

(DOC)

S1 Fig. Representative patterns of anti-HLA antibody regarding positive beads after neat, dilution and C1q test. Tridimensional scatterplots of MFI values after neat serum (z-axis), 1/160 dilution (y-axis) and C1q (x-axis) test. The colour scale based on MFI from C1q test represents low level (blue), intermediate levels (red-orange) and high MFI levels (yellow). The risk profile showed after neat serum, 1/160 dilution and C1q test (neat/Dil/C1q) are A) low risk profile (+/-/-), B) moderate risk (+/+/-), C) high risk (+/-/+) and D) very high risk (-/+/+). The Excel macro used (<http://www.doka.ch/Excel3Dscatterplot.htm>).

(TIFF)

S1 File. Raw data of Single Antigen beads for class-I and class-II antigens after assessment of net, diluted serum and C1q test.
(XLSX)

Acknowledgments

The authors would like to thank David Ramos, Celestina Burgueño, María Luz Valcárcel and Margarita Gomez for their excellent technical support.

Author contributions

Conceptualization: DSS MLH MA IR.

Data curation: JI EA.

Formal analysis: JI EA ER.

Investigation: JI EA JG.

Methodology: DSS JI EA JG.

Project administration: DSS MLH MA.

Resources: MA MLH.

Software: DSS JI EA JG.

Supervision: DSS MLH.

Validation: DSS JI EA JG MLH.

Visualization: JI EA.

Writing – original draft: JI EA IR.

Writing – review & editing: DSS MLH ER MA.

References

1. Minucci PB, Grimaldi V, Casamassimi A, Cacciatore F, Sommese L, Picascia A, et al. Methodologies for anti-HLA antibody screening in patients awaiting kidney transplant: a comparative study. *Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*. 2011; 9(6):381–6.
2. Morris GP, Phelan DL, Jendrisak MD, Mohanakumar T. Virtual crossmatch by identification of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies by solid-phase immunoassay: a 30-month analysis in living donor kidney transplantation. *Human immunology*. 2010; 71(3):268–73. PMID: [20074605](#)
3. Jackson AM. The Virtual Crossmatch: An Essential Tool for Transplanting Sensitized Patients. *Clinical transplants*. 2014:131–6. PMID: [26281137](#)
4. Tait BD, Hudson F, Brewin G, Cantwell L, Holdsworth R. Solid phase HLA antibody detection technology--challenges in interpretation. *Tissue antigens*. 2010; 76(2):87–95. doi: [10.1111/j.1399-0039.2010.01486.x](#) PMID: [20403141](#)
5. Bray RA, Gebel HM. Strategies for human leukocyte antigen antibody detection. *Current opinion in organ transplantation*. 2009; 14(4):392–7. PMID: [19610172](#)
6. Endres RO, Kleinman SH, Carrick DM, Steele WR, Wright DJ, Norris PJ, et al. Identification of specificities of antibodies against human leukocyte antigens in blood donors. *Transfusion*. 2010; 50(8):1749–60. doi: [10.1111/j.1537-2995.2010.02589.x](#) PMID: [20158682](#)
7. Visentin J, Vigata M, Daburon S, Contin-Bordes C, Fremaux-Bacchi V, Dromer C, et al. Deciphering complement interference in anti-human leukocyte antigen antibody detection with flow beads assays. *Transplantation*. 2014; 98(6):625–31. doi: [10.1097/TP.0000000000000315](#) PMID: [25058376](#)

8. 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(1):19–47. doi: [10.1097/TP.0b013e31827a19cc](https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31827a19cc) PMID: [23238534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23238534/)
9. Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KM, Cusick MF, Gordon RA, Leventhal JR, et al. Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2015; 15(9):2421–30.
10. Visentin J, Guidicelli G, Taupin JL. Assessing HLA Antibody Strength: Have We Thought About Everything? *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2015; 15(12):3271.
11. Tambur AR, Ramon DS, Kaufman DB, Friedewald J, Luo X, Ho B, et al. Perception versus reality?: Virtual crossmatch--how to overcome some of the technical and logistic limitations. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009; 9(8):1886–93.
12. Berth M. Complement interference is not the same as a prozone phenomenon. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2015.
13. 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](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1302506) PMID: [24066742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24066742/)
14. Guidicelli G, Anies G, Bachelet T, Dubois V, Moreau JF, Merville P, et al. The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients. *Transplant immunology*. 2013; 29(1–4):17–21. doi: [10.1016/j.trim.2013.09.005](https://doi.org/10.1016/j.trim.2013.09.005) PMID: [24056164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24056164/)

