

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Biomedicina



TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LOS ANTICUERPOS ANTI-HLA DE UNIÓN AL COMPLEMENTO Y LA
SUPERVIVENCIA DEL TRASPLANTE RENAL**

**Memoria presentada por:
Claudia Melina Muñoz Herrera**

Para optar al grado de Doctor

Director:
Doctor Miguel Ángel López Nevot
Granada, 2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Claudia Melina Muñoz Herrera
ISBN: 978-84-1117-008-4
URI: <https://hdl.handle.net/10481/84483>

El doctorando Claudia Melina Muñoz Herrera y los directores de la tesis Miguel Ángel López-Nevot:

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Lugar y fecha: Granada a 31 de mayo de 2023

Directores de la Tesis Doctorando

Doctorando

Firma

Firma

*Dedicada a Henry,
gran esposo y padre ejemplar.*

AGRADECIMIENTOS

En agradecimiento profundo a todos los que hicieron que esta tesis pudiera llevarse a cabo, especialmente a mi esposo Henry, a mis hijos, a mis padres Álvaro y Melina y a mis hermanos, quienes con su amor y apoyo incondicional son siempre mi principal motivación. Gracias porque son ustedes la base para culminar este sueño.

Infinitas gracias a mi Director de Tesis, Doctor Miguel Ángel López-Nevot, quien ha creído en mis capacidades para desarrollar este trabajo. Valoro su gran experiencia, su conocimiento y la bondad con la que me ha orientado y transmitido su saber. Encuentro en él un gran maestro, una excelente persona y me siento orgullosa de haber podido trabajar a su lado en este proyecto y poder culminar con éxito el Doctorado.

Gracias al equipo de trabajo del laboratorio de HLA del Hospital Virgen de las Nieves, especialmente a Juan Francisco Gutiérrez-Bautista por su apoyo incondicional y desinteresado en todo este proceso, sin su ayuda no hubiera sido posible culminar este camino.

Gracias a la Clínica Imbanaco, con quienes he recorrido un camino de más de una década, y quienes desde el principio me han apoyado y han creído en mi talento, permitiéndome entregar lo mejor de mí como profesional. A la Doctora Isabella Caicedo, quien me ha motivado para continuar mi formación y culminar con este título de Doctorado y quien ha depositado su confianza en mí para liderar el laboratorio de Inmunogenética.

Y por supuesto, muchas gracias a todos los pacientes porque son ellos la principal motivación para llevar a cabo este trabajo.

Claudia Muñoz Herrera

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN

1. Marco teórico

1.1 Complejo Mayor de Histocompatibilidad

1.2 Estructura y función del MHC

1.2.1 Estructura de las moléculas de HLA

1.2.2 Función de las moléculas de HLA

1.3 Presentación de Antígenos

1.4 Respuesta humoral a la presentación de antígenos

1.5 Anticuerpos fijadores de Complemento

1.6 Sistema de Complemento

2. Trasplante Renal

2.1 Compatibilidad en el trasplante renal

2.2 Alorreconocimiento

2.2.1 Alorreconocimiento directo

2.2.2 Alorreconocimiento indirecto

2.3 Sensibilización contra las moléculas HLA en trasplante renal

2.4 Terapia de Inmunosupresión

2.4.1 Terapia de Inducción y de mantenimiento

2.4.2 Monitoreo de los niveles de inmunosupresión y de la función renal

2.4.3 Terapia de rescate

2.5 Rechazo del Injerto Renal

2.5.1 Rechazo hiperagudo

2.5.2 Rechazo agudo

2.5.3 Rechazo crónico

2.6 Criterios Banff

2.7 Protocolos pre Trasplante Renal y de Seguimiento Pos Trasplante

2.7.1 Ingreso y mantenimiento en lista de espera

2.7.2 Seguimiento Pos trasplante renal

II. HIPÓTESIS

III. OBJETIVO

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Población de estudio
2. Criterios de inclusión
3. Criterios de exclusión
4. Tipo de muestra
5. Técnica de C1q
6. Análisis estadístico

V. RESULTADOS

1. Análisis descriptivo de la población y características pre trasplante renal
2. Análisis descriptivo de la población y características pos trasplante renal
 - 2.1 Eventos de rechazo
 - 2.2 Supervivencia del injerto y su asociación a la presencia de DSA
 - 2.3 Pérdida del injerto renal
 - 2.4 Evaluación de los valores de MFI presentes en los DSA y la relación con su capacidad de fijar complemento
 - 2.5 Evaluación de los DSA específicos de locus y la asociación con su capacidad para unirse al complemento

VI. DISCUSIÓN

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. Mapa genómico simplificado del Sistema HLA
2. Figura 2. Sistema HLA
3. Figura 3. Estructura de las moléculas de HLA
4. Figura 4. Moléculas HLA clase I y clase II, estructura y sitio de unión a péptidos
5. Figura 5. Procesamiento de antígenos y presentación en las moléculas HLA clase I
6. Figura 6. Procesamiento de antígenos y presentación en las moléculas HLA clase II
7. Figura 7. Activación del sistema de Complemento
8. Figura 8. Polimorfismo de las moléculas de HLA
9. Figura 9. MHC, alelos HLA y epítomos
10. Figura 10. Epletas compartidas entre diferentes moléculas de HLA
11. Figura 11. Terapia de inducción y mecanismos de inmunosupresión
12. Figura 12. Eventos en el tiempo del trasplante renal
13. Figura 13. Estudio Inmunológico pre trasplante renal
14. Figura 14. Detección de anticuerpos fijadores de complemento por el kit C1qScreen™ de *One Lambda*
15. Figura 15. Asociación entre la presencia de DSA con capacidad de fijar el complemento en los pacientes que presentaron eventos de rechazo
16. Figura 16. Asociación entre la presencia de DSA con capacidad de fijar el complemento y el desarrollo de eventos de rechazo
17. Figura 17. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia del injerto renal en relación con la presencia de DSA
18. Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia del injerto renal en relación con la presencia de DSA fijadores y no fijadores de complemento
19. Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia del injerto renal en las tres poblaciones observadas

20. Figura 20. Asociación encontrada entre la presencia de DSA con capacidad de fijar el complemento y la pérdida del injerto renal
21. Figura 21. Asociación entre los valores de MFI y la capacidad de unión a complemento por los DSA
22. Figura 22. Valor cercano a la significancia de los DSA dirigidos contra HLA-DQ y su capacidad para unirse al complemento

ÍNDICE DE TABLAS

1. Tabla 1. Variables analizadas pre trasplante
2. Tabla 2. Variables analizadas pos trasplante

ABREVIATURAS

MHC:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
HLA:	Antígeno Leucocitario Humano
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TCR:	Receptor de células T
KIR:	Receptor de células NK
PBR:	Sitio de Unión de Péptido
β_2 m:	β_2 -microglobulina
RE:	Retículo Endoplásmico
TAP:	Transportador asociado con la presentación de antígeno
LMP:	Complejo polipeptídico de baja masa molecular
TAPBPR:	Proteína relacionada con la Tapasina
Ii:	Cadena invariable
CLIP:	Péptido de cadena invariable asociado a clase II
APC:	Células presentadoras de antígenos
LT:	Linfocitos T
LB:	Linfocitos B
Fc:	Fragmento cristizable
MAC:	Complejo de ataque a membrana
IL:	Interleuquina
ESRD:	Enfermedad renal en etapa terminal
TFG:	Tasa de Filtración Glomerular
INS:	Instituto Nacional de Salud, Colombia
KDIGO:	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
Scr:	Niveles de Creatinina Sérica
DAMP:	Patrones moleculares asociados a daño
DSA:	Anticuerpos Donante Específico
CDC:	Citotóxicidad dependiente de complemento
PRA:	Panel reactivo de anticuerpos

cPRA:	PRA calculado
AMR:	Rechazo Mediado por Anticuerpos
TCMR:	Rechazo agudo celular mediado por células T
EFI:	European Federation for Immunogenetics
ASHI:	American Society for Histocompatibility and Immunogenetics
FCXM:	Prueba cruzada por citometría de flujo
HUVN:	Hospital Universitario Virgen de las Nieves
Ag-Ac:	Antígeno-Anticuerpo
MFI:	Intensidad de Fluorescencia Media

RESUMEN

Las moléculas de HLA son moléculas altamente polimórficas y representan un reto importante a considerar en la compatibilidad del trasplante renal, debido a que su reconocimiento, por parte del sistema inmunológico del receptor, puede conducir a la formación de anticuerpos donante específico (DSA), lo que conlleva a respuestas fuertes y duraderas con resultados perjudiciales en la supervivencia del injerto renal.

El rechazo mediado por anticuerpos (AMR) constituye uno de los retos más importantes en el contexto del trasplante renal, debido a que la unión de los DSA al injerto, desencadenan la activación de la cascada del complemento, lo que conlleva a la pérdida del trasplante. Por su parte, la capacidad de activación del complemento por parte de los DSA varía significativamente de acuerdo con su afinidad para unirse a la molécula de C1q, primer paso de esta vía lítica. Sin embargo, se ha discutido si la presencia de DSA que no tienen capacidad fijadora de complemento, podrían no conducir al rechazo del órgano trasplantado.

OBJETIVO

Nuestro objetivo fue determinar si la categorización de los DSA de acuerdo a su capacidad para unirse a las moléculas del complemento, podría ser una herramienta útil en el seguimiento pos trasplante renal. Para esto, se llevo a cabo la evaluación de los DSA para establecer si existe una posible asociación entre la presencia de DSA no fijadores de complemento y la supervivencia del injerto renal, así como, una asociación de los DSA fijadores de complemento y la pérdida del injerto renal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nuestro estudio incluyó 245 pacientes trasplantados en un periodo de 5 años, en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN) de Granada, España. En 26 pacientes se encontró presencia de DSA. De estos, 17 pacientes (6,9%) con DSA no fijadores de complemento y 9 pacientes (3,7%) con DSA fijadores de complemento.

RESULTADOS

Los resultados de nuestro estudio demostraron una asociación estadísticamente significativa entre la frecuencia de los eventos de rechazo y la presencia de DSA con capacidad de unirse a las moléculas del complemento. Por su parte, cuando los DSA no tenían capacidad para fijar complemento, esto se asoció significativamente con menos eventos de rechazo. Por lo que, encontramos que la categorización de los DSA de acuerdo a su capacidad para unirse al complemento otorga un valor agregado en la detección temprana de una posible lesión del injerto renal.

Las tasas de supervivencia del injerto renal disminuyeron significativamente en aquellos pacientes que desarrollaron DSA con capacidad de fijar complemento. Sin embargo, se mantuvieron similares entre los pacientes que no desarrollaron DSA y aquellos que desarrollaron DSA sin capacidad para unirse al complemento.

Nuestros resultados demostraron también que la presencia de DSA con capacidad de unirse a las moléculas del complemento está fuertemente asociada con falla y pérdida del injerto renal cuando se compararon con los pacientes que desarrollaron DSA sin capacidad de unirse al complemento.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que la detección de la capacidad de unión al complemento por los DSA podría ser utilizado como marcador de pronóstico para predecir el resultado de AMR y la sobrevida del injerto en aquellos pacientes con trasplante de riñón que desarrollen DSA positivos.

SUMMARY

HLA molecules are highly polymorphic molecules and represent an important challenge to consider in the compatibility of kidney transplantation, due their recognition, by the recipient's immune system, can lead to the formation of donor-specific antibodies (DSA), which leads to responses strong and long lasting with detrimental results in renal graft survival.

Antibody-mediated rejection (AMR) constitutes one of the most important challenges in the context of kidney transplantation, since the binding of DSA to the graft triggers the activation of the complement cascade, which leads to the loss of the transplant. On the other hand, the capacity of complement activation by the DSA varies significantly according to its affinity to bind to the C1q molecule, the first step of this lytic pathway. However, it has been discussed whether the presence of DSA that does not have complement-fixing capacity could not lead to rejection of the transplanted organ.

OBJECTIVE

Our objective was to determine whether the categorization of DSA according to their ability to bind complement molecules could be a useful tool in post-kidney transplant follow-up. For this, the DSA evaluation was carried out to establish if there is a possible association between the presence of non-complement fixing DSA and renal graft survival, as well as, an association of complement-fixing DSA and the loss of the kidney graft.

MATERIALS AND METHODS

Our study included 245 transplant patients over a 5-year period at the Virgen de las Nieves University Hospital (HUVN) in Granada, Spain. In 26 patients the presence of DSA was found. Of these, 17 patients (6.9%) with non-complement-fixing DSA and 9 patients (3.7%) with complement-fixing DSA.

RESULTS

The results of our study demonstrated a statistically significant association between the frequency of rejection events and the presence of DSA with the ability to bind complement molecules. On the other hand, when the DSA did not have the ability to fix complement, this was associated with significantly fewer rejection events. Therefore, we found that the categorization of DSA according to their ability to bind complement provides added value in the early detection of possible renal graft injury.

Renal graft survival rates were significantly decreased in those patients who developed DSA with complement-fixing ability. However, they remained similar between patients who did not develop DSA and those who developed DSA without complement-binding ability.

Our results also demonstrated that the presence of DSA with the ability to bind complement molecules is strongly associated with kidney graft failure and loss when compared to patients who developed DSA without complement binding ability.

CONCLUSIONS

Our results suggest that detection of complement binding capacity by DSA could be used as a prognostic marker to predict AMR outcome and graft survival in DSA-positive kidney transplant patients.

I. INTRODUCCIÓN

1. Marco teórico

1.1 Complejo Mayor de Histocompatibilidad

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), comprende la región cromosómica ubicada en el brazo corto del cromosoma 6, con un tamaño aproximado de 4 megabases (Mb). El MHC humano se denomina Sistema HLA (Antígeno Leucocitario Humano) por las moléculas que codifica, llamadas así porque fueron detectadas por primera vez, en los años 50, expresadas en la membrana de los leucocitos humanos y no en la de los hematíes. El Sistema HLA contiene más de 100 genes de los cuales cerca del 40% son responsables de la respuesta inmunológica adquirida porque las moléculas HLA tienen como función la presentación de péptidos al receptor de los linfocitos T (TCR) que de esta forma se activan y median la respuesta específica para la eliminación del patógeno^{1,2}.

El sistema HLA es una región altamente polimórfica. Se cree que este polimorfismo se debe a la adaptación evolutiva de las moléculas para detectar y generar una respuesta inmunológica contra patógenos³ que han ido cambiando durante su coexistencia con la especie humana. El alto grado de polimorfismo de las moléculas HLA es una ventaja biológica para la especie humana, como lo es para las distintas especies vivas que tienen su propio Sistema de Histocompatibilidad. Diferentes estudios sugieren que el alto grado de polimorfismo es el resultado no solamente del proceso evolutivo de las moléculas, sino de la adaptación de las distintas variantes raciales a espacios geográficos diferentes que albergan microorganismos patogénicos característicos, lo que han dado lugar a los patrones de variación que se pueden observar en las moléculas HLA⁴. Por tanto, el brazo corto del cromosoma 6 contiene quizá el grupo de genes más grande del genoma humano con una alta tasa

de actividad transcripcional. El loci HLA-B, es el gen más polimórfico no solo en el cromosoma 6, sino en el genoma humano⁵.

1.2 Estructura y función del MHC

Dentro de los genes del MHC humano encontramos dos subfamilias genómicas denominadas HLA clase I y HLA clase II¹ (Figura 1). Existe también una región central, ubicada entre las de HLA de clase I y clase II, denominada región III, que contiene los genes que codifican para varios factores del sistema de complemento y para el factor de necrosis tumoral (TNF) (Figura 2)^{2,6}. La región HLA clase I contiene las moléculas clásicas A, B y C, (altamente polimórficas) y las moléculas no clásicas HLA-E, F y G, y cuatro pseudogenes HLA-H, K, J y L. Por su parte, el HLA clase II contiene las moléculas HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, así como, las moléculas DRB3, DRB4 y DRB5. Además, se encuentran otros genes menos polimórficos como son los que codifican para las moléculas DM y DO, los cuales son parte esencial para la presentación de antígenos vía clase II, así como las moléculas TAP (Transportador asociado con la presentación de antígeno) y el complejo polipeptídico de baja masa molecular (LMP) necesarias para la presentación de antígenos vía clase I⁷.

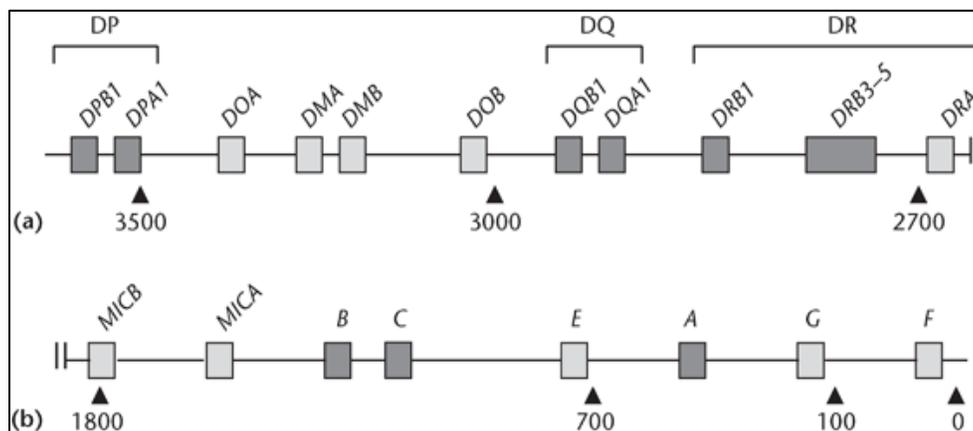


Figura 1. Mapa genómico simplificado del Sistema HLA¹: Encontramos las moléculas HLA de clase II en la zona más centromérica (a) y las moléculas HLA de clase I en la parte más telomérica del cromosoma (b). El mapa muestra las moléculas HLA que son altamente polimórficas (cajas oscuras) (Hughes AL. *Major Histocompatibility Complex (MHC)*, 2008).

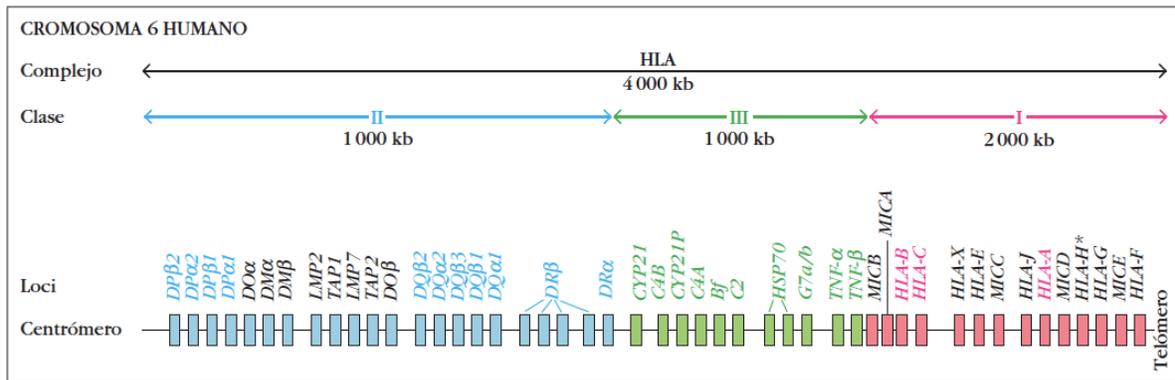


Figura 2. Sistema HLA⁶: Ubicadas en el cromosoma 6 humano, hacia el telómero se encuentran las moléculas de HLA de clase I (color rojo) y hacia el centrómero se encuentran localizadas las moléculas de HLA de clase II (color azul). Por su parte, en la región central encontramos las moléculas de HLA de clase III (color verde) en donde se encuentran los genes que codifican para el sistema de complemento y el TNF (Kindt et al. *Inmunología de Kuby*, 2007).

Las moléculas de HLA juegan un papel importante en la presentación de antígenos al unir péptidos que posteriormente serán reconocidos por el TCR. Las moléculas de HLA clase I clásicas, presentes en todas las células nucleadas del cuerpo, se encuentran involucradas con la presentación de antígenos a los linfocitos T (LT) citotóxicos (CD8⁺). Por lo tanto, las moléculas de HLA clase I son partícipes de la vigilancia inmunológica en la cual los linfocitos T reciben constantemente información de los péptidos presentados en busca del reconocimiento de lo no propio o de péptidos propios alterados, para inducir la activación de los LT citotóxicos y así destruir el agente extraño⁸. Por su parte, las moléculas de HLA clase II (HLA-DR, -DQ y -DP), se expresan en la membrana celular de las células T activadas, células B, células dendríticas y macrófagos, y están relacionados con la presentación de antígenos a las células T helper (CD4⁺)⁹.

La estructura de las moléculas de HLA clase I y clase II es similar en cuanto a que son heterodímeros y contienen: región extracelular de unión al péptido N-terminal, región transmembrana (hidrófoba) y región citoplasmática C-terminal. Sin embargo, su función difiere entre ellas y por tanto su estructura varía para cumplir su función específica¹⁰.

1.2.1 Estructura de las moléculas de HLA

- Moléculas de HLA clase I

Las moléculas de HLA clase I están constituidas por una cadena pesada α y una cadena ligera β . La cadena pesada es codificada en la región MHC y consta de tres dominios extracelulares (α_1 , α_2 y α_3), un segmento transmembrana y un extremo citoplasmático. Los dominios α_1 y α_2 , ubicados de manera más distal de la membrana celular, forman una hendidura entre sí, cerrada en ambos extremos y conforma el sitio de unión a péptidos, los cuales serán reconocidos por el TCR o por el receptor de células NK (KIR) y es el lugar donde se encuentra el mayor polimorfismo de las moléculas de clase I (Figura 3 izquierda y Figura 4b). Solo el dominio α_3 atraviesa la membrana y ancla la molécula a la superficie celular. Por su parte, la cadena liviana, también denominada β_2 -microglobulina (β_2 m), es codificada fuera de la región del MHC, específicamente en el cromosoma 15, y junto con la cadena α_3 conforman la estructura que da soporte a los sitios donde se une el péptido. Ambos dominios, α_3 y β_2 m, muestran homología con los dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas, por lo que demuestran que existe una relación evolutiva entre sí^{7,9,10} (Figura 3). Estos dominios también son importantes en la presentación de antígenos por su interacción con los correceptores y las moléculas coestimuladoras. Es importante resaltar también el papel que juega β_2 m en su interacción con los dominios α_1 y α_2 , ya que permite una mejor unión del péptido y da estabilidad a la cadena pesada del HLA de clase I⁸.

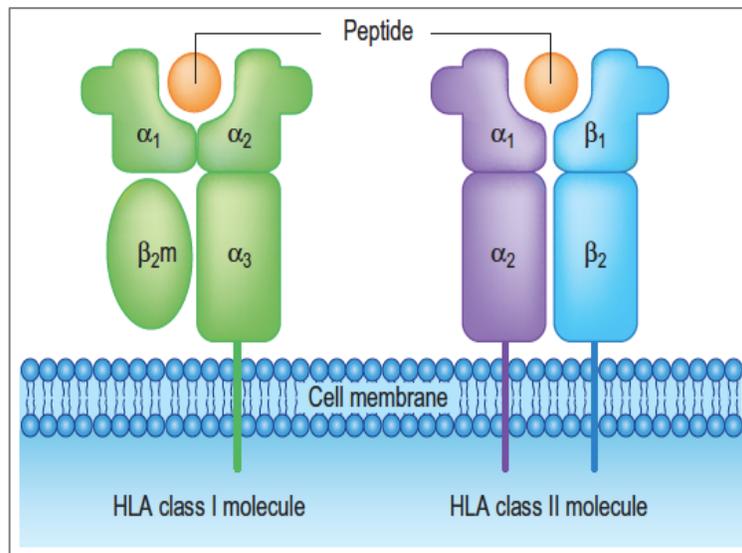


Figura 3. Estructura de las moléculas de HLA⁷: A la izquierda, molécula de HLA clase I. A la derecha, molécula de HLA clase II. Se observan las regiones extracelular, transmembrana y citoplasmática. El sitio de unión al péptido (PBR) está conformado por los dominios α_1 y α_2 en las moléculas de clase I y por los dominios α_1 y β_1 en las moléculas de clase II (Rich et al. *Clinical Immunology: Principles and Practice*, 2019).

- Moléculas de HLA clase II

Las moléculas de HLA clase II están constituidas por una cadena α y una cadena β , ambas codificadas por los genes del MHC. Contiene cuatro dominios extracelulares, dos para la cadena α y otros dos para cadena ligera β . Así como en las moléculas de HLA clase I, las cadenas α_2 y β_2 son homólogas a los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y anclan la molécula a la superficie celular. Por su parte, los dominios α_1 y β_1 , comprenden el PBR el cual es altamente polimórfico^{7,9,10} (Figura 3 derecha y Figura 4d).

Otra característica respecto de la estructura de las moléculas HLA es el sitio de unión al péptido, el cual difiere entre las moléculas de clase I y clase II. Las moléculas de clase I tienen la capacidad de adoptar péptidos con un tamaño de hasta 8-11 aminoácidos (Figura 4a) debido a que la hendidura de unión a péptidos se encuentra cerrada en ambos extremos, mientras que las moléculas de clase II, con una mayor capacidad, abarcan péptidos con longitudes de 8 a 30 aminoácidos (Figura 4c). Esta diferencia se debe principalmente a que la hendidura de unión a péptidos en clase II está abierta en los extremos, permitiendo que se unan péptidos de tamaños más grandes (Figura 4c)^{7,10,11}.

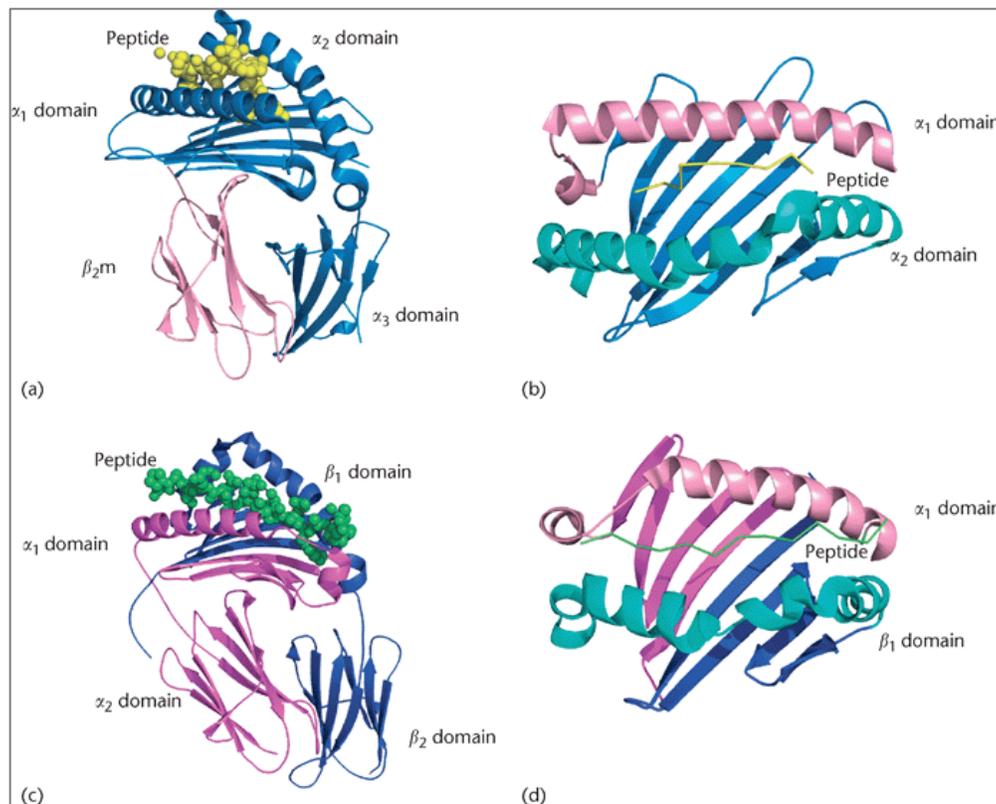


Figura 4. Moléculas HLA clase I y clase II, estructura y sitio de unión a péptidos¹¹: **4(a).** Molécula de HLA clase I compuesta por una cadena pesada (cadenas α_1 , α_2 y α_3) representadas en azul y por una cadena liviana $\beta_2 m$ representada en color rosado. Se observa el sitio de unión a péptido, con un péptido unido representado en color amarillo. **4(b).** Sitio de unión de péptidos y lugar donde se encuentra el mayor polimorfismo en moléculas de HLA clase I. **4(c).** Molécula de HLA clase II compuesta por una cadena α (cadenas α_1 , α_2) representadas en color fucsia y por una cadena β

(cadenas β_1 y β_2) representada en color azul. Se observa el sitio de unión a péptido, con un péptido unido representado en color verde. **4(b)**. Sitio de unión de péptidos y lugar donde se encuentra el mayor polimorfismo en moléculas de HLA clase II. (Liu *et al.* *Major Histocompatibility Complex: Interaction with Peptides*. eLS. August 2011).

1.2.2 Función de las moléculas de HLA

Como hemos descrito anteriormente, la principal función de las moléculas de HLA es la presentación continua de antígenos. Las moléculas de HLA están expresando constantemente péptidos provenientes de antígenos, propios o extraños, los cuales serán posteriormente reconocidos por LT a través de su TCR. Cada molécula de HLA tiene la capacidad de presentar una gran variedad de antígenos diferentes, sin embargo, presentará un solo péptido a la vez en su hendidura¹².

Las moléculas de HLA clase I se especializan en la presentación de péptidos intracelulares, aquellos derivados de proteínas nucleares y citosólicas, y son presentados a los LT citotóxicos. Estos antígenos son degradados en forma de péptidos en el citosol por acción del LMP, una estructura similar a los proteasomas, y posteriormente, son transportados hacia el retículo endoplásmico (RE) por acción de la proteína TAP una proteína dimérica, que media el transporte dependiente de ATP y ayuda en el transporte de péptidos de tamaño pequeño.

Una vez en el RE, los péptidos recién transportados se unen a las moléculas de HLA clase I vacías por acción de la tapasina, una glicoproteína asociada a TAP que permite la translocación del péptido a la molécula de HLA, formando un complejo entre la molécula de HLA clase I, la tapasina y el TAP. Este complejo permite que los péptidos sean recortados y editados hasta obtener el tamaño necesario para ser ensamblados en la hendidura de la molécula de HLA clase I. Durante más de dos décadas se consideró a la tapasina como la única proteína capaz de editar los péptidos, sin embargo, durante los últimos años se ha conocido a la proteína

relacionada con la tapasina (TAPBPR) como una segunda proteína la cual juega un papel importante en la edición de dichos péptidos. Algunos autores discuten si la acción de TAPBPR podría estar involucrada en la edición o carga de péptidos a las moléculas HLA de clase I, independiente de la tapasina¹³. Ambas proteínas juegan un papel importante al funcionar como potenciadores catalíticos para asociar, o disociar, péptidos dentro del surco de la molécula de HLA clase I, así como, su papel en el control de calidad de las moléculas que son ensambladas¹⁴.

Tan pronto como se une el péptido en la hendidura, se libera la tapasina para permitir que la molécula recién ensamblada sea transportada hacia la superficie celular, en donde será presentado y reconocido por los LT citotóxicos con la consecuente muerte celular en caso de reconocer péptidos no propios o péptidos propios alterados^{9,15} (Figura 5).

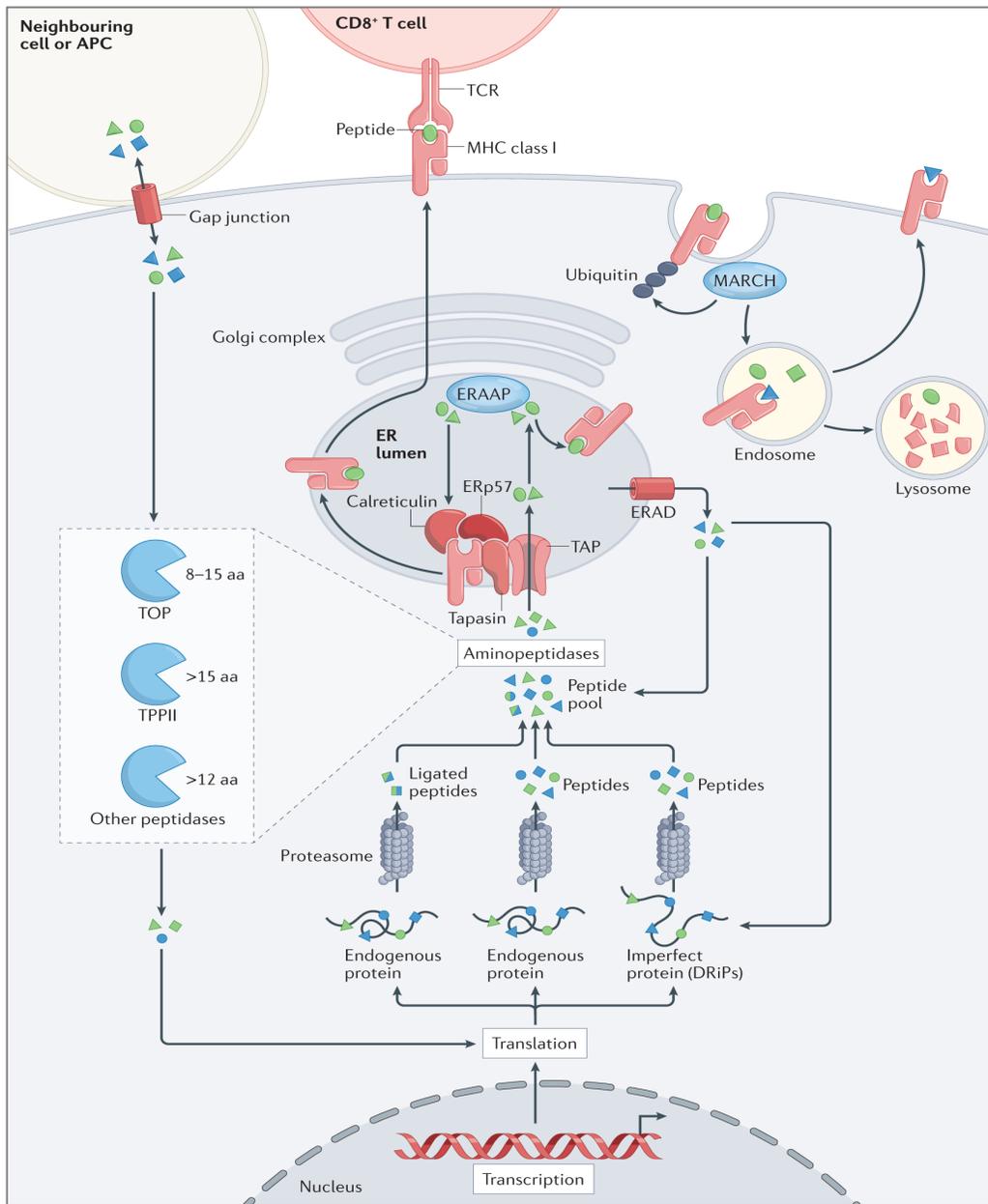


Figura 5. Procesamiento de antígenos y presentación en las moléculas HLA clase I¹⁶: Observamos, el procesamiento de antígenos en el citosol y transporte de los péptidos en el RE en donde se acoplan a las moléculas HLA de clase I y son presentados a los LT citotóxicos (*Pishesha et al. A guide to antigen processing and presentation. Nat Rev Immunol 2022*).

Las moléculas de HLA clase II están involucradas en la presentación de antígenos exógenos, es decir, antígenos que son interiorizados en la célula por endocitosis a través de vesículas y que posteriormente serán reconocidos por los LT helper. Los

antígenos endocitados son degradados por la acción proteolítica de los endosomas tardíos y de los lisosomas, los cuales permiten la generación de péptidos. Tanto la generación de péptidos como el ensamblaje se llevan a cabo dentro de las vesículas.

Dentro de la célula, la molécula de HLA clase II se encuentra asociada con un polipéptido denominado cadena invariable (Ii), el cual previene la retención de péptidos hasta que la molécula de HLA clase II esté correctamente ensamblada. Posteriormente, la Ii se degrada dejando un pequeño péptido denominado péptido de cadena invariable asociado a clase II (CLIP), que otorga mayor estabilidad a la molécula y que interactúa con el heterodímero DM permitiendo el intercambio de CLIP por péptidos antigénicos. Por su parte, las cadenas α y β de la molécula de HLA clase II son sintetizadas en el RE y transportadas a los endosomas en donde se unirá el péptido. La unión de la molécula de HLA clase II con el péptido da estabilidad a la molécula permitiendo su tránsito a la membrana celular para la posterior presentación de antígenos. Los péptidos presentados por las moléculas HLA de clase II son reconocidos por los LT helper quienes en respuesta liberarán linfocinas que conducirán a la estimulación de linfocitos B (LB) para que se lleve a cabo la producción de anticuerpos (Figura 6)^{9,15}.

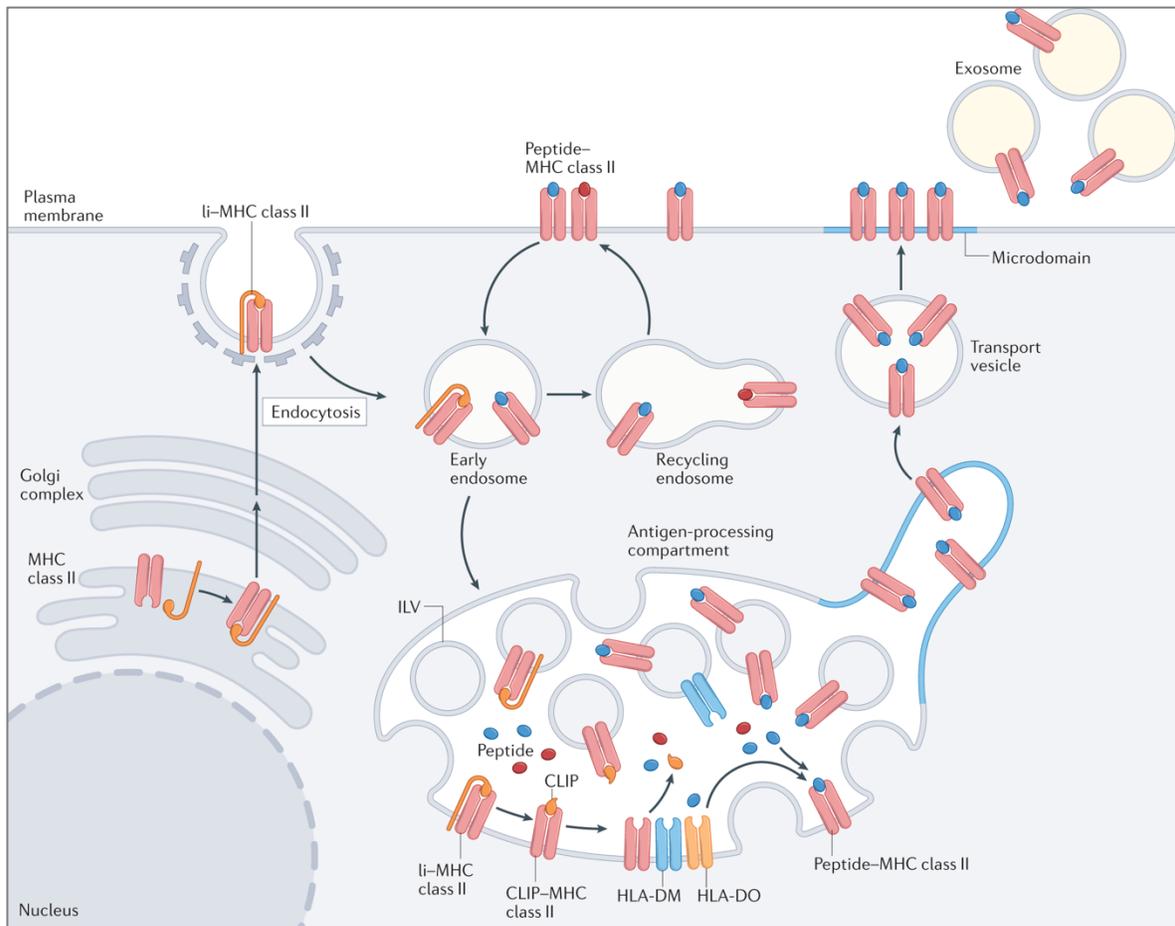


Figura 6. Procesamiento de antígenos y presentación en las moléculas HLA clase II¹⁶: Observamos el procesamiento de antígenos por endocitosis en vesículas, donde los péptidos se unen a las moléculas HLA de clase II y son presentados a los LT helper (*Pishesha et al. A guide to antigen processing and presentation. Nat Rev Immunol 2022*).

1.3 Presentación de Antígenos

Las células presentadoras de antígenos (APC), funcionan como guardianes constantes cuyo papel es vigilar y presentar antígenos a los LT a través de las moléculas de HLA clase I y clase II. Esta presentación constante de péptidos contribuye con la selección positiva y negativa de LT, para eliminar células T autorreactivas (selección negativa) y seleccionar células T con gran afinidad por una variedad de antígenos que son presentados por las moléculas de HLA (selección

positiva). La interacción entre las células APC y los LT ocurre en los órganos linfoides, es decir, es un proceso timo dependiente, a donde viajan las APC para presentar los antígenos a LT vírgenes. Un solo TCR es capaz de reconocer muchas combinaciones de la unión HLA-péptido, según con la afinidad con que se unan al TCR, sin embargo, es importante anotar que solo se activarán las células que expresen el receptor específico para el antígeno que es presentado.

Las células dendríticas, potentes APC, se activan y presentan antígenos constantemente a través de las moléculas de HLA clase II. Cuando los LT reconocen antígenos, se secretan diferentes citoquinas incluyendo el IFN γ lo que favorece el reconocimiento de los antígenos por parte de los LT mediante diversos mecanismos que incluyen el control transcripcional de los genes de MHC. Caso contrario, cuando se secreta interleuquina (IL) 10 (IL-10) esta puede inhibir la translocación de las moléculas de HLA a la superficie celular¹⁶.

La presentación de antígeno restringida por MHC, se define como el reconocimiento del péptido expresado en la hendidura de la molécula de HLA, por parte del TCR, que se une para un antígeno puntual, esta interacción es altamente específica. Este reconocimiento permite la transmisión de señales intracelulares que conllevan a la producción de factores de transcripción, la secreción de citoquinas y la consecuente diferenciación celular y proliferación de células efectoras y de memoria. Las células de memoria son células listas para responder de manera rápida ante el contacto nuevamente con el antígeno específico, estas células pueden permanecer en estado de quiescencia por largos periodos. La interacción por parte de los LT citotóxicos se lleva a cabo con una gran cantidad de células, debido a que la mayoría de células nucleadas expresan HLA de clase I, sin embargo, la presentación de antígenos a los LT CD4⁺ está restringida a un grupo celular específico como se discutió anteriormente^{16,17}.

Se ha descrito también la presentación cruzada de antígenos, en la cual antígenos extracelulares, que son endocitados, son presentados a través de las moléculas de HLA clase I. Los mecanismos moleculares a través de los cuales se lleva a cabo la presentación cruzada siguen estando en constante estudio y se cree éstos dependen de mecanismos diversos entre los que se encuentra el tipo de APC. Algunas proteínas involucradas, como las RAB7 y SEC22, son importantes para los procesos de presentación cruzada. Se cree que las células dendríticas pueden participar de la presentación cruzada como parte de la activación de una respuesta de células T CD8⁺ para permitir el reconocimiento de objetivos específicos¹⁶.

1.4 Respuesta humoral a la presentación de antígenos

La estimulación a los LB inicia cuando al activarse los LT CD4⁺ expresan el ligando para CD40 (CD40L) que se unirá a su receptor, la molécula CD40, presente en los LB. Esta estimulación conlleva a la proliferación y diferenciación celular de los LB en células plasmáticas de larga vida, capaces de secretar grandes cantidades de anticuerpos, y en LB de memoria. Los anticuerpos son proteínas producidas en respuesta al reconocimiento del antígeno los cuales son altamente específicos^{18,19}. Los LB de memoria se generan en los centros germinales, y al igual que las células plasmáticas, son de larga vida y no requieren un estímulo constante del antígeno. Se generan como respuesta al estímulo inicial y son dependientes de las respuestas celulares de LT. Permanecen en los órganos linfoides y en algunos casos, migran a sangre periférica donde recirculan para hacer guardia^{18,20}.

Los anticuerpos cumplen funciones específicas en la respuesta frente a lo extraño y, por lo tanto, varían en su región constante clasificándose en diferentes subtipos. Las subclases que se conocen de los anticuerpos se denominan IgM, IgD, IgG, IgE e IgA,

la unión del anticuerpo con su antígeno es muy específica por lo que tienen la capacidad de reconocer mínimos cambios en la conformación del antígeno, sin embargo, se ha descrito que los anticuerpos pueden unirse de manera cruzada a 2 o varios antígenos¹⁵.

Para que se lleve a cabo la respuesta humoral, se requiere que el anticuerpo entre en contacto con el antígeno específico. Dicha unión activa los mecanismos efectoros dentro de los que encontramos la participación del complemento, por la activación de la vía clásica, lo que conlleva a la activación en cascada y proteólisis de diferentes proteínas séricas, que se van a unir al complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y posterior ataque de membrana con la consecuente eliminación del antígeno extraño^{19,20}.

1.5 Anticuerpos fijadores de Complemento

Los subtipos de anticuerpos tienen capacidad diferente entre sí para activar la vía clásica del complemento. Se sabe que IgM (por su configuración pentamérica), IgG₁ e IgG₃, son potentes activadores del complemento. Por su parte IgG₂ e IgA son activadores débiles, mientras que IgG₄ no tiene capacidad para activar el complemento. Dicha capacidad se traduce en la afinidad que tienen los anticuerpos para unirse a la molécula de C1q, primer paso en la activación de la vía clásica del complemento.

La molécula de C1q se une al complemento cuando dos o más regiones Fc (Fragmento cristalizante) están expuestas. Dicho esto, debido a su configuración monomérica se requieren dos o más regiones Fc para que los anticuerpos tipo IgG se unan a C1q y activen el complemento^{18,19}.

1.6 Sistema de Complemento

La región central del MHC, denominada región III, contiene los genes que codifican para el sistema de complemento. El sistema de complemento fue descrito por Jules Bordet y Paul Ehrlich como un “conjunto de proteínas circulantes que complementan las respuestas mediadas por anticuerpos”²¹; el cual está compuesto por proteínas que circulan en su forma inactiva en sangre, linfa y líquido intersticial y que son secretadas por el hígado principalmente.

El complemento se activa rápidamente cuando sus receptores detectan patrones asociados a antígenos extraños o antígenos propios dañados, lo que conlleva a la proteólisis en cascada de las proteínas que da lugar a su forma activa y que finaliza con el ataque de membrana y la eliminación de lo extraño (Figura 7).

La vía clásica del complemento inicia cuando se identifican complejos Ag-Ac. La proteína C1q, primer componente de la vía clásica, se une a los anticuerpos fijadores de complemento que se encuentran unidos a los antígenos extraños, lo que conduce a proteólisis en cascada y formación de la convertasa C3 que escinden en C3a y C3b, y posteriormente, la formación de la convertasa C5 que escinden en C5a y C5b. Finalmente el C5b depositado en la superficie inicia el complejo de ataque a membrana (MAC), con el objetivo de eliminar el agente extraño. El complejo MAC forma un poro en la membrana celular, lo que conlleva a lesión tisular. El sistema de complemento cumple un papel fundamental en la inmunidad al regular directamente las respuestas celulares mediadas por LT y LB²².

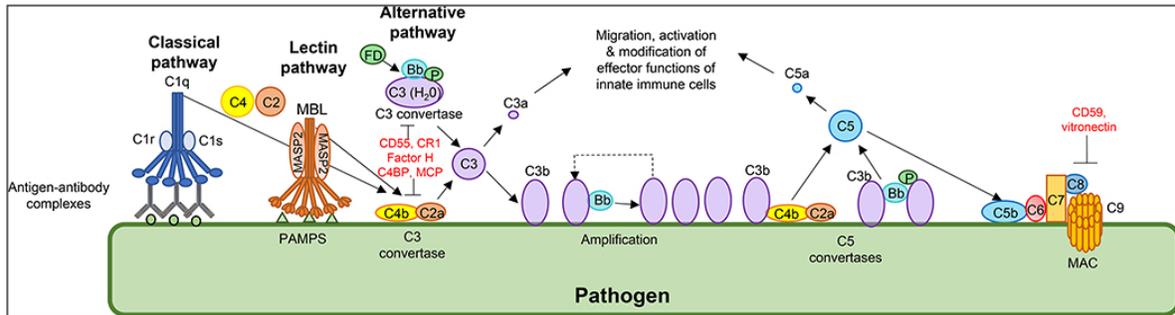


Figura 7. Activación del sistema de Complemento²¹: Las proteínas del Complemento se activan en cascada a través de la vía clásica, vía de la lectina y la vía alterna, por la formación de la convertasa C3, que escinden en C3a y C3b, y que conducen a la formación de C5 convertasa, que a su vez escinde en C5b y C5a, y que C5b unido a la membrana inicia el MAC y fomenta la reacción inflamatoria al atraer células del sistema inmune. En circulación existen proteínas inhibitoras (CD55, CR1, Factor H, proteína de unión a C4 (C4BP), proteína cofactor de membrana (MCP), CD59, vitronectina), que regulan la activación del complemento. (West et al. *Complement and the Regulation of T Cell Responses. Annu. Rev. Immunol.* 2018).

2. Trasplante Renal

El trasplante renal se ha convertido a en la terapia estándar para el reemplazo de órganos disfuncionales en los pacientes con enfermedad renal en etapa terminal (ESRD). Esta práctica se realiza desde 1960 y desde entonces se ha permitido cambiar la vida de millones de pacientes en el mundo.

La ESRD ocurre cuando hay una pérdida completa e irreversible de la función del riñón y la tasa de filtración glomerular (TFG) es inferior a 30 mL/min/1,73 m² (en la mayoría de los casos inferior a 15), lo que conlleva a problemas fisiológicos relacionados con la retención de líquidos, la anemia, alteraciones en el metabolismo, dislipidemia y desnutrición. Como consecuencia de ello, los pacientes requieren recibir con urgencia terapia de diálisis (peritoneal o hemodiálisis) o de lo contrario esta condición podría conducir a la muerte. Sin embargo, existe una alta tasa de

mortalidad asociada a la diálisis, en donde menos de la mitad de los pacientes que inician diálisis tienen una sobrevida superior a 5 años^{23,24}.

El trasplante renal, como terapia de reemplazo es la alternativa más viable para los pacientes con ESRD, que otorga calidad de vida por encima de la otorgada por la diálisis²⁵⁻²⁷. El estudio de Tonelli y colaboradores, que incluyó una revisión sistemática de 110 artículos con cerca de 2 millones de pacientes estudiados demostró que, en comparación con la diálisis, el trasplante renal disminuye las tasas de mortalidad y la probabilidad de eventos cardiovasculares, otorgando calidad de vida a los receptores renales²⁸. Adicionalmente, se favorecen económicamente los sistemas de salud, al disminuir los costos asociados con las complicaciones clínicas de los pacientes en diálisis vs. los costos del trasplante. Sin embargo, los tiempos prolongados en espera de un riñón compatible sumado a la escasez de donantes, representan un obstáculo importante a abordar y que perjudica significativamente a los pacientes. Como estrategia para minimizar los tiempos en lista de espera, se aborda a los pacientes y sus familiares o núcleo cercano en la búsqueda de donantes vivos voluntarios.

*La guía de práctica clínica sobre la evaluación y el manejo de candidatos para trasplante renal de 2020 - Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*²⁹, pretende establecer pautas, dirigidas a los profesionales de la salud, para el manejo de los pacientes candidatos a trasplante y que evalúan factores globales, dentro de los que se encuentran aspectos de salud y aspectos psicosociales de los pacientes y sus posibles donantes en el caso del donante vivo.

En el postrasplante renal, se requiere un control regular para el monitoreo de la función renal. En la fase inicial del trasplante se controla dos veces por semana durante el primer mes, frecuencia que va disminuyendo a una vez por mes durante

el primer año y en adelante cada 3-6 meses, de acuerdo con los protocolos clínicos establecidos para cada centro. Los niveles de creatinina sérica (Scr) son susceptibles de variación especialmente después de que se cursa con procesos virales o infecciosos, por lo tanto, un monitoreo constante de los niveles de Scr permitirán detectar a tiempo respuestas inmunológicas a los eventos infecciosos que podrían conllevar a rechazo del injerto. La sobrevida del injerto renal a largo plazo se ve afectada como consecuencia del control inadecuado de la respuesta humoral posterior a los eventos cursados²⁵.

2.1 Compatibilidad en el trasplante renal

Como hemos descrito anteriormente, el sistema HLA comprende moléculas altamente polimórficas, que en su gran mayoría se expresan como moléculas heterocigotas, como consecuencia del apareamiento al azar para mantener el polimorfismo de los loci HLA. Las moléculas HLA varían entre las diferentes poblaciones, así, encontramos poblaciones con grandes variaciones y que sabemos son poblaciones que sufrieron grandes migraciones, así como, poblaciones con pocas variaciones, siendo estos asentamientos cuya migración ha sido menor^{30,31}.

Dado el polimorfismo de las moléculas HLA, éste representa un reto importante a considerar en la compatibilidad del trasplante renal debido a que puede conducir a fuertes respuestas inmunológicas con resultados perjudiciales en la sobrevida del injerto. Se han descrito genes más polimórficos que otros, así, el loci HLA-B es el más polimórfico de las moléculas de HLA clase I y por su parte, el loci HLA-DRB1 es el más polimórfico de las moléculas de HLA clase II³² (Figura 8).

El control sobre el nombramiento de nuevas moléculas HLA, es responsabilidad del *Comité de Nomenclatura de la OMS para Factores del Sistema HLA*, quienes desde su

primera reunión en 1968 se reúne regularmente para mantener actualizada y disponible la información de la base de datos de alelos a través de <http://hla.alleles.org>³³.

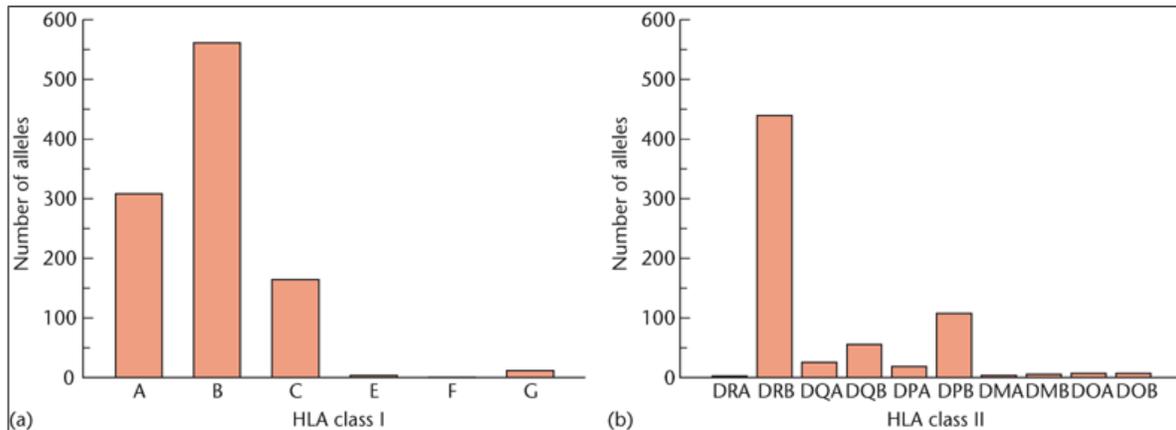


Figura 8. Polimorfismo de las moléculas de HLA³⁰: a. Moléculas de HLA clase I, se observa mayor polimorfismo en el loci HLA-B; b. Moléculas de HLA clase II, se observa mayor polimorfismo en el loci HLA-DRB1 (*Penn DJ, Ilmonen P. Major Histocompatibility Complex: Human. eLS. September 2005*).

En el trasplante renal, la compatibilidad entre individuos resulta compleja por el alto polimorfismo de las moléculas HLA descrito anteriormente. La situación ideal resultaría en encontrar que donante y receptor que sean 100% compatibles, sin embargo, esta situación solo será posible cuando el donante es un hermano cuya posibilidad de tener HLA idéntico es solo del 25%. Una mayor compatibilidad en la pareja donante-receptor resulta en una mejor supervivencia del injerto, minimiza las probabilidades de eventos de rechazo y por consecuencia disminuye la posibilidad de pérdida del injerto renal. Por lo anterior, los mejores resultados se obtendrán con donantes intrafamiliares como el caso de los hermanos o padres (denominado donante vivo relacionado), en comparación con la compatibilidad con donantes menos compatibles como el donante fallecido^{34,35}.

Las políticas actuales de asignación de órganos, desarrolladas en pro del beneficio que representa el trasplante renal para los pacientes con ESRD, incluyen la tipificación de los loci HLA como estrategia para evaluar la compatibilidad en la pareja donante-receptor, y la identificación de los anticuerpos anti-HLA que puedan estar presentes en los receptores de trasplante para identificar aquellas incompatibilidades inaceptables que puedan conducir a la pérdida temprana del injerto renal. Las guías KDIGO²⁹, son guías internacionales que sirven de directriz a los diferentes centros y las cuales se desarrollaron con el objetivo de estandarizar las recomendaciones mínimas, basadas en la evidencia, para los grupos clínicos involucrados en los programas de trasplante. Los protocolos incluyen la tipificación de al menos los loci HLA-A, -B, -DR, los cuales representan el mayor polimorfismo de las moléculas de HLA.

Los centros reguladores de trasplantes, tanto de Europa (Eurotransplant) como de Estados Unidos (Organ Procurement and Transplant Network [OPTN]), han establecido algoritmos para facilitar la asignación de órganos, basados en los beneficios observados de la compatibilidad HLA, lo que se traduce en que la mayor compatibilidad mejor es la supervivencia de los injertos trasplantados. Las estrategias establecidas en dichos algoritmos otorgan puntos por compatibilidad entre los loci del donante y del receptor, dando mayor puntaje a la compatibilidad en HLA-DR, seguida del HLA-B y por último la compatibilidad en HLA-A^{36,37}, considerándose hasta la fecha el *gold estándar* para la mayoría de los centros trasplantadores.

Si bien se han establecido reglas generales, cada país debe proponer sus propias reglas basadas en las características de su población. En Colombia, la donación de órganos está regulada por el Instituto Nacional de Salud (INS), quienes han establecido los criterios para la asignación de órganos³⁸. Dichas guías pretenden establecer pautas de equidad y transparencia, teniendo en cuenta las características clínicas de los receptores, así como las características inmunológicas de los mismos.

A pesar del esfuerzo en la búsqueda de compatibilidad entre donante y receptor, el HLA-DQ aún no ha sido considerado para la asignación de órganos porque se ha considerado menos polimórfico. Sin embargo, la evidencia actual demuestra que en la mayoría de los pacientes que experimentan eventos de rechazo o pérdida del injerto, la disparidad en el HLA-DQ ha conllevado a dichos eventos^{39,40}. Por lo anterior, centros trasplantadores de Francia y Gran Bretaña, han incorporado en sus criterios la compatibilidad del loci -DQ otorgando puntaje adicional^{41,42}. La práctica actual reúne a los expertos de todo el mundo para discutir y establecer la compatibilidad en el loci DQ como parte de los criterios de asignación de órganos.

2.2 Alorreconocimiento

Los eventos de rechazo asociados al trasplante renal ocurren cuando el sistema inmunológico del receptor responde frente a la identificación de patrones moleculares asociados a daño (DAMP) en el injerto y a la identificación de las diferencias entre lo propio y lo extraño. El reconocimiento de las moléculas de HLA del donante están asociadas con respuestas más fuertes y rápidas, a esta respuesta se le denomina alorreconocimiento⁴³.

2.2.1 Alorreconocimiento directo

Los injertos renales cuando están ex vivo se encuentran en ambientes de hipoxia/isquemia. Dicha reducción de oxígeno promueve la apoptosis celular y como consecuencia el reclutamiento de células de la inmunidad innata. Para disminuir la apoptosis celular y proteger el órgano, éstos se mantienen en hipotermia, de esta manera, se reduce el consumo de oxígeno y por tanto disminuye

el metabolismo celular del injerto. Sin embargo, aunque la preservación en hipotermia minimiza la lesión del injerto, tiempos prolongados en hipotermia y la reperfusión acelerada pueden inducir estrés celular con la consecuente generación de daño tisular.

En el momento del trasplante, producto de la isquemia en frío y del síndrome de reperfusión sin necrosis celular masiva, el riñón trasplantado libera DAMP que viajan al bazo, en donde a través de señales inmunitarias activadas por DAMP, son reconocidos por las células del receptor, especialmente por células dendríticas, macrófagos y LB, lo que conlleva al reconocimiento y presentación de antígenos no propios y a la generación de ambientes inflamatorios como parte de la respuesta inmunitaria. Dichos ambientes conducen a la infiltración celular en el tejido del injerto trasplantado como parte de la respuesta para eliminar las células dañadas^{43,44}. En términos generales, esta respuesta celular por DAMP es transitoria, sin embargo, una respuesta sostenida puede conducir a respuestas más fuertes causando daño celular al injerto.

En el alorreconocimiento directo la apoptosis celular también conlleva a la exposición de las moléculas de HLA del donante las cuales serán reconocidas por los LB, proceso que culmina con la producción de anticuerpos de tipo IgM como si se tratara de un antígeno timo independiente. Es bien sabido que las moléculas de HLA no tienen epítomos repetitivos, sin embargo, es probable que la alta carga antigénica y el ambiente pro inflamatorio generado en el momento del trasplante favorezcan este tipo de respuesta.

Por su parte, los LT que, como habíamos discutido anteriormente, durante su maduración sufren procesos de selección lo que permite que salgan a circulación únicamente LT con afinidad intermedia por el complejo MHC propio - antígeno;

tienen la capacidad de unirse a las moléculas de HLA del injerto, fenómeno que ocurre durante el trasplante y que explica la respuesta alodérmica. Una posible interpretación a este fenómeno puede ser que los LT con afinidad alta para unirse a MHC extraños no son eliminados en los procesos de selección negativa debido a que estos MHC no se expresan en las células del timo. El complejo antígeno - MHC extraño es reconocido por los LT alorreactivos cuando las células dendríticas del donante viajan al bazo, proceso que culmina con la activación de LT CD4⁺ y CD8⁺ efectores. Este fenómeno corresponde al alorreconocimiento directo por parte de los LT y es limitado ya que ocurre únicamente durante el tiempo de vida de las células dendríticas del donante⁴³.

La respuesta alorreactiva directa es sustituida por la respuesta alorreactiva indirecta en el cual la cooperación entre los LB y los LT participan del reconocimiento y presentación antigénica de forma que la respuesta corresponde a un proceso timo dependiente. Por lo tanto, en la respuesta indirecta los anticuerpos son de tipo IgG con mayor afinidad y especificidad por los antígenos HLA del donante, donde se generan respuestas más fuertes y con presencia de LB de memoria⁴³.

2.2.2 Alorreconocimiento indirecto

En el alorreconocimiento indirecto, las células dendríticas del receptor fagocitan restos celulares provenientes del injerto, los cuales contienen las moléculas de HLA del donante y que van a ser procesadas y presentadas como péptidos antigénicos no propios en las moléculas HLA del receptor. Cada molécula de HLA del donante dará lugar a un número diverso de péptidos que posteriormente serán reconocidos por múltiples clones de células T⁴⁴.

Como describimos anteriormente, la presentación cruzada es un fenómeno que se observa en el reconocimiento de los antígenos extraños en el trasplante. Este fenómeno se debe a que células dendríticas especializadas tienen la capacidad de presentar antígenos endocitados a través de las moléculas de HLA clase I que conllevan a la activación de LT CD8⁺.

No solo el reconocimiento del péptido presentado es suficiente para activar los LT, las moléculas coestimuladoras también hacen parte esencial de la presentación antigénica para permitir la activación de LT en células efectoras. El CD28 es una molécula coestimuladora expresada tanto en LT CD4⁺ como CD8⁺ y su ligando es la molécula B7. Por su parte, la interacción de CD40 con CD154 permite la proliferación y diferenciación de LT CD4⁺ y CD8⁺. Otras moléculas coestimuladoras, homologas estructuralmente, median la regulación de los LT para inhibir sus mecanismos de acción, ejemplo de esto es el CTLA-4, que interactúa también con el ligando B7. Por lo tanto, las señales recibidas de estimulación o inhibición también juegan un papel importante en la respuesta celular mediada por LT⁴⁴.

La secreción de citoquinas por parte de los LT, funcionan también como señales de estimulación, permitiendo la proliferación y diferenciación celular, o señales de inhibición que conducen a la regulación celular y silenciamiento de la respuesta inmunológica. La IL-1, IL-6 e IL-12 son citoquinas de activación que promueven la proliferación y diferenciación celular; la IL-2 funciona como regulador biológico de las respuestas de LT. Mediante las señales recibidas, las células pueden diferenciarse en LT citotóxicos, LT helper o LT de memoria. Los LT citotóxicos inducen la muerte celular y el daño al injerto a través de la desgranulación lo que conlleva a apoptosis. Por su parte, los LT helper promueven la infiltración de macrófagos por la secreción de Interferón γ (IFN- γ) y TNF. La activación celular de LT CD4⁺ conduce también a la estimulación de LB para la producción de anticuerpos específicos contra el donante^{18,43,44}.

La presentación antigénica de los péptidos derivados del donante activará LT CD4⁺ y, por tanto, son presentados a través de las moléculas de HLA clase II del receptor. Como se discutió anteriormente, la activación de LT CD4⁺ permitirá que estas células migren por el sistema circulatorio hacia el sitio donde está ubicado el injerto trasplantado y, una vez allí, se llevará a cabo la secreción de citoquinas que potenciarán el daño al injerto. Así mismo, se estimula la activación de LB, los cuales se diferenciarán en células plasmáticas secretoras de anticuerpos tipo IgG específicos contra las moléculas HLA del donante y en células de memoria de larga vida^{18,43}.

Durante la presentación antigénica se exponen diferentes péptidos provenientes del donante, lo que conlleva a la producción de anticuerpos con la capacidad de reconocer específicamente secuencias de aminoácidos ubicadas dentro de la molécula de HLA del donante. A estas secuencias de aminoácidos se les denomina epítomos (Figura 9)⁴⁵.

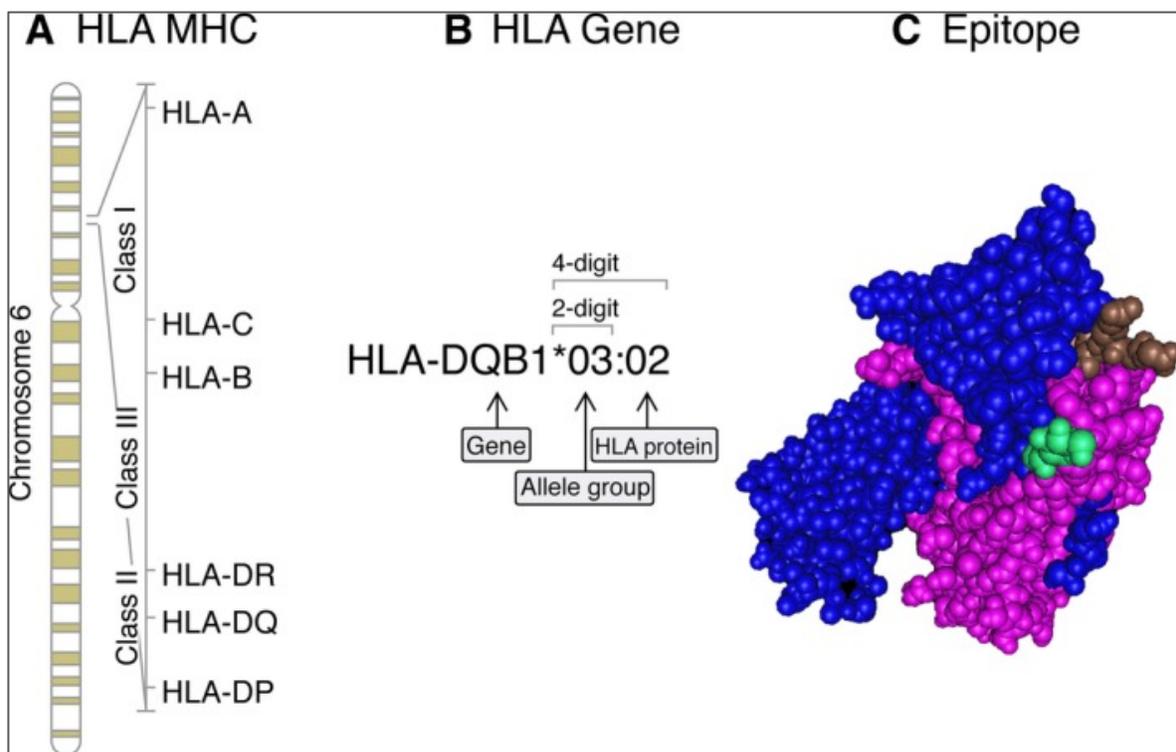


Figura 9. MHC, alelos HLA y epítomos⁴⁵: **a.** Brazo corto del cromosoma 6, el cual contiene los genes que codifican para las moléculas de HLA; **b.** Nomenclatura de las moléculas de HLA, descrita en: <https://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>, cada alelo recibe un nombre de acuerdo a lo estipulado por el *Comité de Nomenclatura de la OMS para Factores del Sistema HLA*, HLA: región HLA, DQB1: un locus HLA específico, 03: grupo alélico; 03:02: proteína específica; **c.** Estructura tridimensional de una molécula de HLA, en este ejemplo HLA-DQB1*03:02, en color café observamos el péptido dentro del surco de unión del péptido, en azul se representa la epleta específica. (Nilsson J, et al. *Human Leukocyte Antigen-Based Risk Stratification in Heart Transplant Recipients-Implications for Targeted Surveillance*. 2019).

Dichos epítomos son compartidos entre varias moléculas de HLA, de donde se adopta el término de epleta, que por definición es un grupo de residuos polimórficos, que pueden ser lineales o no, y que se ubican en la superficie de las moléculas de HLA. Esta es la razón por la cual la sensibilización contra las moléculas HLA induce la formación de anticuerpos que pueden reaccionar contra uno o más antígenos HLA específicos. Las moléculas HLA tienen entre sí homología en su secuencia en cerca del 90% y solo algunos desajustes en áreas específicas. De esta definición se ha adoptado el término de “epítomos funcionales” haciendo referencia a las epletas, que incluyen secuencias pequeñas de 2-3 aminoácidos, y que pueden ser reconocidas por los anticuerpos dirigidos contra las moléculas de HLA (Figura 10)⁴⁵⁻⁴⁷. Por tanto, la huella del anticuerpo puede reconocer epletas adicionales más allá del péptido específico.

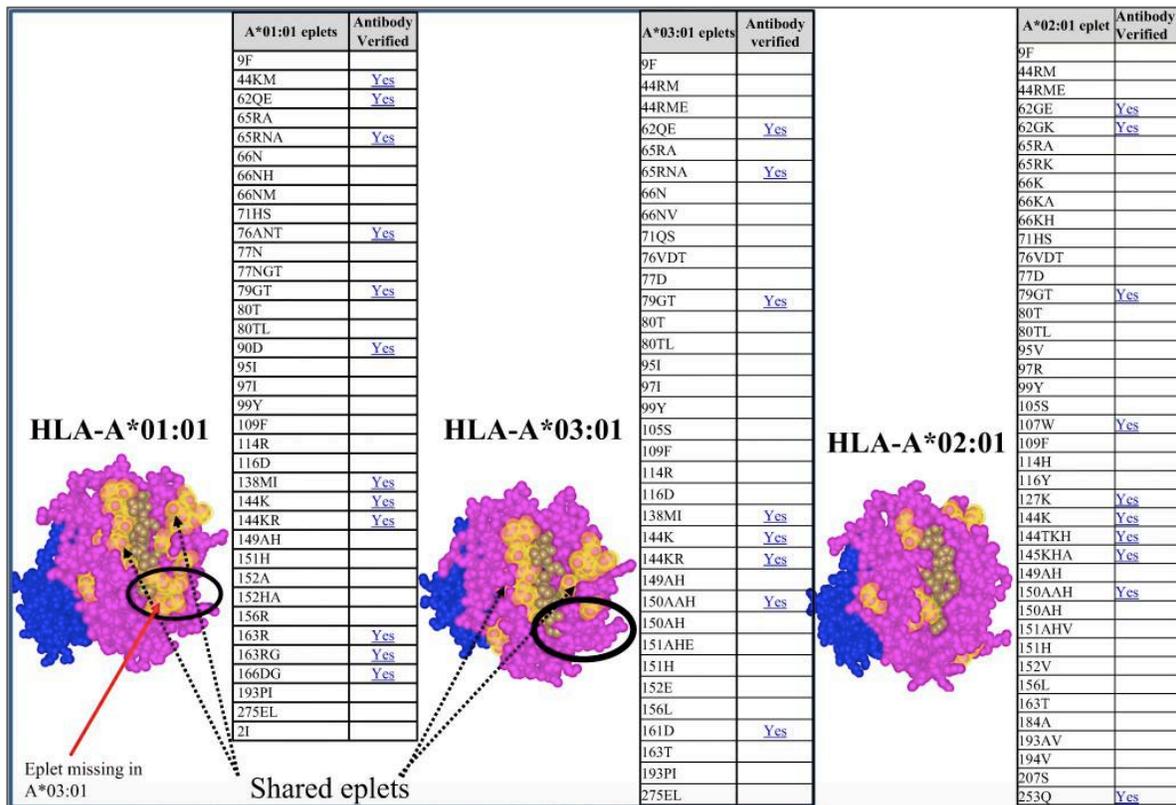


Figura 10. Epletas compartidas entre diferentes moléculas de HLA⁴⁷: HLA-A*01:01 y HLA-A*03:01 tienen epletas compartidas (señalados con flechas), a su vez, contienen epletas exclusivas no compartidas entre ellas (encerradas en círculo negro). Por su parte, HLA-A*02:01 es diferente de las moléculas HLA-A*01:01 y HLA-A*03:01. En color amarillo observamos las epletas. (*Philogene MC, et al. Eplet mismatch analysis and allograft outcome across racially diverse groups in a pediatric transplant cohort: a single-center analysis. 2020*).

2.3 Sensibilización contra las moléculas HLA en trasplante renal

La sensibilización contra las moléculas HLA ocurre como consecuencia de eventos sensibilizantes previos a los que ha tenido lugar el paciente. Los eventos que conllevan a esta sensibilización son principalmente: el embarazo (o abortos), las transfusiones sanguíneas y el trasplante previo⁴⁸, siendo este último el evento relacionado con una inmunización más fuerte y duradera.

Diversos estudios han discutido y reportado la asociación entre las infecciones virales y la consiguiente sensibilización contra las moléculas HLA. Este fenómeno se podría explicar por la presentación cruzada en respuesta a algunas infecciones virales. Se ha documentado que infecciones causadas por el citomegalovirus (CMV) o el Epstein-Barr virus (EBV) están relacionadas con mecanismos de evasión o escape, propios de los virus, en los cuales la producción de homólogos de HLA interfiere en la presentación antigénica y así bloquean el reconocimiento por parte de las células natural killer (NK). Estos mecanismos de escape explican, en parte, la asociación que se encuentra entre la presencia de anticuerpos IgG anti CMV y la presencia de anticuerpos anti-HLA de clase II en algunos pacientes. Diferentes investigaciones explican esta relación debido a la activación de LT CD4⁺ y la secreción de IFN- γ , lo que induce la expresión de moléculas HLA clase II. Si bien no está asociado con la infección con cualquier patógeno, si existe una relación clara entre las infecciones por CMV y EBV y la producción de anticuerpos anti-HLA en algunos pacientes, asociados con algunos locus HLA-DR y DQ^{49,50}.

Los datos de otros estudios también apuntan a que la sensibilización contra las moléculas HLA puede deberse a la activación de células B de memoria preexistentes lo que se corresponde con la producción de anticuerpos anti-HLA como resultado; por otra parte, la producción de citoquinas tras la infección viral también podría conducir a la activación de estas células B o, la similitud del epítipo con los antígenos virales podría resultar en la formación de anticuerpos anti-HLA. Otros autores discuten la posibilidad de reactividad cruzada entre infecciones virales previas por el virus de la influenza y la hepatitis C y la sensibilización contra las moléculas de HLA. Los eventos pro inflamatorios como consecuencia de este tipo de infecciones, así como los asociados a las vacunaciones y/o otros procesos traumáticos, se han relacionado con la sensibilización y la fuerza de los anticuerpos anti-HLA en los pacientes candidatos a trasplantes^{51,52}. Es importante anotar que la sensibilización contra las moléculas HLA por infecciones previas no ocurre en todos

los pacientes y estos estudios solo soportan la evidencia de algunos hallazgos sin condicionar la presencia de anticuerpos anti-HLA en todos los receptores de trasplantes. Es por esta razón, que las infecciones virales como evento sensibilizante no son siempre tenidas en cuenta por los grupos de trasplantes.

Desde que Terasaki y colaboradores demostraron en 1969 que la presencia de anticuerpos específicos contra las moléculas de HLA del donante, denominados como Anticuerpos Donante Específico (DSA) estaban relacionados con los eventos de rechazo hiperagudo en el trasplante⁵³, existe consenso entre los grupos trasplantadores para realizar, además de la tipificación HLA previamente descrita, las siguientes pruebas:

- Prueba de Citotóxicidad dependiente de complemento (CDC): Aún a la fecha esta prueba se considera el *Gold Standard*. Se incuban los LT y los LB aislados del donante con suero del receptor en presencia de complemento. Una prueba positiva es cuando ocurre lisis celular y confirma la presencia de DSA los cuales confirma la presencia de anticuerpos con capacidad de activar la cascada del complemento y se denominan citotóxicos; un prueba negativa descarta la presencia de DSA o, por lo menos, descarta la presencia de DSA fijadores de complemento. Dicha prueba se realiza en el momento previo al trasplante^{53,54}.

- Rastreo e identificación de anticuerpos contra los antígenos de HLA: La identificación de los anticuerpos preformados en los receptores cobra importancia en pro de minimizar las posibilidades que un paciente sea trasplantado con anticuerpos contra un donante específico. En este sentido, previo al ingreso a lista de espera, se enfrenta el suero del paciente para evaluar el Panel reactivo de anticuerpos (PRA), lo que permite identificar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-HLA y su especificidad. Basados en los anticuerpos positivos, se calcula el porcentaje de sensibilización, cuantificando la probabilidad de que una pareja

donante-receptor sean incompatibles. Los centros reguladores de trasplantes, Eurotransplant y la OPTN, utilizan sistemas informáticos alimentados con información de frecuencias de HLA (tipificados en alta resolución) de más de 12.000 donantes para poder determinar matemáticamente la probabilidad de que un receptor encuentre un donante compatible dentro de una población determinada; a este cálculo se le denomina PRA calculado (cPRA)^{55,56}.

A mayor sensibilización de un receptor menor es la probabilidad de encontrar un donante compatible, lo que prolonga su tiempo en lista de espera y por consecuencia aumenta la probabilidad de fallecer en espera de un donante óptimo. Por cada aumento del 1% en el valor de cPRA, un receptor deberá esperar de 3-5 semanas adicionales para poder ser trasplantado. Es bien conocido que en las listas de espera de los centros trasplantadores entre el 40-60% de los pacientes tienen algún grado de sensibilización y cerca del 10-15% son pacientes altamente sensibilizados (cPRA >95%)⁵⁷.

La presencia de DSA sugiere la posibilidad de rechazo hiperagudo o retardo de la función renal, por ende la presentación de eventos de rechazo y la consecuente pérdida del injerto. Por lo que la realización de las pruebas anteriormente descritas permite tomar decisiones en el momento del trasplante para que a un paciente que tenga anticuerpos preformados contra los antígenos HLA de un donante específico (denominadas incompatibilidades inaceptables), no se le ofrezca la posibilidad de ser trasplantado con dicho donante; a esta evaluación se le denomina prueba cruzada virtual (crossmatch virtual), y cobra valor por su gran valor predictivo positivo. Una prueba cruzada virtual aumenta las posibilidades de rechazo mediado por anticuerpos (AMR) del hasta del 55% y pobre supervivencia del injerto a 5 años⁵⁸⁻⁶¹.

2.4 Terapia de Inmunosupresión

2.4.1 Terapia de Inducción y de mantenimiento

En el momento mismo del trasplante, los receptores de órganos inician la terapia de inmunosupresión con el objetivo de modular la respuesta del sistema inmunológico y así minimizar el riesgo de rechazo del injerto. La terapia de inmunosupresión ha sido utilizada ampliamente durante las últimas décadas, lo que ha permitido disminuir significativamente las tasas de rechazo, sin embargo, esta debe continuarse durante toda la vida útil del injerto, lo que conlleva a eventos secundarios asociados a la inmunosupresión como las infecciones recurrentes, el cáncer, la diabetes, la toxicidad por los medicamentos, entre otros, lo que obliga a que la terapia sea modulada en el tiempo para tratar los eventos presentados y con el riesgo de que dicha modulación conlleve a eventos de rechazo. El objetivo de la terapia de inmunosupresión es prevenir el rechazo del injerto trasplantado y se debe encontrar el punto de equilibrio entre la dosis suministrada y el mantenimiento de la función del injerto^{25,62}.

La terapia de inmunosupresión comprende varias etapas durante el trasplante. Una etapa inicial, la cual es potente para llevar a cabo la depleción de la respuesta inmunológica y que se suministra en el periodo perioperatorio, llamada también terapia de inducción; y una segunda etapa, menos potente pero dirigida a diferentes objetivos de la respuesta inmunológica y cuyo objetivo es mantener el estado de inmunosupresión y la cual perdurará por el tiempo que dure el injerto trasplantado. Durante la inducción se utilizan agentes depletors de LT como la timoglobulina (ATG) o inhibidores de la IL-2 como el basilixumab; así mismo, se suministran medicamentos enfatizados en 3 señales principales (terapia triple) cuya finalidad es

evitar la activación y proliferación de LT, en la Figura 11 se esquematiza las 3 señales de enfoque.

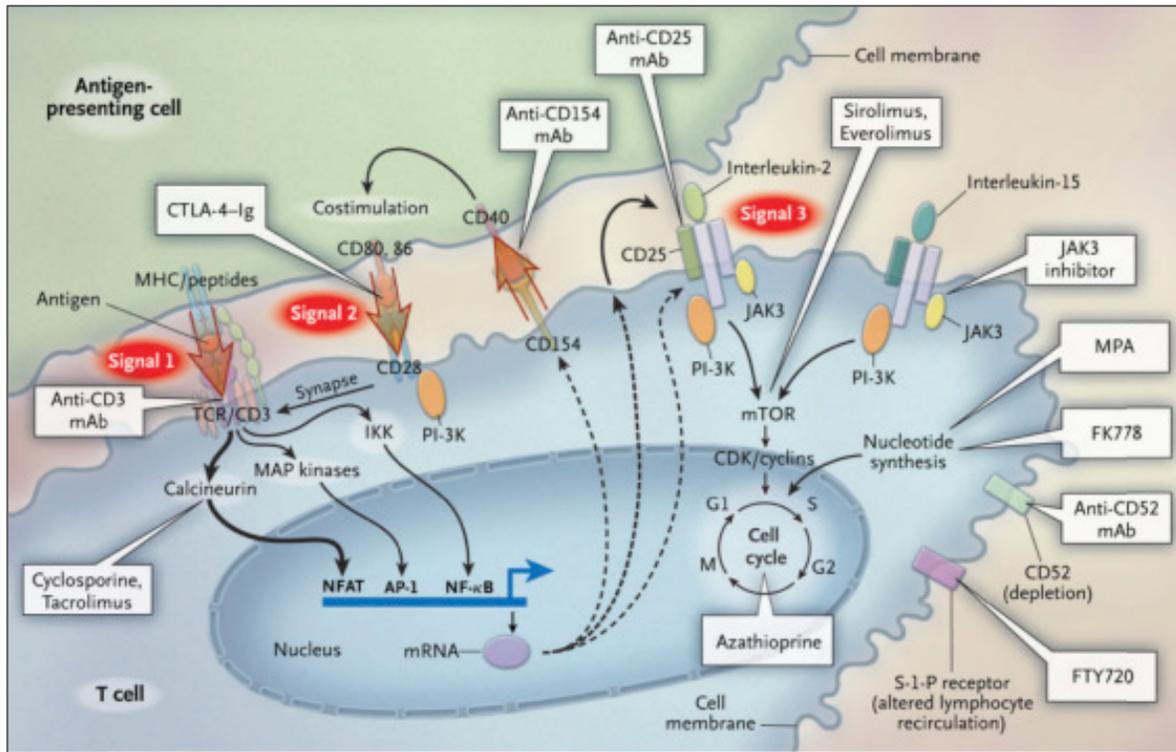


Figura 11. Terapia de inducción y mecanismos de inmunosupresión²⁵: Inmunosupresores dirigidos contra 3 señales específicas en la activación y proliferación de LT; señal 1 vía de la calcineurina y transcripción de Il-2, señal 2 inhibición de los factores de transcripción y señal 3 agentes antiproliferativos. (Voora S, et al. *Management of Kidney Transplant Recipients by General Nephrologists: Core Curriculum 2019. Am J Kidney Dis.* 2019).

Los inmunosupresores que permiten el agotamiento de las poblaciones de LT están dirigidos contra 3 señales específicas importantes en la activación y proliferación celular. Dado que la activación de LT depende de múltiples señales, el objetivo principal es atacar diferentes mecanismos de activación y por esta razón se emplean inmunosupresores dirigidos contra flancos específicos. Dichos medicamentos se utilizarán en dosis altas durante la inducción y los cuales irán siendo modulados

llegando a dosis mínimas y cuya modulación dependerá de los riesgos inmunológicos en cada paciente y de la causa de ESRD.

En la señal 1, el objetivo es el inicio de la vía de la calcineurina y los inmunosupresores comúnmente utilizados son el tacrolimus y la ciclosporina. Cada uno se une a su receptor citoplasmático, la proteína fijadora de FK506 y la ciclofilina respectivamente, inhibiendo la calcineurina y por ende detiene la expresión de citoquinas necesarias para la proliferación celular. El uso de dichos inmunosupresores ha mejorado la sobrevida del injerto, sin embargo, su uso debe ser muy controlado debido a su alto porcentaje de toxicidad e intolerancia para los pacientes. En la señal 2, se busca inhibir los factores de transcripción necesarios para la expresión de citoquinas, los medicamentos utilizados son los corticosteroides (metilprednisolona o prednisolona) que son medicamentos que inhiben el factor nuclear kB (NFkB) y como consecuencia regulan la expresión de citoquinas. Basados en el riesgo inmunológico las dosis de corticosteroides serán disminuidas llegando a ser retirado en algunos casos. En la señal 3, se utilizan agentes antiproliferativos como el micofenolato mofetil (MMF), que es un inhibidor de la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) lo que conduce a la disminución de la producción de nucleótidos de guanosina y como consecuencia depleción celular de LT. El MMF también disminuye la expresión de moléculas de adhesión limitando la unión de LT a células endoteliales en el injerto cuando hay lesión^{25,62,63}.

Durante la segunda etapa de la inmunosupresión, o terapia de mantenimiento los inmunosupresores disminuyen a niveles que no permiten la reactivación del sistema inmunológico permitiendo la tolerancia del trasplante. En esta fase la terapia triple sigue siendo utilizada, aunque en menor dosis, basados en los requerimientos inmunológicos para cada paciente^{25,62-64}.

2.4.2 Monitoreo de los niveles de inmunosupresión y de la función renal

Muchos de los agentes inmunosupresores cuentan con ventana terapéutica, es decir, el rango terapéutico en el cual los medicamentos no generan toxicidad o efectos nocivos en los pacientes. Dicha ventana es estrecha por lo que la evaluación continua de los niveles sanguíneos de medicamentos es fundamental especialmente durante los primeros meses del trasplante en el cual la dosis de inmunosupresores es alta. Los esfuerzos realizados para minimizar los riesgos y maximizar los resultados, es decir encontrar la dosis ideal en la que prevalecen la supervivencia del injerto y del paciente, requieren del continuo monitoreo debido a que, a la fecha, ningún medicamento ha demostrado estar libre de efectos secundarios. Por su parte, se requiere también del monitoreo constante de la función renal, que debe ir desde la fase inicial del trasplante, midiendo los niveles de Scr los cuales pueden ser indicativos de daño o pérdida de la función renal. Un aumento en el 20-25% de la concentración de Scr por encima del valor inicial requiere evaluación de la función del injerto en la que se incluyen ecografías renales, doppler y biopsia renal, así como la evaluación de la presencia de DSA^{25,65}.

No existen intervalos fijos para la evaluación de los niveles de inmunosupresión en sangre, los datos adicionales como el estado clínico, la sensibilidad interpersonal frente a los efectos secundarios de la inmunosupresión que puede ser resultado del metabolismo de cada paciente, así como el tipo de trasplante, el tiempo del trasplante, las dosis de otros medicamento incluso de otros inmunosupresores y otros factores, deben ser tenidos en cuenta en la evaluación de los niveles de inmunosupresores ya que todo esto puede contribuir en el objetivo de llegar a las condiciones óptimas de dosis para cada paciente. Debido a la gravedad de los posibles efectos adversos, es imprescindible que los médicos controlen de forma rutinaria a cualquier paciente con un régimen inmunosupresor^{65,66}.

2.4.3 Terapia de rescate

La terapia de rescate es empleada cuando el paciente cursa con un evento de rechazo y comprende la administración de inmunosupresores adicionales y de acción potente. Dentro de los agentes de primera línea para tratar los eventos de rechazo se encuentran los corticosteroides como la prednisona o esteroides orales en pulsos. El tratamiento de elección va a depender en gran medida del mecanismo que ejerza el evento y de la gravedad del mismo.

En los eventos de AMR, la plasmaféresis se utiliza con el objetivo de eliminar los anticuerpos circulantes, sin embargo, la eliminación de anticuerpos puede resultar desafiante, por lo que la administración de anticuerpos monoclonales para conseguir la depleción de LB resulta el método de elección. El Rituximab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra las moléculas CD20 expresadas en la membrana de los LB, por lo que el objetivo de este tratamiento es la depleción celular. El Rixutimab también regula a la baja el CD40, impidiendo la interacción celular entre LT y LB. Otros tratamientos de rescate utilizados en el AMR son el Eculizumab (dirigido contra las moléculas del complemento para evitar la formación del complejo de ataque de membrana) y el Bortezomib (inhibidor de proteasoma que agota células plasmáticas)^{65,67}.

2.5 Rechazo del Injerto Renal

Algunas glomerulopatías del trasplante se pueden detectar oportunamente con el seguimiento constante de la función renal. La monitorización de la función del injerto, a través de la medición de los niveles de Scr, permite detectar oportunamente

los eventos de rechazo a los que pueda estar enfrentado el paciente. Por su parte, la detección de proteinuria, en rango nefrótico o no, es indicación de biopsia del injerto renal y ayuda a la valoración de actividad renal.

El estándar de oro en el monitoreo de la función renal sigue siendo la biopsia, sin embargo, por ser un examen invasivo y dado el riesgo que representa para el injerto no todos los grupos de trasplante la realizan como seguimiento por protocolo. A nivel global esta idea se encuentra dividida y otros grupos de trasplante en Europa y Estados Unidos si priorizan y protocolizan la biopsia renal como parte del seguimiento pos trasplante. La biopsia renal permite la identificación oportuna del rechazo agudo o crónico, la enfermedad renal recurrente o *de novo*, identifica algunas infecciones virales como la infección por Poliomavirus y ayuda en la determinación de la presencia de cicatrización progresiva del injerto con fibrosis intersticial y atrofia tubular. Por lo tanto, la biopsia permite la clasificación de la causa del rechazo, como inmunológica o no inmunológica y fortalece el manejo del paciente en pro de salvaguardar la función renal^{25,68}.

A pesar de la terapia de inmunosupresión descrita previamente, cerca de un 15% de los pacientes trasplantados experimentan algún tipo de rechazo. Sin embargo, cuando dichos episodios son diagnosticados a tiempo, la modulación de la inmunosupresión suele ofrecer resultados apropiados para evitar la pérdida del injerto renal. El tratamiento de rescate que se elija dependerá del tipo de rechazo y de la severidad del mismo^{25,69}.

Los eventos de rechazo se pueden clasificar según el momento en el que se presentan como rechazo hiperagudo, agudo y crónico, y, de acuerdo al mecanismo que lo ejerce como rechazo celular, AMR o rechazo mixto⁶⁹. Con la introducción de la terapia de inducción los eventos de rechazo celular han disminuido

significativamente, sin embargo, el AMR es la causa de entre el 30-50% de los episodios de rechazo agudo y cerca del 60% de los eventos de rechazo crónico con posterior fracaso del injerto²⁵.

2.5.1 Rechazo hiperagudo

Se define como la respuesta inmunológica acelerada, desencadenada dentro de las 48 horas pos trasplante (incluso minutos después de la implantación del injerto) y su causa principal es la presencia de DSA preformados en niveles altos. Dichos anticuerpos reconocen dianas en el endotelio vascular a donde se unen y como consecuencia desencadenan la activación de la vía clásica del complemento. La lesión del endotelio promueve la coagulación masiva por agregación plaquetaria generando trombosis del injerto trasplantado y como consecuencia necrosis endotelial lo que culmina con la pérdida del riñón. En los eventos de rechazo mediados por anticuerpos los síntomas como fiebre, sensibilidad en el sitio del injerto, oliguria e hipertensión son más frecuentes.⁶⁹.

Las pruebas inmunológicas previas al trasplante, como son la prueba cruzada final por CDC, la determinación de la especificidad de los anticuerpos presentes en el receptor a través de métodos altamente sensibles, la identificación de incompatibilidades inaceptables, así como, la terapia de inducción, representan las estrategias adoptadas por los grupos de trasplante, en trabajo conjunto con los laboratorios de histocompatibilidad, para evitar los eventos de rechazo hiperagudo, estrategias que han disminuido en gran medida las complicaciones asociadas al rechazo hiperagudo^{53,54}.

2.5.2 Rechazo agudo

Se define como la lesión causada al injerto renal que ocurre dentro de las semanas o meses posteriores al trasplante, generalmente dentro de los 6 primeros meses. Algunos autores pueden clasificar una forma acelerada de rechazo agudo cuando ocurre dentro de los primeros 30 días pos trasplante. El daño al injerto es causado al parénquima renal y a los vasos sanguíneos por la activación de células T alorreactivas y la aparición de DSA⁶⁹.

Dentro del rechazo agudo podemos encontrar respuestas celulares, respuestas mediadas por anticuerpos o respuestas mixtas, por lo tanto, su clasificación se realizará de acuerdo al mecanismo que lo ejerza.

El rechazo celular mediado por células T (TCMR), comprende la respuesta por células LT CD4⁺ (helper) y LT CD8⁺ (citotóxicos), específicos contra los antígenos del donante. El aumento en los niveles de Scr es el principal hallazgo relacionado con este tipo de rechazo. En las respuestas celulares participan también otros tipos celulares como monocitos, macrófagos, células NK y células plasmáticas los cuales contribuyen a la respuesta inmunológica migrando hacia el sitio del injerto. Dichas células se infiltran en el intersticio causando tubulitis (por la invasión de los túbulos) y necrosis tubular. El grado de infiltración observada en la biopsia renal va a definir el grado de rechazo. Por su parte, se puede observar también endotelitis (por la inflamación del endotelio vascular) y necrosis de los vasos sanguíneos del injerto, en el cual el infiltrado celular invade el subendotelio y la capa íntima de las arterias renales^{25,69}. De acuerdo con la clasificación Banff, el TCMR se puede clasificar como tipo I (IA-IB), tipo II (IIA-IIB) y tipo III, basados en los hallazgos de células infiltradas y el daño ocasionado a los tejidos. Los criterios Banff se discutirán más adelante en este documento⁷⁰.

En el AMR agudo, la lesión al riñón trasplantado se produce por la unión de DSA a las células del endotelio del injerto dando como resultado pérdida de la integridad del epitelio vascular, lesión isquémica y muerte celular. La unión de los DSA activa la cascada del complemento, recluta neutrófilos y células mononucleares en el sitio de la lesión, permite la agregación plaquetaria lo que conlleva a la formación de trombos. De acuerdo con la experiencia de diferentes centros, no en todos los casos la unión de DSA conlleva a la activación de la cascada del complemento, razón por la que, durante la reunión anual de Banff del 2017 se pusieron en consideración dichos hallazgos, permitiendo desde entonces una nueva clasificación de AMR con o sin depósitos de C4d⁷¹. El rechazo agudo es de peor pronóstico en comparación con el rechazo agudo celular, debido a que cerca del 30% de los pacientes que presentan AMR pierden el injerto vs. el 4% de los pacientes que pierden el injerto cuando presentan un TCMR, dentro del primer año, y tienen una mayor probabilidad de desarrollar AMR crónico⁷⁰.

Finalmente, el rechazo agudo mixto comprende la lesión al injerto que implica la presencia de TCMR y AMR, es decir, componentes tanto celulares como respuesta humoral activa, rechazo que por su gravedad debe ser tratado a tiempo para evitar la pérdida temprana del injerto.

2.5.3 Rechazo crónico

Se define como una disminución lenta y progresiva de la función renal con síntomas frecuentes de hipertensión y proteinuria, lo que ocasiona daños irreversibles en el injerto. El rechazo crónico generalmente está precedido de eventos de rechazo agudo previamente tratados. Dado el avance clínico de la últimas décadas con la inclusión de la terapia de inducción y los tratamientos de rescate en los casos de rechazo

agudo, el rechazo crónico constituye actualmente la principal causa de pérdida del injerto renal²³.

Las respuestas crónicas generalmente están acompañadas por la presencia de DSA que se depositan en el endotelio vascular, causando lesiones en los capilares glomerulares y peritubulares, cambios anatomopatológicos al tejido del injerto y por consiguiente se genera oclusión vascular y fibrosis intersticial. Por su parte, la secreción de citoquinas por parte de LT y LB alorreactivos, estimulan también la proliferación de células del endotelio vascular y del músculo liso contribuyendo a la lesión endotelial. Con el tiempo, el flujo sanguíneo disminuye en el riñón por lo que el tejido sano se empieza a reemplazar por tejido fibroso que no es funcional lo que conduce a la pérdida de la función glomerular y tubular y la consecuente pérdida de la función del injerto renal^{25,69}.

2.6 Criterios Banff

Como mencionamos anteriormente, la biopsia renal continúa siendo el *Gold Standard* para el diagnóstico de rechazo del trasplante renal. En este contexto, los criterios Banff se han creado con el objetivo de clasificar los hallazgos observados en los resultados de la biopsia y otorgan valor a la correlación entre la patogenia y el pronóstico de la sobrevida del injerto. Dicha clasificación reúne cada dos años a expertos a nivel mundial en donde se debate sobre la experiencia de diferentes centros y se consensua sobre lo que debe ser considerado para los criterios de rechazo, de este modo, la clasificación basada en el tiempo en el que se presenta, como hiperagudo, agudo o crónico, ha sido reevaluada para incluir dentro de esta clasificación el mecanismo que lo ejerce como celular, humoral o mixto.

La última reunión de la conferencia Banff se llevó a cabo en Pittsburgh, EE.UU., junto con la Reunión Anual de la Sociedad Estadounidense de Histocompatibilidad e Inmunogenética, en septiembre de 2019. Los criterios Banff de dicha actualización fueron publicados en línea en mayo de 2020, e incluyen la patología digital y la inteligencia artificial para la clasificación adecuada de los trasplantes⁷⁰.

Se ha establecido que una muestra representativa de biopsia renal debe contener al menos 10 glomérulos y 2 arterias. Se deben realizar técnicas de microscopía de luz, tinciones para C4d, inmunofluorescencia para IgG (para la evaluación del complejo antígeno-anticuerpo), microscopía electrónica y si se sospecha de infección por virus se realizan tinciones para virus (*Poliomavirus* y *Citomegalovirus*).

La clasificación Banff está dividida principalmente en las siguientes categorías:

1. Respuestas aloinmunes: patología de los rechazos.
2. Toxicidad o hipersensibilidad a medicamentos.
3. Infecciones.
4. Complicaciones anatómicas.
5. Enfermedad recurrente o *de novo*.
6. Enfermedad del donante.
7. Neoplasias (mayor incidencia en pacientes trasplantados por la inmunosupresión).

En la Figura 12 podemos observar los eventos que pueden ocurrir a los pacientes trasplantados durante el tiempo de supervivencia del injerto, dichos eventos se clasifican como eventos inmunológicos y no inmunológicos.

Dentro de los eventos inmunológicos se encuentran los eventos de rechazo, de primordial importancia en el seguimiento pos trasplante. Dentro de los eventos no inmunológicos encontramos la toxicidad e hipersensibilidad a los medicamentos inmunosupresores, principalmente la causada por los anticalcineurínicos; encontramos también las infecciones por virus, dentro de la cual la infección por *Poliomavirus* representa la principal causa de infecciones virales. Cabe anotar que como se observa en la gráfica, que las infecciones por virus no empiezan inmediatamente después del trasplante, sino que generalmente se presentan a partir del primer mes. Encontramos también la enfermedad renal recurrente o *de novo*, y al final de la gráfica la pérdida del injerto renal^{70,72}.

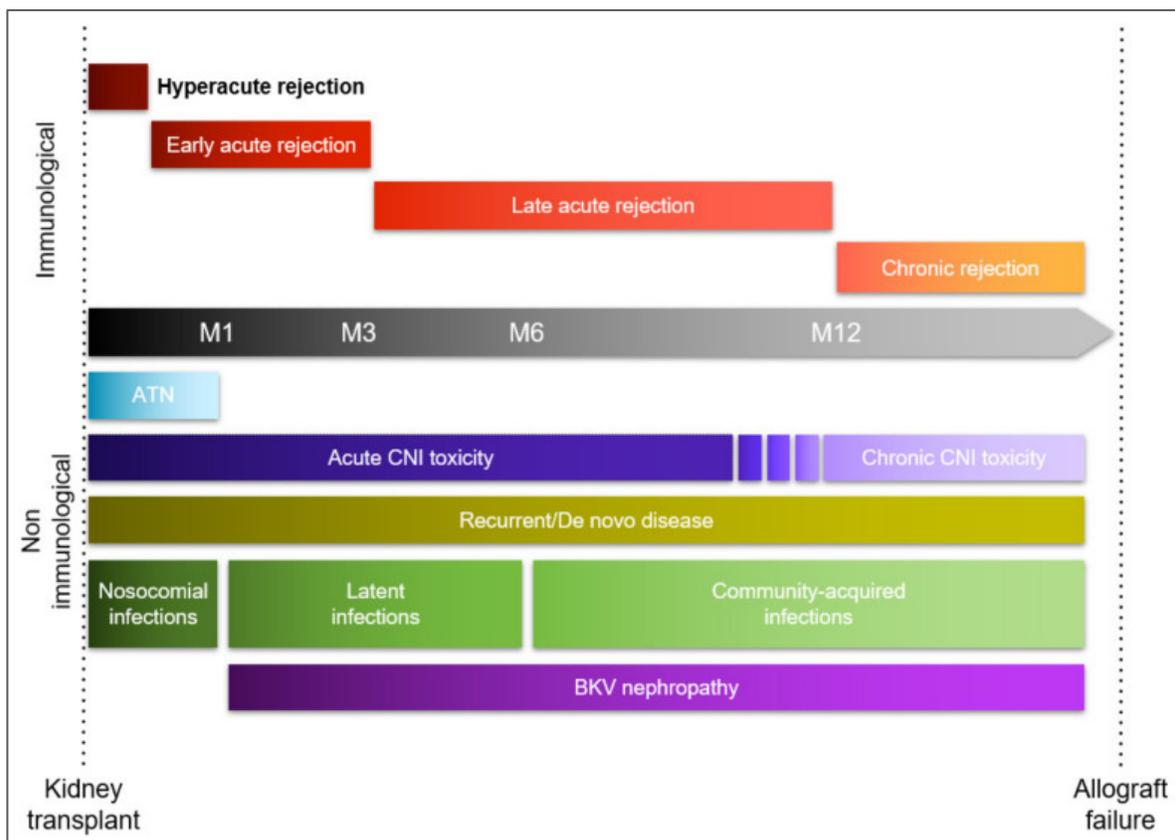


Figura 12. Eventos en el tiempo del trasplante renal⁷²: En la parte superior los eventos de rechazo inmunológico. En la parte inferior encontramos los eventos de rechazo no inmunológico dentro de los que se encuentra la toxicidad por medicamentos, las infecciones por virus y la enfermedad *de*

nov. **M**= meses después del trasplante (Quagli, et al. *Recent Advances on Biomarkers of Early and Late Kidney Graft Dysfunction. Int J Mol Sci.* 2020).

Los criterios Banff incluyen los siguientes hallazgos en la patología para la clasificación de TCMR⁷⁰:

1. Tipo I (IA y IB): Inflamación intersticial involucrando >25% del parénquima cortical no esclerótico, con tubulitis moderada (tipo IA) o severa (tipo IB), en uno o más túbulos.
2. Tipo II (IIA y IIB): Arteritis moderada de la íntima (tipo IIA) o severa (tipo IIB), con o sin presencia de inflamación intersticial y/o tubulitis.
3. Tipo III: Arteritis transmural con necrosis fibrinoide afectando al músculo liso y acompañada de arteritis íntima de células mononucleares, con o sin presencia de inflamación intersticial y/o tubulitis.

Por su parte, los criterios Banff incluyen los siguientes hallazgos en la patología para la clasificación de rechazo humoral o AMR⁷⁰:

1. Evidencia morfológica:
 - Necrosis a nivel de los túbulos.
 - Marginación de células inflamatorias, especialmente células polimorfonucleares y monocitos, dentro de los capilares peritubulares.
 - Arteritis severa o necrosis fibrinoide e inflamación arterial transmural (se observa también en los casos de TCMR).
 - Microangiopatía trombótica.
2. Evidencia inmunológica: Presencia de C4d a niveles de los capilares peritubulares o,
3. Evidencia serológica de la presencia de DSA en sangre.

2.7 Protocolos pre Trasplante Renal y de Seguimiento Pos Trasplante

Dados los avances en el trasplante renal, se requiere el apoyo y el acompañamiento de expertos de los laboratorios de Histocompatibilidad e Inmunogenética, los cuales se encuentran regidos según las normas establecidas en cada país y que siguen estándares internacionales mínimos que aseguran la asignación del donante óptimo, preservando la seguridad del paciente y la sobrevivencia del injerto. Así mismo, la práctica actual de los laboratorios los hace partícipes del seguimiento pos trasplante y del diagnóstico inmunológico especialmente del rechazo mediado por anticuerpos.

Existen entes internacionales que acreditan la práctica de los laboratorios de Histocompatibilidad, como la EFI (*European Federation for Immunogenetics*) y la ASHI (*American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*), promoviendo y vigilando el cumplimiento de estándares de alta calidad en la práctica clínica enfocada al trasplante^{73,74}.

Así como los criterios Banff reúnen la posición de expertos en el diagnóstico patológico y consensuan los hallazgos para la categorización de los eventos en el trasplante renal, la EFI y la ASHI reúne anualmente la experiencia acumulada de diferentes centros y dichas reuniones han permitido establecer el consenso sobre las pruebas que se deben realizar en el pre trasplante a los pacientes candidatos, el seguimiento durante el tiempo en lista de espera y, algunos de los criterios para el seguimiento pos trasplante.

2.7.1 Ingreso y mantenimiento en lista de espera

Los protocolos para el ingreso a la lista de espera, de los pacientes con ESRD candidatos para recibir trasplante de riñón proveniente de un donante fallecido, incluyen la realización obligatoria de las siguientes pruebas inmunológicas. Cada esfuerzo realizado en pro de identificar el mejor donante para un paciente, contribuyen en gran medida a la sobrevida del injerto:

1. Confirmación del grupo sanguíneo ABO. Los anticuerpos dirigidos contra el sistema ABO constituyen también una barrera importante a considerar en el trasplante de órganos.
2. Tipificación HLA de clase I y clase II. Como se discutió en el punto 2.1, la tipificación HLA contribuye a mejorar la compatibilidad entre donante y receptor lo que minimiza los eventos de rechazo. Los locus mínimos que se debe tipificar son HLA-A, B, DR (más polimórficos). Algunos grupos de trasplantes recientemente han incluido la tipificación HLA-DQ dada la inmunogenicidad de dicho locus y la elevada sensibilización de los pacientes contra este loci de HLA.
3. Rastreo e identificación de anticuerpos anti-HLA y valor de cPRA. Identifica los anticuerpos presentes en el receptor y lo categoriza según la posibilidad de encontrar un donante compatible. Los grupos de trasplante y los laboratorios de Histocompatibilidad deben hacer un esfuerzo por controlar los eventos sensibilizantes a los que pueda tener lugar cada paciente durante su permanencia en lista de espera, y un esfuerzo adicional por mantener actualizados los resultados de anticuerpos anti-HLA. La identificación de anticuerpos preformados minimiza los eventos de rechazo hiperagudo y contribuye en la sobrevida del injerto.
4. Determinación de la prueba cruzada virtual (crossmatch virtual) entre donante y receptor. Comparación virtual de los anticuerpos preformados en el receptor que

puedan estar dirigidos contra los antígenos HLA del donante. Esta prueba tiene alta sensibilidad y alto valor predictivo positivo en la sobrevida del injerto.

5. Prueba cruzada final por CDC entre la pareja donante-receptor. Minimiza los eventos de rechazo hiperagudo. Los resultados de la prueba cruzada final por CDC negativos aprueban a los grupos de trasplante para acceder al trasplante en la pareja donante-receptor. Algunos grupos utilizan la prueba cruzada por citometría de flujo (FCXM) para la evaluación de la prueba cruzada entre donante y receptor. La prueba cruzada por citometría de flujo es más sensible y por su alta sensibilidad es capaz de detectar la presencia de anticuerpos no fijadores de complemento.

Los dos últimos exámenes se realizan en el momento en que aparece un posible donante.

Cada laboratorio esquematiza a través de algoritmos el estudio inmunológico realizado a cada paciente que ingresa a lista de espera. Dichos algoritmos favorecen la toma de decisiones por los clínicos para llevar a los pacientes a trasplante.

En la Figura 13, se esquematiza el algoritmo utilizado globalmente en los laboratorios de trasplantes, basados en los estándares de EFI y ASHI para el estudio pre trasplante renal.

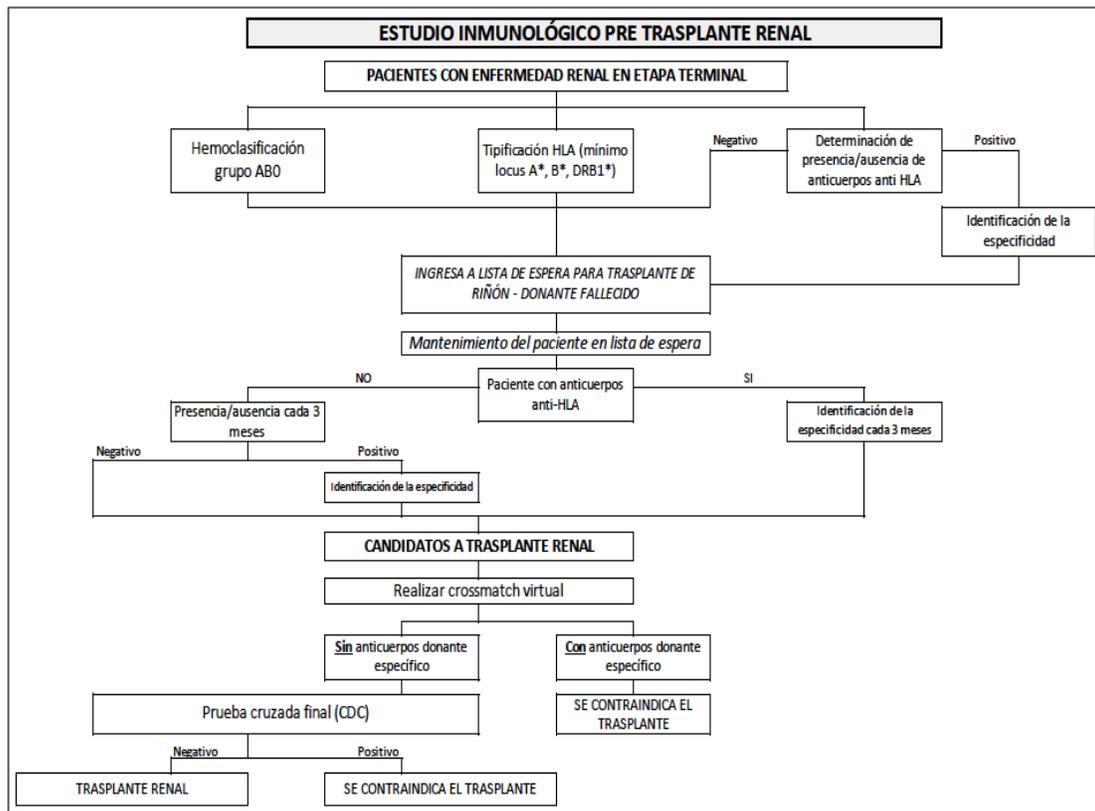


Figura 13. Estudio Inmunológico pre trasplante renal: Algoritmo del estudio inmunológico de los candidatos a trasplante renal y seguimiento inmunológico en lista de espera.

2.7.2 Seguimiento Pos trasplante renal

Como se discutió anteriormente, los protocolos para el seguimiento pos trasplante renal incluyen la evaluación periódica de la función renal, a través de la medición de los niveles de Scr y la presencia de proteinuria. Un aumento del 25% de los niveles de Scr por encima de su nivel basal es indicativo de disminución de la función renal y de un posible evento de rechazo en curso.

Aunque no existe consenso a nivel mundial en los protocolos de seguimiento pos trasplante, la biopsia renal por protocolo y la evaluación de la presencia de DSA pos

trasplante, representan estrategias para la identificación oportuna de los eventos de rechazo.

Los grupos de trasplante discuten que la biopsia renal por protocolo es una práctica invasiva y representa un riesgo en la sobrevida del injerto y, por lo anterior, prefieren realizarla únicamente en los casos de sospecha de rechazo.

Por su parte, también se discute sobre la información que otorga la identificación temprana de DSA sin evidencia de disminución de la función renal o síntomas de rechazo, lo que pone sobre la mesa la pregunta de cómo intervenir al paciente en los casos de DSA positivo y la modulación de la inmunosupresión vs. los riesgos que conlleva ello.

Dichas discusiones se encuentran divididas y si bien encontramos grupos que aún no las utilizan por protocolo, otros grupos si han estandarizado su práctica.

II. HIPÓTESIS

La estimulación a los LB por parte de los LT helper, en respuesta al reconocimiento de las incompatibilidades entre el receptor y el donante, conlleva a la producción de anticuerpos con gran especificidad contra las moléculas HLA del donante. El reconocimiento de dianas en el injerto renal por parte de estos anticuerpos desencadena la activación de la cascada del complemento lo que conlleva finalmente a daño en el injerto y pérdida de la función renal. No obstante, la presencia de DSA que no tienen la capacidad de activar el complemento podría no inducir una respuesta inmunológica y, por tanto, no conducir al rechazo del órgano trasplantado.

De acuerdo con este contexto, resulta interesante evaluar la implicación de los DSA con capacidad de fijación del complemento y la pérdida del trasplante renal. Bajo esta hipótesis, realizamos el estudio de la unión de los DSA pos trasplante a las moléculas de la cascada de complemento y su asociación con la supervivencia del trasplante renal.

III. OBJETIVO

Valorar la capacidad de fijación y activación de la cascada del complemento por parte de los DSA *de novo*, como prueba complementaria que puede contribuir con gran valor a los protocolos de seguimiento pos trasplante renal, en una cohorte de pacientes trasplantados de riñón.

Objetivos específicos

1. Evaluar la asociación entre la presencia de DSA no fijadores de complemento y la supervivencia del trasplante renal.
2. Evaluar la posible asociación entre la presencia de anticuerpos no fijadores de complemento y el control de los eventos de rechazo.
3. Establecer la asociación entre la presencia de DSA fijadores de complemento y la pérdida del injerto renal.
4. Analizar la asociación entre la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los DSA y su relación con la capacidad para activar la cascada del complemento.
5. Analizar la asociación de los DSA dirigidos contra locus específicos y su capacidad de unión al complemento.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Población de estudio

Nuestro estudio comprende un análisis retrospectivo de los pacientes trasplantados de riñón durante un periodo de cinco años en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN) de Granada, España.

2. Criterios de inclusión

- Pacientes con resultado de determinación de anticuerpos anti-HLA de protocolo pos trasplante quienes hayan cursado con eventos de rechazo inmunológico.
- Pacientes con muestra de suero disponible de la fecha en que se determinó la presencia de DSA, la cual se empleó para el análisis de anticuerpos fijadores de complemento por el método C1q (*One Lambda*).

3. Criterios de exclusión

- Pacientes sin resultado de análisis de DSA: Se excluyeron 78 pacientes de los cuales no se encontró resultado de análisis de seguimiento pos trasplante por protocolo para la presencia de DSA, ya sea por no presentar eventos de rechazo que indicaran la realización de la prueba o porque dichos pacientes hayan sido trasplantados a otros centros hospitalarios para su seguimiento pos trasplante.
- *Exitus*: Se excluyeron 7 pacientes del HUVN quienes fallecieron con el injerto funcional.

La cohorte incluyó un total de 245 pacientes quienes cumplían los criterios de inclusión; con edades entre los 17 y los 78 años, de los cuales 71 eran mujeres y 174 eran hombres. De la base de datos anonimizada se obtuvo acceso a los valores de Scr, los resultados de la determinación de anticuerpos pos trasplante y el resultado de la biopsia cuando ésta estuviera disponible.

4. Tipo de muestra

Para evaluar la capacidad de fijación del complemento por los anticuerpos anti-HLA, se utilizaron las muestras de suero en las cuales se confirmó la presencia de DSA.

Las muestras de suero se encontraban debidamente rotuladas con el código único asignado para cada paciente, la fecha de extracción y almacenadas a temperatura de -80°C, en los ultracongeladores ubicados en el servicio de HLA y trasplantes de HUVN.

5. Técnica de C1q

La evaluación de la capacidad de fijación del complemento se realizó mediante el uso del kit comercial C1q Screen™ de *One Lambda*.

C1qScreen™ es utilizado para la detección de anticuerpos anti-HLA que se unen al complemento en muestras de suero.

Fundamento de la técnica

En conjunto se utilizaron los ensayos HLA LABScreen™ y C1qScreen™ de *One Lambda*, los cuales permiten la detección e identificación de anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra los antígenos HLA de clase I y clase II que son fijadores de complemento. El método se basa en la especificidad de la unión al complejo Ag-Ac, reconocida por la molécula C1q. A su vez, esta reacción es detectada por un anticuerpo anti-C1q marcado con un fluoróforo cuya señal es analizada en el fluoroanalizador Luminex 100/200®.

Explicación breve del método: las esferas HLA LABScreen™ y el C1qScreen™ se incuban con la muestra de suero a analizar. Cada esfera de HLA LABScreen™ contiene un antígeno HLA único, denominado Single Antigen. Los anticuerpos anti-HLA presentes en la muestra de suero se unen de manera específica a cada esfera, lo cual permite la identificación de los antígenos contra los cuales está sensibilizado el paciente. Posteriormente se adiciona la molécula de C1q, la cual reconoce el complejo Ag-Ac y se une exclusivamente a la porción Fc de los anticuerpos anti-HLA que son fijadores de complemento. Finalmente, se utiliza un anticuerpo anti C1q humano marcado con Ficoeritrina (PE), que sirve como indicador de la presencia de anticuerpos fijadores de complemento mediante la emisión de una señal de fluorescencia (Figura 14).

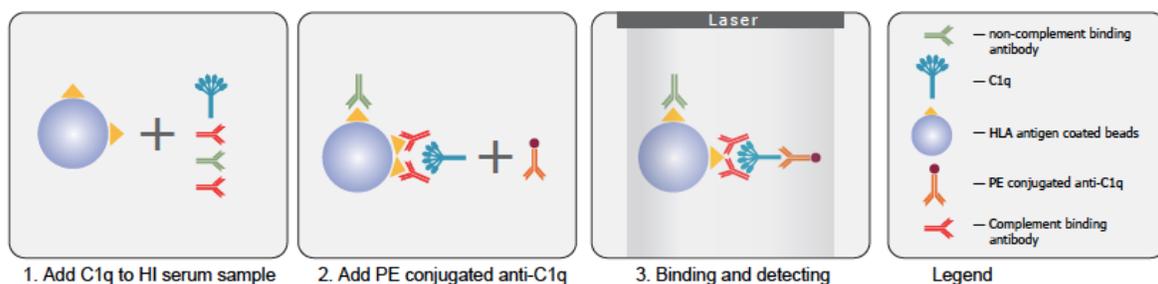


Figura 14. Detección de anticuerpos fijadores de complemento por el kit C1qScreen™ de One Lambda: El kit C1qScreen™ permite la identificación de los anticuerpos de unión al complemento (C1q).

La reacción final de fluorescencia es detectada utilizando el instrumento Luminex 100/200®. Los valores de MFI emitidos indican la cantidad de anticuerpo anti-HLA fijador de complemento presente en la muestra analizada. Posteriormente, los datos son analizados en el software HLA Fusion™ que permite la asignación de la especificidad del anticuerpo, al comparar la fluorescencia de cada esfera con el antígeno asignado^{75,76}.

6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos y la presentación de los resultados obtenidos se realizó utilizando el software estadístico IBM-SPSS V.25.0.

Estadística descriptiva: Se describió el perfil demográfico de la población de nuestro estudio. Los resultados de las variables categóricas se expresan en porcentajes y las variables cuantitativas se expresan como medias, desviación típica, incluyendo los intervalos de confianza (IC95%) y el rango (valor mínimo y máximo).

Análisis Bivariante: Se utilizó el test de *Chi*-cuadrado para comparar proporciones entre grupos y cuando éste no cumplió las condiciones de validez se aplicó el test exacto de Fisher. Para analizar las diferencias entre los valores medios de las variables cuantitativas entre dos grupos, se aplicó la Prueba de la "T" de Student para muestras independientes, (previo análisis de igualdad de varianza mediante la Prueba de Levene) o su equivalente no paramétrico Prueba U de Mann-Whitney

(este último obedeciendo al tamaño de la muestra en cada uno de los grupos estudiados).

Análisis de Supervivencia: El análisis de supervivencia se estimó usando el método de Kaplan-Meier (conocido también como del “límite del producto”), la significación estadística entre los tiempos de supervivencia se determinó con el test de Log-Rank que compara la supervivencia entres dos o más grupos de estudio.

Para todos los casos, se estableció como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

V. RESULTADOS

1. Análisis descriptivo de la población y características pre trasplante renal

Nuestro estudio incluyó un total de 245 pacientes los cuales fueron trasplantados de riñón en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves en Granada, España, en un periodo de 5 años. La media de edad de los pacientes analizados fue de 53.9 años (valor medio \pm desviación estándar: 53.9 ± 12.4), estando la media de los receptores dentro del rango de edad en que se presentan la mayoría de los casos de ESRD de la población, de acuerdo a los descrito por Martínez-Castelao en su estudio de la población española⁷⁷. La media de edad de los donantes fue de 50.4 años (valor medio \pm desviación estándar: 50.4 ± 14.7).

La distribución de sexo entre los receptores y los donantes fue similar, encontrando 71 mujeres (29%) y 174 hombres (71%) en el grupo de receptores y, 68 mujeres (29.1%) y 166 hombres (70.9%) en el grupo de donantes. Respecto de la distribución por grupo sanguíneo encontramos: grupo A (42.9%), grupo B (12.2%), grupo AB (2.4%) y grupo O (42.4%) para los receptores y, grupo A (41.2%), grupo B (12.2%), grupo AB (2.4%) y grupo O (44.1%) para los donantes la cual tiene una distribución comparable entre los dos grupos.

En los receptores de trasplante renal se analizaron las variables clínicas de interés para nuestro estudio. Dichas variables fueron: 1. número de incompatibilidades HLA para los locus A, B, DR, de acuerdo con los locus tenidos en cuenta en los algoritmos de trasplante para la asignación de los órganos y a los cuales se les otorga puntuación por compatibilidad; 2. porcentaje de sensibilización (cPRA), para clasificar a los pacientes como no sensibilizados (negativo), sensibilizados (sensibilización entre el 1-50% y 51-94%) y altamente sensibilizados (>95%); 3.

Presencia de DSA pre trasplante y capacidad de fijación de los DSA pre trasplante en los pacientes que se encontró presencia de estos. La tabla 1 resume las características pre trasplante de las variables consideradas en los pacientes receptores de trasplante renal.

Tabla 1. Descripción de las variables pre Trasplante renal

Variable		Frecuencia	Porcentaje (%)
Incompatibilidades Totales	Ninguna	3	1.2
	1	2	0.8
	2	5	2.0
	3	28	11.4
	4	61	24.9
	5	89	36.3
	6	57	23.3
	Total	245	100
Variable		Frecuencia	Porcentaje (%)
cPRA%	Negativo	192	78.4
	1-50%	31	12.7
	51-94%	12	4.9
	95-100%	10	4.1
	Total	245	100
Variable		Frecuencia	Porcentaje (%)

DSA pre Trasplante	NO	240	98
	SI	5	2
	Total	245	100
Variable		Frecuencia	Porcentaje (%)
DSA pre Trasplante fijadores de complemento	NO	5	100
	SI	0	0
	Total	5	100

Tabla 1. Variables analizadas pre trasplante. Incompatibilidades totales: se tuvieron en cuenta el número de incompatibilidades para los locus HLA-A, HLA-B, HLA-DR. cPRA%: presencia/ausencia de anticuerpos anti-HLA clasificados de acuerdo con su porcentaje de sensibilización. DSA pre Trasplante: DSA identificados en el momento del trasplante y, DSA pre Trasplante con capacidad de fijación del complemento: unión a C1q por parte de los DSA identificados.

Los protocolos de trasplante a nivel mundial han establecido que la presencia de DSA pre trasplante son una contraindicación para el mismo^{29,78}, sin embargo, en nuestra cohorte de estudio encontramos 5 pacientes a los cuales se les identificó la presencia de DSA pre trasplante. El resultado de la prueba cruzada final por CDC entre donante y receptor fue negativo en todos los casos y los pacientes fueron llevados a trasplante. Para evaluar si la presencia de dichos DSA estaban asociados con anticuerpos fijadores de complemento, realizamos la determinación de la capacidad de unión a C1q de dichos anticuerpos encontrando que todos los resultados fueron negativos para anticuerpos fijadores de complemento.

A la fecha de nuestro estudio, los cinco pacientes no han presentado eventos de rechazo y se encuentran con función renal estable. El seguimiento para estos pacientes comprendió un tiempo entre 6 meses y 4 años después del trasplante. En

el seguimiento pos trasplante de dichos pacientes no se evidenció la presencia de los DSA, lo que indica que la inmunosupresión administrada contribuyó a la supresión de la respuesta inmunológica y posteriormente las células plasmáticas fueron depletadas. Dado el n de casos, los resultados no constituyeron un valor de p estadísticamente significativo para los eventos de rechazo y pérdida del injerto por la presencia de DSA pre trasplante ($p>0.05$).

2. Análisis descriptivo de la población y características pos trasplante renal

Cuando se analizaron las características pos trasplante en los 245 pacientes incluidos en nuestro estudio se identificaron tres poblaciones diferentes, las cuales se clasificaron de acuerdo con la presencia/ausencia de DSA y la capacidad de fijación del complemento (resultados de C1q positivos).

Las tres poblaciones comprenden 219 pacientes (correspondiente al 89.4%) negativos para la presencia de DSA y 26 pacientes (correspondiente al 10.6%) que desarrollaron DSA *de novo*. Este último grupo se sub dividió en 17 pacientes (correspondiente al 6.9%) con presencia de DSA sin capacidad de fijar el complemento y 9 pacientes (correspondiente al 3.7%) con presencia de DSA fijadores de complemento.

La tabla 2 resume las características pos trasplante de las tres poblaciones identificadas y las características demográficas e inmunológicas de los mismos.

Tabla 2. Características según la presencia o ausencia de DSA y la capacidad de unión a C1q

Características	Pacientes totales	Pacientes sin DSA	Pacientes con DSA	
			No fijadores de Complemento	Fijadores de Complemento
Receptores	245	219	17	9
Edad	53.9 ± 12.4	54.2 ± 12.4	55.0 ± 11.9	46.1 ± 10.9
Sexo	174 hombres	158 hombres	11 hombres	5 hombres
	71 mujeres	61 mujeres	6 mujeres	4 mujeres
Donantes				
Edad*	50.4 ± 14.7	51.2 ± 14.5	43.3 ± 16.7	46.0 ± 13.3
Sexo*	166 hombres	147 hombres	12 hombres	7 hombres
	68 mujeres	61 mujeres	5 mujeres	2 mujeres
Tipo de Donante	233 fallecido	207 fallecido	17 fallecido	9 fallecido
	12 vivo	12 vivo	0 vivo	0 vivo
Datos inmunológicos				
Incompatibilidades HLA	4.6 ± 1.1	4.6 ± 1.1	4.5 ± 1.5	4.5 ± 1.1
Grupo Sanguíneo receptor				
A	105	98	7	0
B	30	30	0	0
AB	6	5	0	1

0	104	86	10	8
DSA				
Clase I	9		8	1
Clase II	11		7	4
Clase I y II	6		2	4

Tabla 2. Variables analizadas pos trasplante. Clasificación de las tres poblaciones identificadas según la presencia o ausencia de DSA y su capacidad de unión a C1q. *Datos faltantes.

2.1 Eventos de rechazo

Se analizaron los datos clínicos de los 245 pacientes de nuestro estudio, encontrando que solo 23 pacientes (9.4%) experimentaron eventos de rechazo, por su parte, 222 pacientes (90.6%) no presentaron eventos asociados a rechazo del injerto.

De acuerdo con los criterios Banff descritos anteriormente en este documento, los eventos de rechazo fueron clasificados de acuerdo al resultado de la biopsia como no inmunológicos o inmunológicos y, estos últimos fueron clasificados de acuerdo al mecanismo que lo ejerce como celular, humoral o mixto.

De los 23 pacientes, 10 (4.1%) presentaron eventos de rechazo no inmunológico asociados principalmente a: problemas quirúrgicos (laceración del injerto), infecciones (principalmente por *Poliomavirus*), linfocele o toxicidad por los inmunosupresores, lo que finalmente desencadenó retardo y evolución pobre de la función renal, shock hemorrágico, necrosis y posteriormente la pérdida del injerto

renal. Nueve pacientes perdieron en injerto renal durante el primer mes y un paciente (quién presentó linfocele) lo perdió a los 6 meses. Se evaluó la presencia de DSA en estos pacientes encontrando que todos eran negativos para DSA en el momento en que se presentó el evento de rechazo.

Posteriormente, analizamos si los 23 casos de rechazo estaban asociados con la presencia de DSA, encontrando que solo 10 pacientes (38.5%) que tuvieron eventos de rechazo desarrollaron DSA mientras que 13 pacientes (61.5%) eran DSA negativo. Estudiamos en los 10 pacientes que desarrollaron DSA, si los eventos de rechazo presentados estaban asociados con DSA con capacidad de fijar el complemento, encontrando que tres pacientes presentaron rechazo de tipo humoral y cuatro pacientes presentaron rechazo mixto, los cuales estaban asociados a anticuerpos fijadores de complemento. De los tres pacientes restantes, dos pacientes presentaron rechazo humoral y un paciente presentó rechazo mixto, ambos asociados a DSA sin capacidad de fijación del complemento. Lo anterior evidenció una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de DSA con capacidad de fijar las moléculas del complemento y los eventos de rechazo ($p = 0,009$). Los resultados presentados anteriormente se pueden observar en la Figura 15.

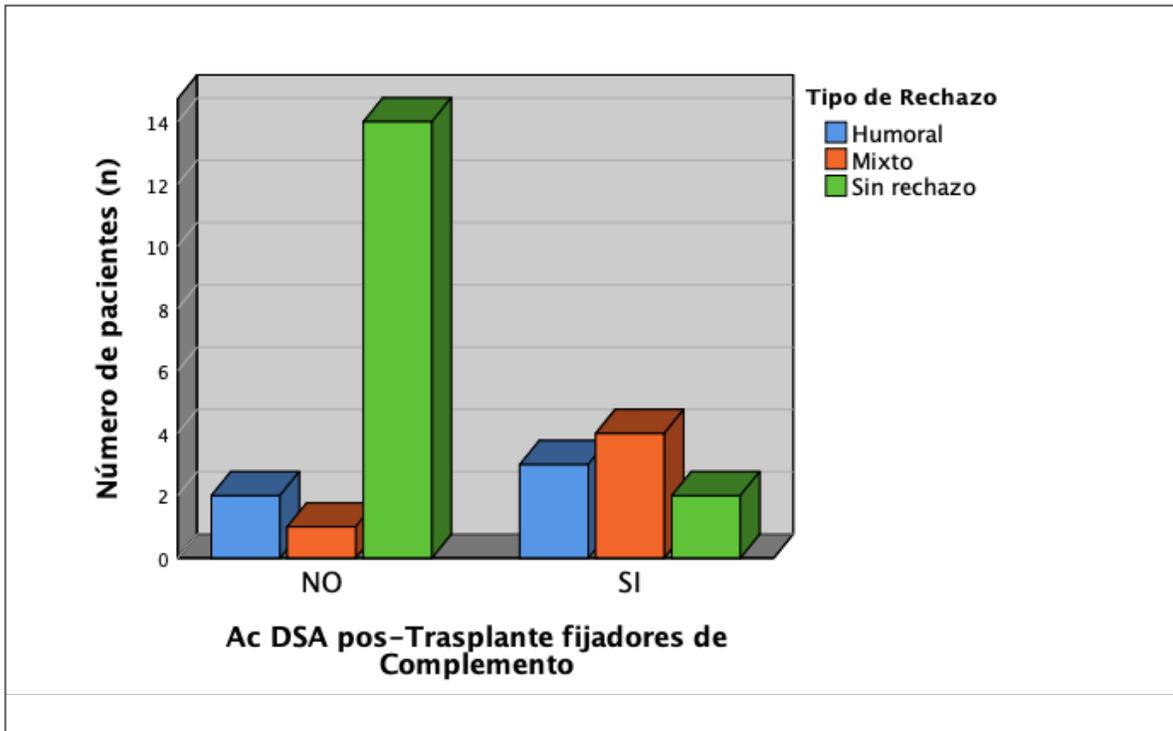


Figura 15. Asociación entre la presencia de DSA con capacidad de fijar el complemento en los pacientes que presentaron eventos de rechazo. Se observa un mayor número de eventos de rechazo en los pacientes que desarrollaron DSA de unión a C1q, con respecto de los que no fijan complemento ($p = 0,009$).

Cabe anotar que en nuestra cohorte encontramos dos pacientes con presencia de DSA con capacidad de fijar complemento que a la fecha de nuestro estudio no habían presentado eventos de rechazo. Este hallazgo resalta la importancia de evaluar la presencia de DSA como seguimiento de protocolo pos trasplante, para poder individualizar el monitoreo a estos pacientes y evitar eventos de rechazo que conduzcan a pérdida de la función renal. Lo anterior nos llevó a confirmar si la presencia de DSA fijadores de complemento estaba asociada al desarrollo de eventos de rechazo, analizándolo en los 26 pacientes que presentaron DSA, encontrando también una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de DSA con capacidad de fijar complemento y el posterior desarrollo de eventos de rechazo ($p = 0,009$). Los resultados presentados anteriormente se pueden observar en la Figura 16.

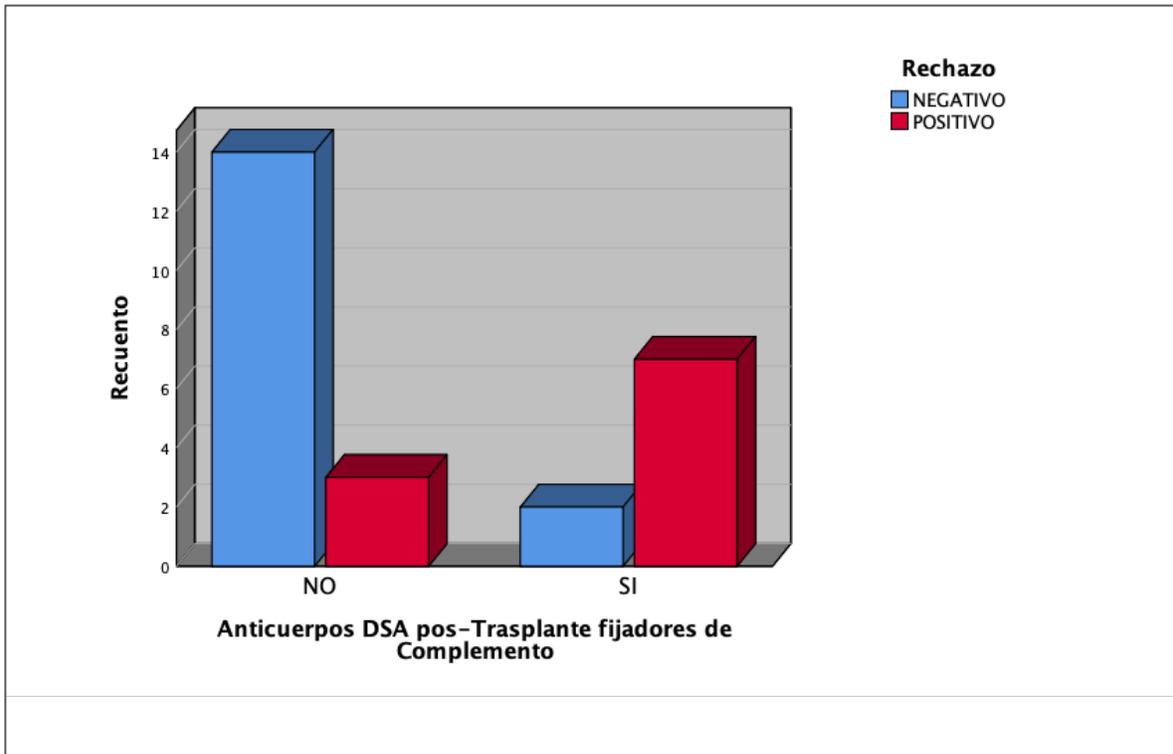


Figura 16. Asociación entre la presencia de DSA con capacidad de fijar el complemento y el desarrollo de eventos de rechazo. Se observa una mayor asociación en el desarrollo de eventos de rechazo en los pacientes que con DSA de unión a C1q, con respecto de los que no fijan complemento ($p = 0,009$).

2.2 Supervivencia del injerto y su asociación a la presencia de DSA

El seguimiento pos trasplante de los pacientes que no desarrollaron DSA fue de 17 meses (valor de la mediana), en un rango entre 0 y 61 meses. Por su parte, el valor de la mediana para los pacientes que desarrollaron DSA fijadores de complemento fue de 26 meses (rango de 0 a 49 meses) y de los que desarrollaron DSA sin capacidad de fijación del complemento fue de 17 meses (rango de 0 a 63 meses).

La evaluación de la supervivencia del injerto renal se realizó utilizando las curvas de Kaplan-Meier y la prueba de log-Rank, las cuales nos permiten estimar las

probabilidades de que un evento ocurra, en relación con la presencia de DSA. Los resultados obtenidos mostraron que los pacientes que desarrollaron DSA tienen una supervivencia del injerto menor en comparación con los pacientes que no desarrollaron DSA ($p = 0,017$). En la Figura 17 se pueden observar las curvas de supervivencia de los hallazgos descritos anteriormente.

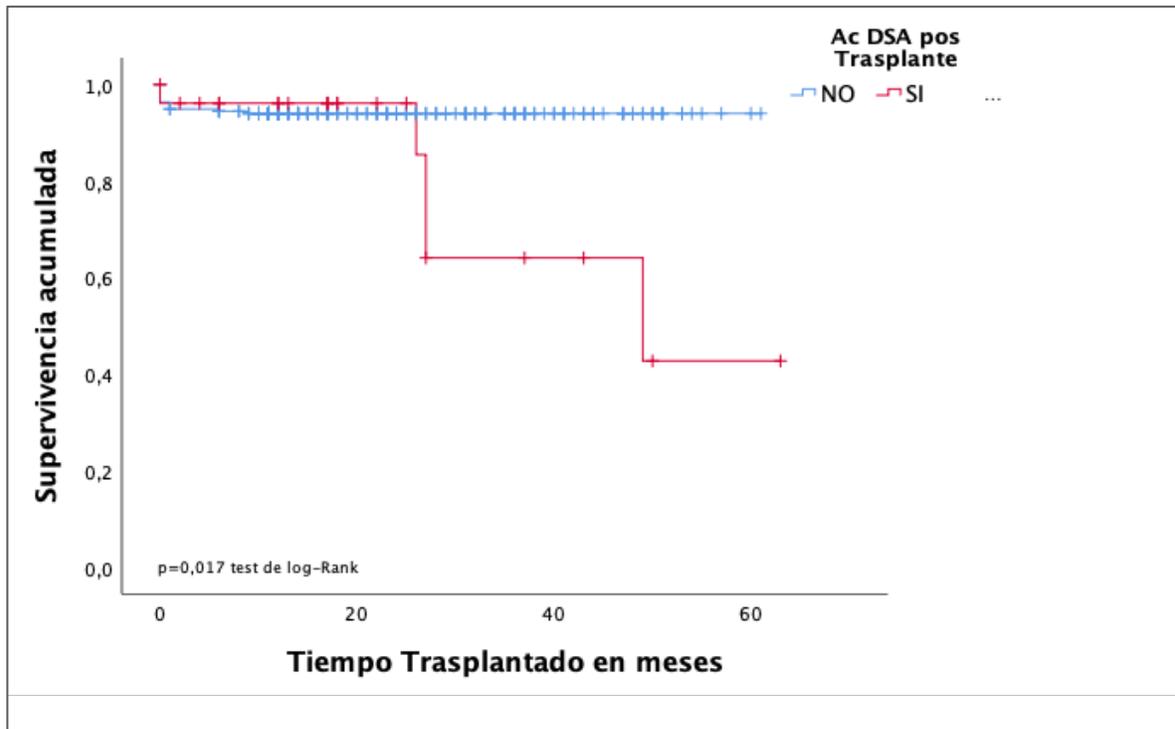


Figura 17. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia del injerto renal en relación con la presencia de DSA. Se observa una menor supervivencia del injerto renal en los pacientes que desarrollan DSA en comparación con los pacientes que no desarrollan DSA ($p = 0,017$).

Sin embargo, al determinar la supervivencia del injerto renal en relación a la presencia de anticuerpos con capacidad de unirse a C1q, encontramos que aquellos pacientes que desarrollan DSA con capacidad de fijar el complemento se relacionan con una supervivencia menor del trasplante renal cuando se compararon con aquellos pacientes que desarrollaron DSA que no tienen capacidad de fijar el complemento

($p = 0,009$). Los resultados de este hallazgo de supervivencia se pueden observar en la Figura 18.

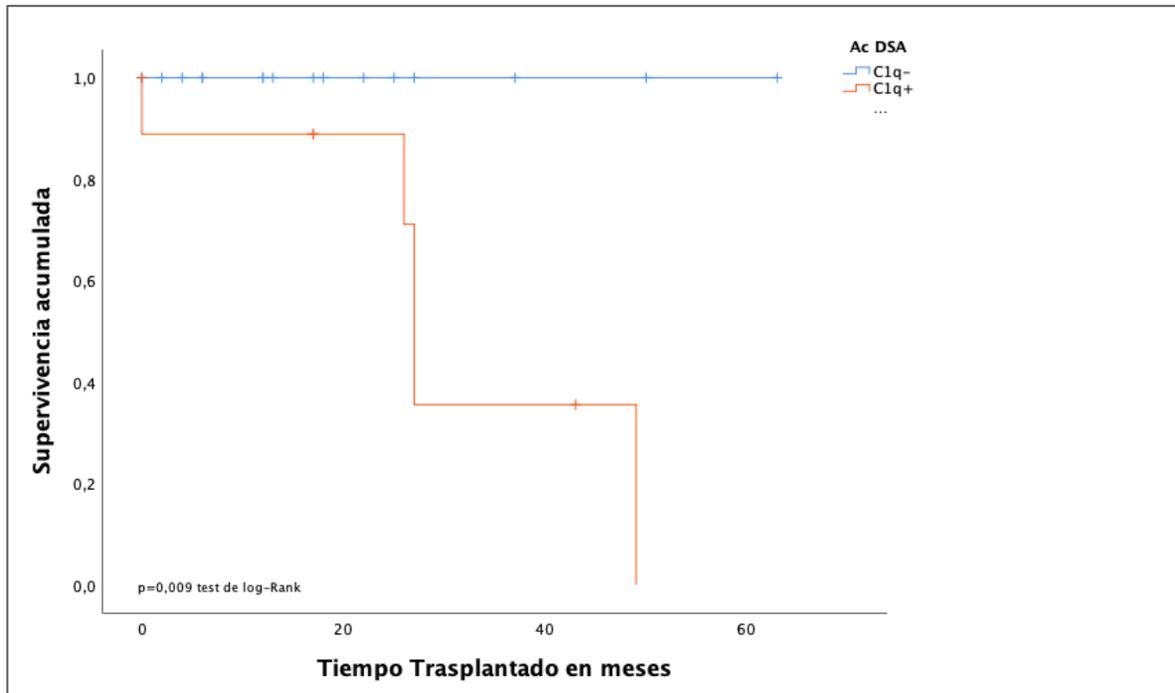


Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia del injerto renal en relación con la presencia de DSA fijadores y no fijadores de complemento. Se observa una menor supervivencia del injerto renal en los pacientes que desarrollan DSA en comparación con los pacientes que no desarrollan DSA ($p = 0,009$).

Para finalizar el análisis de supervivencia del injerto renal, evaluamos la sobrevida del trasplante teniendo en cuenta las tres poblaciones identificadas en nuestro estudio (pacientes sin DSA, con DSA fijadores de complemento y con DSA sin capacidad de fijar el complemento).

Al aplicar las curvas de Kaplan-Meier y la prueba de log-Rank encontramos que, tanto los pacientes que no desarrollaron DSA como los que tenían presencia de DSA

sin capacidad de fijar el complemento mostraron una sobrevida del injerto similar, cuando se compararon con los pacientes que desarrollaron DSA con capacidad de unirse a C1q ($p < 0,001$). Es importante resaltar que aquellos individuos que no desarrollaron DSA pero que presentaron pérdida temprana del injerto, por causas no inmunológicas, contribuyeron a las diferencias observadas en la gráfica para las dos poblaciones con mejor sobrevida del injerto.

Por tanto, encontramos que el grupo de pacientes que desarrollaron DSA fijadores de complemento tienen una mayor asociación con riesgos de pérdida del injerto renal y esto se representa en una menor supervivencia del injerto trasplantado. Los resultados descritos se pueden observar en la Figura 19.

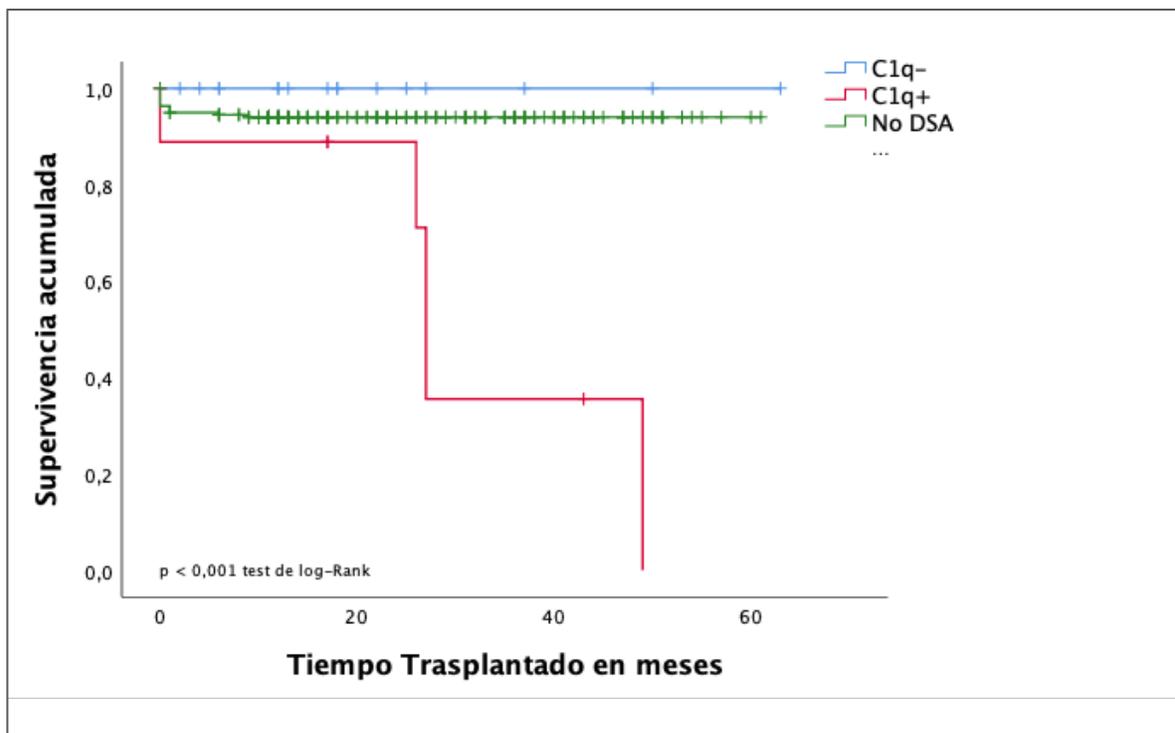


Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia del injerto renal en las tres poblaciones observadas. Se observa una menor supervivencia del injerto renal en los pacientes que desarrollan DSA fijadores de complemento, mientras que la supervivencia es similar para las otras dos poblaciones ($p < 0,001$).

2.3 Pérdida del injerto renal

En nuestra cohorte de estudio 18 pacientes cursaron con pérdida del injerto renal, siendo el 7.3% de los casos. Habíamos comentado anteriormente que 10 de estos pacientes perdieron el trasplante por causas no inmunológicas de acuerdo a la clasificación Banff y en ausencia de DSA.

En los ocho pacientes restantes, en los cuales la pérdida del injerto renal fue clasificada como causa inmunológica, encontramos 3 pacientes por rechazo celular sin presencia de DSA en el momento que se perdió el injerto y cinco pacientes como consecuencia de algún evento de rechazo inmunológico asociado a la presencia de DSA.

Evaluamos más a profundidad las consecuencias inmunológicas de la pérdida del injerto en los últimos cinco pacientes, en donde observamos que un paciente curso con rechazo humoral y cuatro pacientes con rechazo tanto celular como humoral (clasificados como rechazo mixto). Por lo anterior, analizamos si los eventos inmunológicos que conllevaron a la pérdida del injerto tenían una asociación estadística con la presencia de anticuerpos con capacidad de unirse al complemento. Los resultados que obtuvimos sugieren que la presencia de DSA fijadores de complemento y la pérdida del injerto renal tienen una asociación estadísticamente significativa ($p = 0,002$). En la Figura 20 se pueden observar los resultados de este hallazgo.

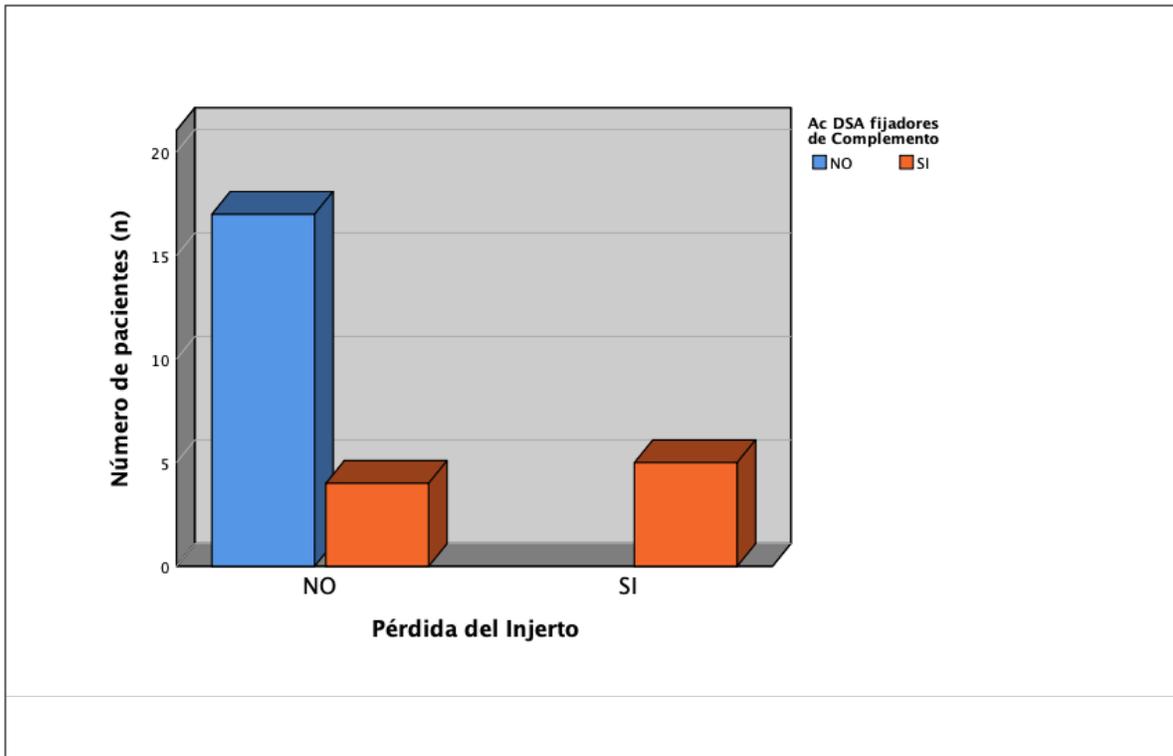


Figura 20. Asociación encontrada entre la presencia de DSA con capacidad de fijar el complemento y la pérdida del injerto renal. Se observa pérdida del injerto en los pacientes que desarrollaron DSA de unión a C1q, con respecto de los que no los presentaron ($p = 0,002$).

2.4 Evaluación de los valores de MFI presentes en los DSA y la relación con su capacidad de fijar complemento

Analizamos estadísticamente si los valores de MFI de los DSA se encontraban asociados con su capacidad para unirse a las moléculas del complemento. Para dicho análisis, clasificamos los valores de MFI en tres niveles, basados en los estudios previos publicados por Zecher y colaboradores⁵⁷. Establecimos tres categorías para la clasificación de los niveles de DSA, como: valores de MFI menores de 5.000, valores de MFI entre 5.000-9.999 y valores de MFI mayores a 10.000.

Los resultados entre los valores de MFI y la capacidad de fijación del complemento por parte de los DSA fueron estadísticamente significativos ($p = 0,033$). Dados los recientes hallazgos, se procedió a buscar en dónde radicaba esta diferencia; para ello se compararon en tablas de 2x2 las mismas variables, encontrando una asociación estadísticamente significativa entre los valores de MFI menores de 5.000 y los que se encuentran por encima de 10.000 ($p = 0,017$); resaltamos que las demás asociaciones no fueron estadísticamente significativas. La Figura 21 muestra los resultados previamente descritos.

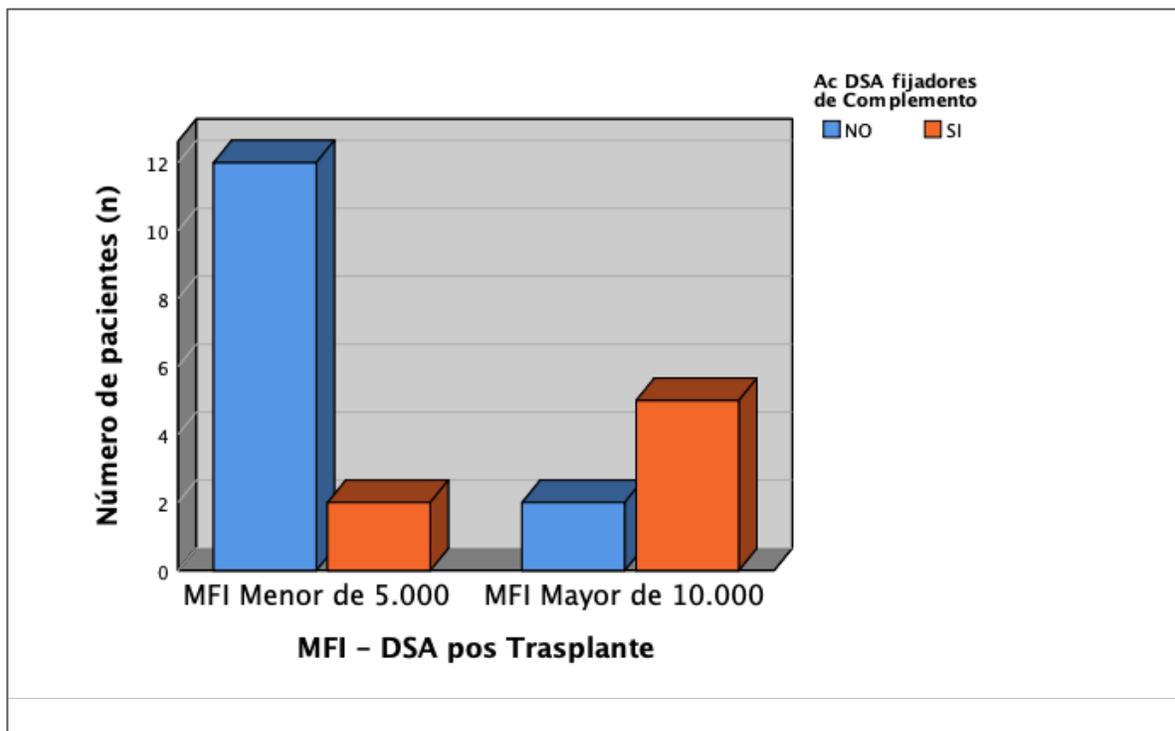


Figura 21. Asociación entre los valores de MFI y la capacidad de unión a complemento por los DSA. Se observa que los DSA no fijadores de complemento comprenden valores de MFI menores a 5.000, mientras que los DSA de unión a C1q están más relacionados con valores mayores de 10.000 ($p = 0,017$).

2.5 Evaluación de los DSA específicos de locus y la asociación con su capacidad para unirse al complemento

Analizamos también si la especificidad de los DSA y su capacidad para unirse al complemento tenía alguna asociación estadística. Para este análisis se tuvieron en cuenta los DSA identificados en el suero de los pacientes dirigidos contra las moléculas de HLA (locus HLA clase I A, B y C; y locus HLA clase II DR, DQ y DP).

En este punto cabe resaltar que cuando analizamos la presencia de anticuerpos dirigidos contra el locus DQ, los cuales estaban presentes en 7 de 9 pacientes, y su capacidad para fijar el complemento, encontramos un valor cercano a la significancia ($p = 0,097$), los cuales se asociaron con eventos de rechazo independiente de su valor de MFI. Para los anticuerpos dirigidos contra los demás locus no se encontraron asociaciones que demostraran un efecto significativo de la presencia de anticuerpos específicos de locus, su capacidad de unirse al complemento y los eventos de rechazo. En la Figura 22 podemos observar los resultados previamente descritos.

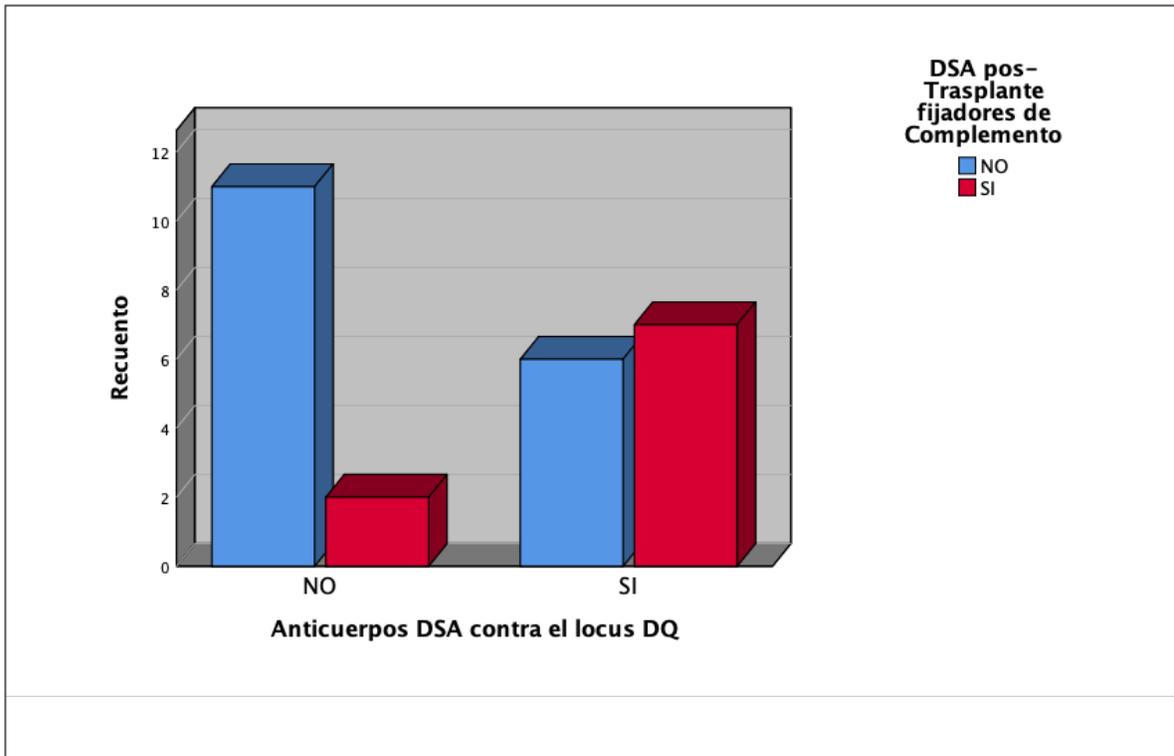


Figura 22. Valor cercano a la significancia de los DSA dirigidos contra HLA-DQ y su capacidad para unirse al complemento. Se observa que los DSA dirigidos contra los loci HLA-DQ tienen una tendencia cercana a la significancia para ser anticuerpos fijadores de complemento independiente de su valor de MFI ($p = 0,097$).

VI. DISCUSIÓN

Es bien sabido que en el trasplante renal el AMR representa una de las principales causas de rechazo y pérdida del injerto. El desarrollo de DSA surge como consecuencia del reconocimiento de lo extraño cuando el sistema inmunológico reconoce las incompatibilidades entre las moléculas HLA del donante y del receptor. Debido al alto polimorfismo de las moléculas de HLA, encontrar un donante compatible resulta un reto para los grupos de trasplante y prolonga el tiempo de espera para los pacientes, por lo que las estrategias están dirigidas a evitar el desarrollo de anticuerpos en el pos trasplante.

La sensibilización contra las moléculas HLA a las que están enfrentados los receptores de trasplante, como consecuencia de eventos sensibilizantes previos, principalmente por las transfusiones sanguíneas o por trasplantes previos, conlleva a la formación de anticuerpos específicos dirigidos contra los antígenos de HLA, los cuales *per se* constituyen una barrera importante para que los pacientes puedan acceder al trasplante^{79,80}.

En el presente estudio se ha evaluado la presencia DSA y su relación con los eventos de rechazo y la pérdida del injerto renal, teniendo en cuenta dos contextos diferentes los anticuerpos fijadores de complemento y los anticuerpos no fijadores de complemento.

El marco teórico en el que se apoya nuestro estudio resalta el hecho de la variabilidad en la actividad de unirse al complemento por los DSA desarrollados pos trasplante y que dicha capacidad conduce a resultados diferentes en la función y supervivencia del trasplante renal.

Nuestro estudio analizó retrospectivamente una cohorte de 245 pacientes trasplantados de riñón en el HUVN en un periodo de 5 años. Cuando analizamos las características pre trasplante, encontramos que cinco pacientes fueron trasplantados en presencia de DSA; cabe anotar que todos los pacientes fueron llevados a trasplante dado que contaban con resultados de prueba cruzada final CDC negativa. Es bien sabido, desde que se publicaron los estudios realizados por Terasaki y colaboradores⁵³, que los resultados negativos de las pruebas cruzadas finales por CDC tienen un valor predictivo positivo en la sobrevida del injerto ya que disminuye las posibilidades de rechazo hiperagudo en aquellos pacientes que tienen anticuerpos preformados. Caso contrario, una prueba cruzada positiva confirma la presencia de anticuerpos citotóxicos que pueden estar dirigidos contra las moléculas HLA del donante y, por tanto, son una contraindicación del trasplante. A la fecha de realización de nuestro estudio, ninguno de los cinco pacientes había cursado con eventos de rechazo ni deterioro o pérdida de la función renal. Por su parte, como se observa en la tabla 1, el 98% de los pacientes no cursaban con DSA pre trasplante y el resultado de la prueba cruzada final por CDC fue negativos.

De acuerdo con el modelo de medición del riesgo inmunológico, propuesto por Zecher y colaboradores⁵⁷, los DSA preexistentes se pueden clasificar de acuerdo a su valor de MFI y a sus propiedades para fijar el complemento, lo que podría significar una estrategia importante en la medición del riesgo vs. la permanencia en lista de espera de los pacientes candidatos a trasplante. Sin embargo, este modelo no ha sido aceptado en la práctica actual por los grupos trasplantadores. Aunque se realizó a *posteriori*, el análisis de la capacidad para fijar complemento por parte de los DSA pre trasplante en los cinco pacientes demostró que dichos anticuerpos no eran fijadores de complemento, por lo que los pacientes fueron menos proclives a desarrollar eventos de rechazo y tuvieron un valor predictivo positivo en la sobrevida del injerto^{81,82}.

Es importante resaltar que, es probable que el régimen inmunosupresor de inducción que reciben todos los pacientes trasplantados, seguido de la terapia de mantenimiento, hayan contribuido con la eliminación de clones de células T y B alorreactivas, así como, la desaparición de los DSA preexistentes y por tanto los pacientes experimentaron resultados pos trasplante comparables con los pacientes sin DSA. Nuestros hallazgos se correlacionan con lo descrito por Zecher y colaboradores en su estudio, sin embargo, es importante que cada centro establezca protocolos de seguimiento riguroso para estos pacientes, en pro de controlar los niveles de DSA medidos en su valor de MFI, así como en su capacidad para unirse a C1q^{69,83}. Contrario a nuestros hallazgos, la posición de otros autores frente a la presencia de DSA es considerarlos un factor de riesgo para el desarrollo de AMR agudo, retraso en la función del injerto y posterior pérdida del trasplante. Teniendo en cuenta estas observaciones, cada paciente debería ser valorado individualmente y su seguimiento pos trasplante debe ser más estricto respecto de los pacientes sin DSA⁸⁴⁻⁸⁷.

Cuando analizamos las características pos trasplante, caracterizamos nuestra población en tres grupos: pacientes sin DSA, pacientes con DSA fijadores de complemento y pacientes con DSA sin capacidad de unirse y activar el complemento. Analizamos los eventos de rechazo en los pacientes que se presentaron encontrando una asociación entre la frecuencia de los eventos de rechazo y la presencia de DSA con capacidad de unirse al complemento. En contra parte, a pesar de desarrollar DSA *de novo*, si los anticuerpos no tienen capacidad de unirse al complemento los pacientes experimentaron menos eventos de rechazo. Por lo tanto, nuestro estudio demostró que la categorización de los DSA, otorga un valor agregado en la detección temprana de la presencia de DSA que fijen complemento y que pueden conducir a lesión del injerto con deterioro y pérdida de la función renal. Por su parte, si la presencia de dichos DSA es diagnosticada a tiempo, se

pueden tomar medidas al modular la inmunosupresión para controlar la respuesta inmunológica. Las asociaciones encontradas en nuestro estudio, han sido ampliamente discutidas por diferentes autores, en donde se plantea la importancia de desarrollar enfoques basados en la caracterización biológica de los anticuerpos, de acuerdo a su capacidad de unirse al complemento, y como marcador pronóstico del desarrollo de AMR y de la sobrevida del aloinjerto renal en los pacientes que desarrollan DSA, sentando las bases para determinar con mayor precisión el rechazo por anticuerpos⁸⁸⁻⁹².

Evaluamos la supervivencia del injerto renal en nuestra población de estudio, encontrando resultados similares a los publicados en otras investigaciones, las cuales analizaron la sobrevida del injerto en presencia de DSA^{88,93-95}. En nuestros pacientes, las tasas de supervivencia renal a los cinco años pos trasplante disminuyeron significativamente en aquellos pacientes con presencia de DSA; sin embargo, cuando evaluamos la supervivencia del injerto renal de acuerdo a su capacidad para unirse a las moléculas del complemento, la supervivencia del injerto fue diferente en ambos grupos y las tasas de supervivencia se mantuvieron similares en los pacientes sin DSA y con DSA sin capacidad de unión a C1q. Por lo tanto, cuando los pacientes desarrollaron DSA con capacidad de fijar el complemento fueron más proclives a deterioro y pérdida del injerto renal. Loupy y colaboradores han discutido ampliamente en sus estudios que la presencia de DSA que fijan complemento es indicativa de mayor riesgo de falla del injerto renal, debido al efecto nocivo de dichos anticuerpos, la activación y el reclutamiento celular en el sitio de la lesión y los resultados sobre el trasplante^{88,96}.

La pérdida del injerto renal fue otro hallazgo en el que nuestro estudio demostró asociación estadísticamente significativa con la presencia de DSA fijadores de complemento, en comparación con los pacientes con DSA que no se unen a C1q de los cuales ninguno había experimentado pérdida del injerto renal al momento de

nuestro estudio. Cabe anotar que para realizar el análisis se excluyeron aquellos pacientes que cursaron con pérdida del injerto renal por causas no inmunológicas. Loupy y colaboradores en su estudio "*Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival*"⁹⁶, encontraron la misma asociación, y aunque su estudio incluye una cohorte más amplia, dichos resultados soportan los hallazgos encontrados en nuestra cohorte. Otros estudios que respaldan nuestros hallazgos, son los estudios publicados por Tyan y colaboradores⁸⁵, y en los cuales además se estima que la presencia de DSA fijadores del complemento condicionan la pérdida del injerto renal en un periodo comprendido entre 1 a 2,5 años.

Diferentes autores han discutido si la capacidad para fijar el complemento por los DSA está relacionada con su valor de MFI. La asociación encontrada en nuestro estudio, referida a los valores de MFI y la capacidad para unirse al complemento por los DSA, es consistente con lo publicado entre otros por los estudios de Yell y Visentin en sus artículos sobre el estudio de los anticuerpos y la actividad del complemento^{97,98}. Dichos estudios sugieren que la capacidad para unirse al complemento depende en gran medida de la concentración de anticuerpos en el suero del paciente, lo que se correlaciona indirectamente con la medición de los valores de MFI detectados por las técnicas de *Single Antigen*, en los que valores más altos sugieren mayor presencia de DSA y por tanto más anticuerpos presentes que se unen a un antígeno específico permitiendo la unión de la molécula de C1q, como consecuencia un riesgo mayor de desarrollar AMR.

Sin embargo, y a pesar de la asociación encontrada en este estudio, en nuestra cohorte encontramos pacientes con DSA con valores de MFI mayores a 10.000 que no habían presentado eventos de rechazo en el momento de nuestro análisis y, en contra parte, pacientes con DSA con MFI menores de 5.000 que desarrollaron eventos de rechazo, aunque cabe anotar que sin pérdida del injerto renal. Estos hallazgos sugieren que los valores de MFI no condicionan la capacidad para

desarrollar AMR por los DSA y que algunos anticuerpos pueden unirse de manera independiente a su valor de MFI permitiendo la activación de la cascada del complemento; dichos resultados también han sido sujeto de discusión en diferentes estudios^{90,93,99}, lo que soporta la idea de que no se puede generalizar sobre la capacidad de activación del complemento de los anticuerpos sino que dicha actividad debe ser evaluada por métodos que determinen específicamente la capacidad de fijación del complemento de los DSA pos trasplante.

Otro hallazgo que resaltamos de nuestro estudio por la importancia que tiene en los últimos tiempos, es que encontramos que la mayoría de los DSA con capacidad para unirse a C1q estaban dirigidos contra el locus HLA-DQ, dato que fue evidenciado en 7 de 9 pacientes. Estos anticuerpos fueron encontrados en pacientes que desarrollaron AMR independiente de su valor de MFI. Aunque no se encontró una asociación estadística que demostrara un efecto significativo de la presencia de anticuerpos contra el locus HLA-DQ y la capacidad de fijar el complemento, observamos una tendencia que tuvo un valor cercano a la significancia. Estos hallazgos sugieren que la mayoría de los DSA que se desarrollan están dirigidos contra las moléculas DQ y, que a su vez, esto conduce a un mayor riesgo de activación de la cascada del complemento incluso cuando los niveles de MFI son menores de 10.000; dichos hallazgos han sido discutidos ampliamente en diferentes estudios¹⁰⁰⁻¹⁰⁵, en donde los autores atribuyen a la presencia de DSA contra el HLA-DQ, el rechazo temprano del injerto por el desarrollo de AMR, glomerulopatía del trasplante y las consecuencias en la sobrevida del injerto.

Estudios recientes han expuesto que la especificidad de los DSA contra las moléculas HLA-DQ puede estar relacionada con la expresión de dichos antígenos en el injerto, cuya señal fue detectada en la corteza de los riñones trasplantados, medidos mediante microscopía de inmunofluorescencia, en riñones de pacientes que desarrollaron TCMR; y por la inmunogenicidad de dicho antígeno, lo que conlleva

a la incidencia de DSA pos trasplante contra este loci HLA. Resulta contradictorio que el HLA-DR que es más polimórfico que la molécula de HLA-DQ resulte menos inmunogénico que este último, sin embargo, cabe resaltar que el HLA-DQ está conformado por dos genes polimórficos (el DQ β y DQ α) y que dicho polimorfismo aumenta la expresión de epítomos que se expresan en la superficie celular¹⁰⁵, por lo que las incompatibilidades en el locus DQ entre donante y receptor pueden resultar en la presencia de DSA. Dados estos hallazgos, las políticas de asignación de órganos, especialmente las de Eurotrasplant y OPTN, han discutido ampliamente la inclusión del emparejamiento HLA-DQ como estrategia para disminuir el riesgo de desarrollar DSA *de novo* y como consecuencia el rechazo del injerto, lo que soporta la idea actual para que los algoritmos de asignación de órganos otorguen un puntaje adicional en las compatibilidades HLA-DQ para los pacientes que esperan un trasplante con donante fallecido^{39,106,107}. Se estima que con la inclusión de las compatibilidades en la molécula de HLA-DQ, la probabilidad de eventos de rechazo sea significativamente menor, y que dichos cambios representen beneficios para el paciente al minimizar su exposición a terapias de inmunosupresión de rescate, las cuales afectan las tasas morbilidad y mortalidad⁴¹.

Con base en los resultados de nuestro estudio, aunque no fueron estadísticamente significativos, quisimos resaltar la importancia de la búsqueda de la compatibilidad en el locus HLA-DQ con el objetivo de reducir el riesgo que representa la inmunogenicidad de dicho antígeno. Aunque nuestros resultados son consistentes con los datos publicados por diferentes autores, el bajo número de casos puede ser un factor limitante.

El avance en el desarrollo de biomarcadores más sensibles y específicos que ayudan a una identificación más precisa de los DSA como los métodos de *Single Antigen*, permiten la monitorización no invasiva de los pacientes trasplantados. Sin embargo, si se clasifican estos DSA con base en su interacción con las moléculas del

complemento, su monitorización podría estar enfocada en el seguimiento pos trasplante y la posibilidad de la modulación de la terapia de inmunosupresión antes que se desarrollen eventos de rechazo o pérdida progresiva de la función renal. Por tanto, las técnicas disponibles para la detección de anticuerpos fijadores de complemento, permiten predecir la patogenicidad de los DSA y la estratificación del riesgo inmunológico.

Es importante reconocer que aún queda mucho por ahondar sobre los DSA y sus mecanismos de acción, sin embargo, los protocolos clínicos de seguimiento pos trasplante podrían incluir la estratificación del riesgo a través de la identificación de posibles DSA fijadores de complemento, para clasificar correctamente a los pacientes, especialmente aquellos que cursan con función renal estable y que no necesariamente requieren un procedimiento invasivo como la biopsia de protocolo^{88,94}.

Los resultados publicados en este estudio demostraron resultados estadísticamente significativos y apoyan nuestra hipótesis sobre la importancia de la caracterización de los DSA; clasificándolos de acuerdo a su capacidad de activar la vía clásica del complemento, el riesgo de presentar eventos de AMR e inducir pérdida del injerto.

Los resultados de nuestro estudio son comparables con los resultados publicados por otros autores en donde se evalúa la categorización de los DSA y la sobrevida del injerto renal. Cabe anotar que el bajo número de casos de nuestro estudio podría ser considerado como un factor limitante, por lo que la ampliación de este estudio con pacientes de otras instituciones podría aumentar el número de casos que soportarían nuestros hallazgos, por lo que este estudio es la fase inicial de un estudio interinstitucional que continuará en la búsqueda de nuevos casos que soporten

nuestra hipótesis y que soporten la idea de que la categorización de los DSA pueda ser incluida en los protocolos de seguimiento pos trasplante.

Por otra parte, teniendo esto en mente, otro campo de acción en la clasificación del riesgo de los DSA, es la posibilidad de evaluar la unión a C1q en aquellos pacientes sensibilizados que se encuentran en lista de espera de un riñón, especialmente aquellos hiper-inmunizados, quienes prolongan su tiempo en lista por los anticuerpos pre formados lo que aumenta las posibilidades de mortalidad asociada a la diálisis, por lo que dicha clasificación resultaría una prometedora alternativa por explorar.

Dados nuestros resultados y la factibilidad soportada en diversos estudios, el hecho de poder aceptar órganos que hoy en día se considerarían “incompatibles”, como una estrategia para disminuir las tasas de mortalidad en lista de espera, constituye otra interesante perspectiva futura para ampliar este estudio.

VII. CONCLUSIONES

Nuestro estudio realizado sobre el análisis de los anticuerpos anti-HLA de unión al complemento y su asociación con la supervivencia del trasplante renal, permitió extraer las siguientes conclusiones:

1. El desarrollo de DSA que tienen la capacidad de unirse al complemento se asocia significativamente con un mayor número de eventos de AMR, lo que conduce a lesión del injerto con la consecuente pérdida de la función renal.
2. El desarrollo de DSA que no se unen al complemento, demuestra una supervivencia del injerto renal comparable con los pacientes que no desarrollan la presencia de DSA.
3. La pérdida del injerto renal encontrada en los pacientes que desarrollaron DSA, está asociada significativamente a la capacidad de unirse al complemento.
4. Los valores de MFI de los DSA, que sugieren la cantidad de DSA presente, está asociada significativamente con la presencia de DSA con capacidad para unirse y activar la vía clásica del complemento.
5. La presencia de DSA dirigidos contra las moléculas HLA-DQ, se asocia con una tendencia cercana a la significancia para desarrollar DSA con capacidad de unirse al complemento, independiente de sus valores de MFI.
6. El desarrollo de DSA activadores del complemento, tienen un impacto significativo en el riesgo de rechazo y pérdida del injerto renal, por lo que la detección de dichos anticuerpos puede agregar un valor para el análisis individual en la estratificación del riesgo.

Por lo tanto, nuestros resultados nos permiten concluir que la detección de la capacidad de unión al complemento por los DSA circulantes, se ha sugerido como un biomarcador pronóstico para predecir el resultado de AMR y la supervivencia del injerto en pacientes con trasplante de riñón que desarrollaron DSA.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Hughes AL. Major Histocompatibility Complex (<scp>MHC</scp>) Genes: Evolution. In: *ELS*. Wiley; 2008. doi:10.1002/9780470015902.a0005133.pub2
2. Danchin E, Vitiello V, Vienne A, et al. The major histocompatibility complex origin. *Immunol Rev*. 2004;198:216-232. doi:10.1111/J.0105-2896.2004.00132.X
3. Kallon D. Histocompatibility & immunogenetics. 2022.
4. Meyer D, Single RM, Mack SJ, Erlich HA, Thomson G. Signatures of Demographic History and Natural Selection in the Human Major Histocompatibility Complex Loci. *Genetics*. 2006;173(4):2121. doi:10.1534/GENETICS.105.052837
5. Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nat* 2003 4256960. 2003;425(6960):805-811. doi:10.1038/NATURE02055
6. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby.*; 2007.
7. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Jr. AJF, Weyand CM. The Major Histocompatibility Complex. In: *Clinical Immunology: Principles and Practice*. Content Repository Only!; 2019:79-92.e1. doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00005-3
8. McMahon RM, Friis L, Siebold C, Friese MA, Fugger L, Jones EY. Biological Crystallography Structure of HLA-A*0301 in complex with a peptide of proteolipid protein: insights into the role of HLA-A alleles in susceptibility to multiple sclerosis. *Res Pap Acta Cryst*. 2011;67:447-454. doi:10.1107/S0907444911007888
9. Yeager M, Hughes AL. Evolution of the mammalian MHC: Natural selection, recombination, and convergent evolution. *Immunol Rev*. 1999;167:45-58. doi:10.1111/J.1600-065X.1999.TB01381.X
10. W.Mak T, E.Saunders M. MHC: The Major Histocompatibility Complex. In: *The Immune Response Basic and Clinical Principles*. Academic Press; 2006:247-277. doi:10.1016/B978-012088451-3.50012-0
11. Liu J, Gao GF. Major Histocompatibility Complex: Interaction with Peptides. *eLS*. August 2011. doi:10.1002/9780470015902.A0000922.PUB2
12. Kamal S, Lappin SL. *Genetics, Histocompatibility Antigen*. StatPearls Publishing; 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31082067>.
13. Hermann C, Trowsdale J, Boyle LH. TAPBPR: A new player in the MHC class I presentation

- pathway. *Tissue Antigens*. 2015;85(3):155-166. doi:10.1111/tan.12538
14. McShan AC, Devlin CA, Morozov GI, et al. TAPBPR promotes antigen loading on MHC-I molecules using a peptide trap. *Nat Commun*. 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-23225-6
 15. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, PA, Elsevier.; 2018.
 16. Pishesha N, Harmand TJ, Ploegh HL. A guide to antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 2022 2212. 2022;22(12):751-764. doi:10.1038/s41577-022-00707-2
 17. Sant AJ. Overview of T-Cell Recognition: Making Pathogens Visible to the Immune System. In: *Clinical Immunology: Principles and Practice*. Fifth Edit. Elsevier Ltd; 2019:93-106.e1. doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00006-5
 18. Murphy K, Weaver C. *Immunology Janeway's*. 9Th Editio.; 2017.
 19. Greenspan NS, Cavacini LA. Immunoglobulin Function. In: *Clinical Immunology: Principles and Practice*. Fifth Edit. Elsevier Ltd; 2019:223-233.e1. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00015-6
 20. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. B Cell Activation and Antibody Production. In: *Cellular and Molecular Immunology*. ; 2018.
 21. West E, Kolev M, Kemper C. Complement and the Regulation of T Cell Responses. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053245
 22. Hatzinger M, Stastny M, Grützmacher P, Sohn M. The history of kidney transplantation. *Urol* . 2016;55(10):1353-1359. doi:10.1007/s00120-016-0205-3
 23. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. Transplantation Immunology. In: *Cellular and Molecular Immunology*. ; 2018:373-396.
 24. Jones DJW, Butler LT, Harris JP, Vaux EC. Latent learning in End Stage Renal Disease (ESRD). *Physiol Behav*. 2015;142:42-47. doi:10.1016/j.physbeh.2015.01.033
 25. Voora S, Adey DB. Management of Kidney Transplant Recipients by General Nephrologists: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis*. 2019;73:866-879. doi:10.1053/j.ajkd.2019.01.031
 26. Kaballo MA, Canney M, O'Kelly P, Williams Y, O'Seaghda CM, Conlon PJ. A comparative analysis of survival of patients on dialysis and after kidney transplantation. *Clin Kidney J*. 2018;11(3):389-393. doi:10.1093/ckj/sfx117
 27. Kovesdy CP. Clinical trials in end-stage renal disease – priorities and challenges. *Nephrol Dial Transplant*. June 2019. doi:10.1093/ndt/gfz088

28. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, et al. Systematic review: Kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant.* 2011;11(10):2093-2109. doi:10.1111/J.1600-6143.2011.03686.X/ATTACHMENT/FD03019C-28AE-4BC7-9C50-CD0C94E45723/MMC1-SUP1-APPENDIX.DOC
29. Chadban SJ, Ahn C, Axelrod DA, et al. KDIGO Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Management of Candidates for Kidney Transplantation. *Transplantation.* 2020;104(4S1 Suppl 1):S11-S103. doi:10.1097/TP.0000000000003136
30. Penn DJ, Ilmonen P. Major Histocompatibility Complex: Human. *eLS.* September 2005. doi:10.1038/NPG.ELS.0003987
31. Kaufman J. Major Histocompatibility Complex: Human. *eLS.* 2021;2:1-8. doi:10.1002/9780470015902.A0029387
32. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens.* 2010;75(4):291-455. doi:10.1111/J.1399-0039.2010.01466.X
33. Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P MS. IPD-IMGT/HLA Database. IPD-IMGT/HLA Database. <https://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>.
34. Williams RC, Opelz G, McGarvey CJ, Weil EJ, Chakkera HA. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors. *Transplantation.* 2016;100(5):1094-1102.
35. Yacoub R, Nadkarni GN, Cravedi P, et al. Analysis of OPTN/UNOS registry suggests the number of HLA matches and not mismatches is a stronger independent predictor of kidney transplant survival. *Kidney Int.* 2018;93(2):482-490. doi:10.1016/j.kint.2017.07.016
36. Pascual J, Abramowicz D, Cochat P, et al. Guías Europeas sobre manejo y evaluación de receptores y donantes renales. *Nefrologia.* 2014;34(3):293-301. doi:10.3265/Nefrologia.pre2014.Feb.12490
37. Documento aprobado por el Grupo de Trabajo (GT) de Inmunología de la Comisión asesora (CA) de Trasplante renal y pancreático en reunión del 20/06/2018. Aprobado por la CA de Trasplante renal y pancreático del 24/10/2018. Guía de Estudios Inmunológicos en el Trasplante Renal 2018. 2018.
38. Arias Y, Salinas MA, Montaña JI. Criterios de Asignación para Trasplante Renal en Colombia. 2018.
39. Devos JM, Gaber AO, Knight RJ, et al. Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int.* 2012;82(5):598-604.

doi:10.1038/ki.2012.190

40. Kosmoliaptsis V, Gjorgjimajkoska O, Sharples LD, et al. Impact of donor mismatches at individual HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ loci on the development of HLA-specific antibodies in patients listed for repeat renal transplantation. *Kidney Int.* 2014;86(5):1039-1048. doi:10.1038/ki.2014.106
41. Tambur AR, Kosmoliaptsis V, Claas FHJ, Mannon RB, Nickerson P, Naesens M. Significance of HLA-DQ in kidney transplantation: time to reevaluate human leukocyte antigen-matching priorities to improve transplant outcomes? An expert review and recommendations. *Kidney Int.* 2021;100:1012-1022. doi:10.1016/j.kint.2021.06.026
42. Agence de la Biomédecine. PROCEDURES D'APPLICATION DES REGLES DE REPARTITION ET D'ATTRIBUTION DES GREFFONS PRELEVES SUR PERSONNE DECEDEE Mise à jour : octobre 2014.
43. Mak TW, Saunders ME. Transplantation. In: *The Immune Response.* ; 2006:873-921. doi:10.1016/B978-0-12-088451-3.50029-6
44. Li Q, Lan P. Activation of immune signals during organ transplantation. doi:10.1038/s41392-023-01377-9
45. Nilsson J, Ansari D, Ohlsson M, et al. Human Leukocyte Antigen-Based Risk Stratification in Heart Transplant Recipients-Implications for Targeted Surveillance. 2019. doi:10.1161/JAHA.118.011124
46. Tambur AR, Das R. Can We Use Eplets (or Molecular) Mismatch Load Analysis to Improve Organ Allocation? the Hope and the Hype. *Transplantation.* 2023;107(3):605-615. doi:10.1097/TP.0000000000004307
47. Philogene MC, Amin A, Zhou S, et al. Eplet mismatch analysis and allograft outcome across racially diverse groups in a pediatric transplant cohort: a single-center analysis. 2020. doi:10.1007/s00467-019-04344-1
48. Lopes D, Barra T, Malheiro J, et al. Effect of different sensitization events on HLA alloimmunization in kidney transplantation candidates. *Transplant Proc.* 2015;47(4):894-897. doi:10.1016/j.transproceed.2015.03.014
49. D'orsogna L, Van Den Heuvel H, Cees Van Kooten &, Heidt S, Claas FHJ. Infectious pathogens may trigger specific allo-HLA reactivity via multiple mechanisms. doi:10.1007/s00251-017-0989-3
50. Related Content Exosomes from Bone Marrow Dendritic Cells Pulsed with Diphtheria

Toxoid Preferentially Induce Type 1 Antigen-Specific IgG Responses in Naive Recipients in the Absence of Free Antigen Ubiquitination as a Mechanism To Transport Soluble Mycobacterial and Eukaryotic Proteins to Exosomes Pregnancy-Associated Exosomes and Their Modulation of T Cell Signaling. 2009. doi:10.4049/jimmunol.182.3.1548

51. Locke JE, Zachary AA, Warren DS, et al. Proinflammatory Events Are Associated with Significant Increases in Breadth and Strength of HLA-Specific Antibody. *Am J Transplant.* 2009;9:2136-2139. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02764.x
52. Rees L, Kim JJ. HLA sensitisation: can it be prevented? doi:10.1007/s00467-014-2868-6
53. Patel R, Terasaki PI. Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *N Engl J Med.* 1969;280(14):735-739.
54. Peña JR, Fitzpatrick D, Saidman SL. Complement-Dependent Cytotoxicity Crossmatch. In: *Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ; 2013:257-283.
55. Eurotransplant Reference Laboratory. Calculadora de frecuencia de donantes. https://www.etrl.org/Virtual_PRA/Information.aspx.
56. OPTN: Organ Procurement and Transplantation Network - OPTN. <https://optn.transplant.hrsa.gov/>. Accessed April 25, 2023.
57. Zecher D, Bach C, Preiss A, et al. Analysis of Luminex-based Algorithms to Define Unacceptable HLA Antibodies in CDC-crossmatch Negative Kidney Transplant Recipients. *Transplantation.* 2018;102(6):969-977. doi:10.1097/TP.0000000000002129
58. Amico P, Hirt-Minkowski P, Hönger G, et al. Risk stratification by the virtual crossmatch: A prospective study in 233 renal transplantations. *Transpl Int.* 2011;24(6):560-569. doi:10.1111/J.1432-2277.2011.01235.X
59. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and Non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation.* 2013;95(1):19-47. doi:10.1097/TP.0b013e31827a19cc
60. Frischknecht L, Deng Y, Wehmeier C, et al. The impact of pre-transplant donor specific antibodies on the outcome of kidney transplantation – Data from the Swiss transplant cohort study. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/FIMMU.2022.1005790/FULL
61. Biemann D, Hönger G, Lutz D, Mihatsch MJ, Steiger J, Schaub S. Pretransplant risk assessment in renal allograft recipients using virtual crossmatching. *Am J Transplant.* 2007;7(3):626-632. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.01667.x
62. Allison TL. Immunosuppressive Therapy in Transplantation. 2016.

doi:10.1016/j.cnur.2015.10.008

63. Parlakpinar H, Gunata M. Transplantation and immunosuppression: a review of novel transplant-related immunosuppressant drugs. <https://doi.org/101080/0892397320211966033>. 2021;43(6):651-665. doi:10.1080/08923973.2021.1966033
64. Actor JK. Transplantation Immunology. *Introd Immunol*. 2019:133-142. doi:10.1016/b978-0-12-816572-0.00011-5
65. Wojciechowski D, Wiseman A. Long-Term Immunosuppression Management: Opportunities and Uncertainties. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2021;16(8):1264. doi:10.2215/CJN.15040920
66. Kalt DA. Overview Tacrolimus: A Review of Laboratory Detection Methods and Indications for Use. *Lab Med*. 2017;48:62-65. doi:10.1093/labmed/lmx056
67. Schinstock CA, Mannon RB, Budde K, et al. Recommended Treatment for Antibody-mediated Rejection after Kidney Transplantation: The 2019 Expert Consensus from the Transplantation Society Working Group. *Transplantation*. 2020;104(5):911-922. doi:10.1097/TP.0000000000003095
68. Loga L, Dican L, Matei HV, Constantinescu I. Relevant biomarkers of kidney allograft rejection. 2022. doi:10.25122/jml-2022-0181
69. Phillips BL, Callaghan C. The immunology of organ transplantation. *Surg (United Kingdom)*. 2017;35(7):333-340. doi:10.1016/j.mpsur.2017.04.004
70. Loupy A, Haas M, Roufosse C, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2020;20(9):2318-2331. doi:10.1111/ajt.15898
71. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, 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 Transplant*. 2018;18(2):293-307. doi:10.1111/ajt.14625
72. Quaglia M, Merlotti G, Guglielmetti G, Castellano G, Cantaluppi V. Recent Advances on Biomarkers of Early and Late Kidney Graft Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):1-34. doi:10.3390/IJMS21155404
73. Efi-Web | Standards Committee. <https://efi-web.org/committees/standards-committee>. Accessed April 30, 2023.
74. American society for histocompatibility and immunogenetics. *Standards for Accredited*

75. One Lambda. Antibody Mediated Rejection in Organ Transplantation. 2018.
76. One Lambda. *C1qScreen™ PRODUCT INSERT.*; 2019.
<https://www.onelambda.com/en/product/c1qscreen.html>.
77. Martínez-Castelao A, Górriz JL, Bover J, et al. Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Rev Nefrol Órgano Of la Soc Española Nefrol.* 2014;34(2):243-262. doi:10.3265/Nefrologia.pre2014.Feb.12455
78. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(1):182-192. doi:10.2215/CJN.00700117
79. A Role of Complement Fixing DSA in Allograft Rejection – Evaluation of the Immucor LIFECODES® C3d Detection Assay A Role of Complement Fixing DSA in Allograft Rejection – Evaluation of the Immucor LIFECODES® C3d Detection Assay. 2019.
80. Thurman JM, Panzer SE, Le Quintrec M. The Role of Complement in Antibody Mediated Transplant Rejection. *Mol Immunol.* 2019;112:240. doi:10.1016/J.MOLIMM.2019.06.002
81. Crespo M, Torio A, Mas V, et al. Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: Does C1q-fixation matter? *Transpl Immunol.* 2013;29(1-4):28-33.
doi:10.1016/j.trim.2013.07.002
82. Yell M, Muth BL, Kaufman DB, Djamali A, Ellis TM. C1q binding activity of de novo donor-specific HLA antibodies in renal transplant recipients with and without antibody-mediated rejection. *Transplantation.* 2015;99(6):1151-1155. doi:10.1097/TP.0000000000000699
83. Aubert O, Loupy A, Hidalgo L, et al. Antibody-Mediated Rejection Due to Preexisting versus De Novo Donor-Specific Antibodies in Kidney Allograft Recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(6):1912-1923. doi:10.1681/ASN.2016070797
84. Thurman JM, Panzer SE, Quintrec M Le. The role of complement in antibody mediated transplant rejection. *Mol Immunol.* 2019;112:240-246. doi:10.1016/J.MOLIMM.2019.06.002
85. Tyan DB. Application, technical issues, and interpretation of C1q for graft outcome. *Curr Opin Organ Transplant.* 2017;22(5):505-510. doi:10.1097/MOT.0000000000000454
86. Itabashi Y, Aikawa A, Muramatsu M, et al. Living-Donor Kidney Transplant With Preformed Donor-Specific Antibodies. *Exp Clin Transplant.* 2019;17(Suppl 1):43-49.
doi:10.6002/ect.MESOT2018.L42
87. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA-

- Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk. *Am J Transplant*. 2003;3(12):1488-1500. doi:10.1046/j.1600-6135.2003.00273.x
88. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med*. 2018;379(12):1150-1160. doi:10.1056/nejmra1802677
89. Lee H, Han E, Choi AR, et al. Clinical impact of complement (C1q, C3d) binding De Novo donor-specific HLA antibody in kidney transplant recipients. *PLoS One*. 2018;13(11). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0207434
90. Llorente S, Boix F, Eguia J, et al. C1q-Fixing Human Leukocyte Antigen Assay in Immunized Renal Patients: Correlation Between Luminex SAB-C1q and SAB-IgG. *Transplant Proc*. 2012;44(9):2535-2537. doi:10.1016/J.TRANSPROCEED.2012.09.084
91. Lan JH, Tinckam K. Clinical utility of complement dependent assays in kidney transplantation. *Transplantation*. 2018;102(1S):S14-S22. doi:10.1097/TP.0000000000001819
92. Zeevi A, Lunz J, Feingold B, et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *J Hear Lung Transplant*. 2013;32(1):98-105. doi:10.1016/j.healun.2012.09.021
93. Tyan DB. Application, technical issues, and interpretation of C1q for graft outcome. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017;22(5):505. doi:10.1097/MOT.0000000000000454
94. Wiebe C, Gareau AJ, Pochinco D, et al. Evaluation of C1q Status and Titer of *De Novo* Donor-Specific Antibodies as Predictors of Allograft Survival. *Am J Transplant*. 2017;17(3):703-711. doi:10.1111/ajt.14015
95. Racusen LC, Leffell MS. C1q-Binding Antibodies in Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2013;369(13):1266-1267. doi:10.1056/NEJME1309686/SUPPL_FILE/NEJME1309686_DISCLOSURES.PDF
96. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, et al. Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival. *N Engl J Med*. 2013;369(13):1215-1226. doi:10.1056/NEJMOA1302506/SUPPL_FILE/NEJMOA1302506_DISCLOSURES.PDF
97. Yell M, Muth BL, Kaufman DB, Djamali A, Ellis TM. C1q Binding Activity of De Novo Donor-specific HLA Antibodies in Renal Transplant Recipients With and Without Antibody-mediated Rejection. *Transplantation*. 2015;99(6):1151-1155. doi:10.1097/TP.0000000000000699
98. Visentin J, Vigata M, Daburon S, et al. Deciphering complement interference in anti-human

- leukocyte antigen antibody detection with flow beads assays. *Transplantation*. 2014;98(6):625-631. doi:10.1097/TP.0000000000000315
99. Lefaucheur C, Viglietti D, Hidalgo LG, et al. Complement-Activating Anti-HLA Antibodies in Kidney Transplantation: Allograft Gene Expression Profiling and Response to Treatment. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(2):620-635. doi:10.1681/ASN.2017050589
100. Lan JH, Tinckam K. Clinical Utility of Complement Dependent Assays in Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2018;102(1S Suppl 1):S14-S22. doi:10.1097/TP.0000000000001819
101. Arreola-Guerra JM, Morales-Buenrostro LE, Granados J, et al. Anti-HLA-DQ antibodies are highly and independently related to the C1q-binding capacity of HLA antibodies. *Transpl Immunol*. 2017;41:10-16. doi:10.1016/j.trim.2017.02.003
102. Freitas MCS, Rebellato LM, Ozawa M, et al. The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes. *Transplantation*. 2013;95(9):1113-1119. doi:10.1097/TP.0b013e3182888db6
103. Devos JM, Gaber AO, Knight RJ, et al. Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int*. 2012;82(5):598-604. doi:10.1038/ki.2012.190
104. Kosmoliaptsis V, Gjorgjimajkoska O, Sharples LD, et al. Impact of donor mismatches at individual HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ loci on the development of HLA-specific antibodies in patients listed for repeat renal transplantation. *Kidney Int*. 2014;86(5):1039-1048. doi:10.1038/ki.2014.106
105. Cross AR, Lion J, Loiseau P, et al. Donor Specific Antibodies are not only directed against HLA-DR: Minding your Ps and Qs. *Hum Immunol*. 2016;77(11):1092-1100. doi:10.1016/J.HUMIMM.2016.04.003
106. Willicombe M, Brookes P, Sergeant R, et al. De novo DQ donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Transplantation*. 2012;94(2):172-177. doi:10.1097/TP.0b013e3182543950
107. Iniotaki-Theodoraki AG, Boletis JN, Trigas GC, Kalogeropoulou HG, Kostakis AG, Stavropoulos-Giokas CG. Humoral immune reactivity against human leukocyte antigen (HLA)-DQ graft molecules in the early posttransplantation period. *Transplantation*. 2003;75(9):1601-1603. doi:10.1097/01.TP.0000061611.51612.09

ANEXO 1.

COPIA INTEGRAL DEL TRABAJO CIENTÍFICO PUBLICADO.

Complement Binding Anti-HLA Antibodies and the Survival of Kidney Transplantation

Claudia M. Muñoz-Herrera 1,2,3,4,* , Juan Francisco Gutiérrez-Bautista 1,3,5,* and Miguel Ángel López-Nevot 1,3,5

1 Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología III, University of Granada, 18010 Granada, Spain

2 Programa de Doctorado en Biomedicina, University of Granada, 18010 Granada, Spain

3 Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, 18014 Granada, Spain

4 Clínica Imbanaco Grupo Quirónsalud, Laboratorio Clínico, Patología y Servicio de Transfusión, Laboratorio de Inmunogenética, 760042 Cali, Colombia

5 Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), 18012 Granada, Spain

* Correspondence: claudia.munozh@gmail.com (C.M.M.-H.); juanfry@correo.ugr.es (J.F.G.-B.); Tel.: +57-310-4153949 (C.M.M.-H.); +34-629-908-060 (J.F.G.-B.)

Abstract: Background: Antibody-mediated rejection (AMR) is one of the most important challenges in the context of renal transplantation, because the binding of de novo donor-specific antibodies (dnDSA) to the kidney graft triggers the activation of the complement, which in turn leads to loss of transplant. In this context, the objective of this study was to evaluate the association between complement-fixing dnDSA antibodies and graft loss as well as the possible association between non-complement-fixing antibodies and transplanted organ survival in kidney transplant recipients. Methods: Our study included a cohort of 245 transplant patients over a 5-year period at Virgen de las Nieves University Hospital (HUVN) in Granada, Spain. Results: dnDSA was observed in 26 patients. Of these patients, 17 had non-complement-fixing dnDSA and 9 had complement-fixing dnDSA. Conclusions: Our study demonstrated a significant association between the frequency of rejection and renal graft loss and the presence of C1q-binding dnDSA. Our results show the importance of the individualization of dnDSA, classifying them according to their ability to activate the complement, and suggest that the detection of complement-binding capacity by dnDSA could be used as a prognostic marker to predict AMR outcome and graft survival in kidney transplant patients who develop dnDSA.

Keywords: AMR, antibody-mediated rejection; DSA, donor-specific antibodies; dnDSA, de novo donor-specific antibodies; complement-fixing DSA; renal transplant; kidney graft

1. Introduction

Organ transplantation is defined as the replacement of dysfunctional organs with healthy tissues or other organs. Renal transplantation remains the method of choice for patients with end-stage renal disease, because it offers better survival, better quality of life, and reduced costs compared to dialysis [1–3]. Human leukocyte antigens (HLA) are highly polymorphic molecules that must be considered for transplant matching, as they can induce a strong immune response with detrimental effects on graft survival [4]. A higher degree of HLA compatibility between the donor and recipient is better for graft survival, with a lower probability of acute rejection and sensitization of the recipient to donor HLA molecules. Therefore, better results are obtained when transplanted with an HLA-identical donor (sibling) compared to haploidentical or less-compatible donors, such as a deceased donor [5–7].

The presence of donor-specific antibodies (DSA) is a barrier to consider in renal transplantation. Sensitization against non-self HLA molecules occurs as a result of previous sensitizing events, such as pregnancy, blood transfusions, infections, and transplants. The strongest and longest-lasting degrees of immunization are related to previous transplants [8]. Therefore, it is necessary to determine anti-HLA antibodies before transplantation in order to avoid rejection of the transplanted organ.

Rejection can be classified according to when it occurs as hyperacute rejection or as acute or chronic rejection, and it can be classified by the mechanism that causes it as cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, or mixed rejection [9]. Despite the immunosuppressive therapy that accompanies transplantation, rejection still occurs in approximately 15% of patients. However, evidence has shown that when rejection episodes are diagnosed early, modulating immunosuppression therapy, either by increasing its dose or by providing additional drugs, usually yields successful results in preventing graft loss. Treatment depends upon the type and severity of the rejection [9,10].

Antibody-mediated rejection (AMR) occurs when the immune system recognizes the differences between self and foreign, primarily through the recognition of the donor's HLA molecules. AMR is currently one of the most important challenges in the context of transplantation [11-13]. The antibody-mediated immune response requires contact between an antigen and a specific antibody. This union will activate different effector mechanisms for the elimination of the foreign antigen. One of the main effector mechanisms is the classical complement pathway. The activation of the complement involves the cascading proteolysis of different serum proteins that bind to the antigen-antibody complex so that the membrane attack is carried out with the consequent elimination of the foreign [14,15]. The binding of the DSA to the renal graft triggers the activation of the complement cascade, which leads to organ damage and loss of the transplant. However, the presence of DSA, which does not have complement-binding capacity, may not lead to an immune response that induces rejection of the transplanted organ [16].

The objective of this study was to evaluate the possible involvement of complement-fixing DSAs in renal graft loss and the possible association between non-complement-fixing antibodies and renal graft survival.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

This study included 245 renal transplant patients between 2014 and 2018 at the Virgen de las Nieves University Hospital (HUVN) in Granada, Spain. The mean age of the patients was 54 years; 71% were men (n = 174), and 29% were women (n = 71) (the age of our recipients was similar to the range reported in most cases of ESRD in the general population [17]). The mean donor age was 50 years. The characteristics prior to renal transplantation are summarized in Table 1.

Patients who had the following data available were included in our study: serum creatinine (SCR) values after transplantation, anti-HLA antibody analysis, and biopsy results in cases of rejection. In addition, the patients were required to have a serum sample for complement-binding antibody analysis. DSA monitoring and biopsies were conducted on all the patients by protocol after the transplant. In the cases of the presence of dnDSA and if the biopsy showed changes that suggested rejection, the immunosuppression was modulated until the symptoms were controlled and the DSA was not detected in some cases.

All patient samples were collected according to local medical ethics regulations after informed consent was obtained from the subjects, their legal representatives, or both, according to the Declaration of Helsinki. Studies involving human participants were reviewed and approved by the ethics committee of the Portal de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía (PIEBA) of the Andalusian government (Code:0766-N-20). All patients provided consent for the publication of the study.

2.2. Determination of DSA Complement Binding Capacity: C1q Technique

In order to determine the complement binding capacity of anti-HLA antibodies, serum samples with DSA were used. The serum samples were duly labeled with patient data and the date of extraction and were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Complement binding capacity was determined using the commercial C1qScreen™ kit from One Lambda (One Lambda, Canoga Park, CA, USA). The One Lambda HLA LABScreen™ and C1qScreen™ HLA assays allow for the detection and identification of immunoglobulin G (IgG) in serum samples directed against complement-binding HLA class I and II molecules. This method is based on the specificity of antigen-antibody (Ag-Ac) binding recognized by the C1q molecule. This reaction is detected by an antibody labeled with a fluorophore, the signal of which is analyzed using a fluoroanalyzer. Subsequently, the data obtained were analyzed using HLA Fusion™ software version 4.3 (One Lambda), which allows for the specificity of the antibody to be assigned by comparing the fluorescence of each sphere with the assigned antigen [18,19]. All of the tests were performed according to the manufacturers' instructions.

Antibody positivity assignment was performed based on a mean fluorescence intensity (MFI) value of 1500 according to HUVN clinical protocols. The DSA antibody assay was tested for HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ.

2.3. Statistical Analysis

Statistical analysis of the data and presentation of the results were performed using

IBM-SPSS V.21.0 (Statistical Package for the Social Sciences) version 21.0. (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Descriptive statistics: The profile of the study population was described. The results of categorical variables were expressed as percentages, and those of quantitative variables were expressed as mean and standard deviation, including confidence intervals (95% CI) and range (minimum and maximum values).

Bivariate analysis: The X² test or two-tailed Fisher's exact test was used, when necessary, with contingency tables in order to compare the proportions between groups. In order to analyze the differences between the mean values of quantitative variables between the two groups, Student's t-test for independent samples (after analysis of equality of variance using Levene's test) or its nonparametric equivalent, the Mann-Whitney U test, was applied.

Survival analysis: Survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method. Statistical significance between the survival times was determined using the log-rank test. Differences were considered statistically significant at a corrected p-value < 0.05.

3. Results

3.1. Descriptive Analysis of the Population and Characteristics Prior to Renal Transplantation

The following pre-transplant clinical variables were analyzed in the recipients:

number of HLA incompatibilities (for HLA-A, -B, and -DR loci), percentage of sensitization (cPRA), and the presence of pre-transplant DSA and its complement binding capacity (Table 1).

Five patients had DSA at the time of transplantation. Complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDC) results were negative in all patients; therefore, they were used for transplantation. The C1q-binding capacity of DSA was determined, and the results were negative. In DSA analysis, three patients were found to have antibodies against the HLA-A locus, one against the HLA-DR and -DQ loci, and one patient against the HLA-DQ locus.

During our study, these five patients did not present with rejection events or renal graft loss. Follow-up was performed between 6 months and 4 years post transplantation (mean 2 years). In two patients whose presence of DSA persisted post-transplantation, the MFI values of DSA were <5000. The results did not show a statistically significant p-value for rejection events or renal graft loss due to the presence of pre-transplant DSA.

Table 1. Description of variables pre-renal transplantation.

		Frequency	Percentage (%)
	0	3	1.2
	1	2	0.8
	2	5	2.0
Total Incompatibilities	3	28	11.4
	4	61	24.9
	5	89	36.3

	6	57	23.3
	Total	245	100
		Frequenc y	Percentage (%)
	Negative	192	78.4
	1-50%	31	12.7
cPRA%	51-94%	12	4.9
	95-100%	10	4.1
	Total	245	100
		Frequenc y	Percentage (%)
	NO	240	98
DSA pre-transplant	YES	5	2
	Total	245	100
		Frequenc y	Percentage (%)
	NO	5	100
DSA pre-transplant complement fixers	YES	0	0
	Total	5	100

Total incompatibilities: The number of incompatibilities for HLA-A, HLA-B, and HLA-DR loci were considered (Human leukocyte antigens (HLA)). cPRA%: Percentage of calculated PRA (presence/absence of anti-HLA antibodies and their percentage of sensitization). DSA: donor-specific antibodies identified at the time of transplantation and pre-transplantation with complement binding capacity (binding to C1q).

3.2. Analysis of Post-Renal Transplant Characteristics

Analysis of the post-renal transplantation characteristics was performed by identifying the three populations in our study. The populations were classified according to the presence or absence of DSA and the complement binding capacity (Table 2). A total of 219 patients (89.4%) did not develop DSA, and 26 presented with de novo DSA (dnDSA). Of the latter, 17 patients (6.9%) had dnDSA without complement fixation and nine patients (3.7%) had dnDSA with complement fixation. Table 2 summarizes the demographic data and immunological characteristics of the three populations identified. Among the recipients who developed dnDSA, the majority (42.3%, n = 11) were against HLA-II, 34.6% (n = 9) were against HLA-I, and 23.1% (n = 8) were against both HLA-I and HLA-II.

Table 2. Characteristics according to the presence or absence of DSA and its binding capacity to C1q.

Features	Total patients	No DSA	DSA	
			Non-complement fixers	Complement fixers
Recipient	245	219	17	9
Age	53.9 ± 12.4	54.2 ± 12.4	55.0 ± 11.9	46.1 ± 10.9
Sex	174 men	158 men	11 men	5 men
	71 women	61 women	6 women	4 women
Donors				
Age*	50.4 ± 14.7	51.2 ± 14.5	43.3 ± 16.7	46.0 ± 13.3
Sex*	166 men	147 men	12 men	7 men
	68 women	61 women	5 women	2 women

Type of Donors	233 deceased	207 deceased	17 deceased	9 deceased
	12 alive	12 alive	0 alive	0 alive
Immunological data				
HLA Incompatibilities	4.6 ± 1.1	4.6 ± 1.1	4.5 ± 1.5	4.5 ± 1.1
Blood Group Recipient				
A	105	98	7	0
B	30	30	0	0
AB	6	5	0	1
O	104	86	10	8
<i>dnDSA</i>				
HLA-I	9	-	8	1
HLA-II	11	-	7	4
HLA-I and II	6	-	2	4

Summary of the three populations identified based on the presence or absence of DSA and their C1q-binding capacity. dnDSA: de novo DSA. *: incomplete data.

3.3. Rejection Events

In our cohort, 23 patients (9.4%) experienced rejection. These were classified according to the cause of origin as cellular rejection, humoral rejection, mixed rejection, or non-immunological causes of rejection, according to biopsy results. Non-immunological graft failures occurred in 10 patients (4.1%) and were associated with surgical problems (graft laceration), infections, lymphocele, or

immunosuppressant toxicity. The results were poor renal function, hemorrhagic shock, necrosis, and graft loss. Nine patients lost their grafts during the first month. The other patient lost the graft at six months due to a lymphocele. None of the patients had DSA at the time of organ rejection.

We found that only 10 patients (38.5%) had rejection events with dnDSA, whereas the remaining 13 (61.5%) were dnDSA-negative. Subsequently, we analyzed the complement-binding capacity of dnDSA and its association with rejection events in 10 patients. We found that seven patients had dnDSA with a complementary binding capacity. Three patients developed humoral-type events, and four had mixed-type events. In contrast, of the patients with dnDSA without complement binding capacity, two had humoral-type rejection events and one had a mixed-type rejection event. Our analysis showed a statistically significant association between the presence of dnDSA and the complement binding capacity and rejection events ($p = 0.009$) (Figure 1). In addition, we found two patients with dnDSA with complement-binding capacity who did not present with any rejection event at the time of this study.

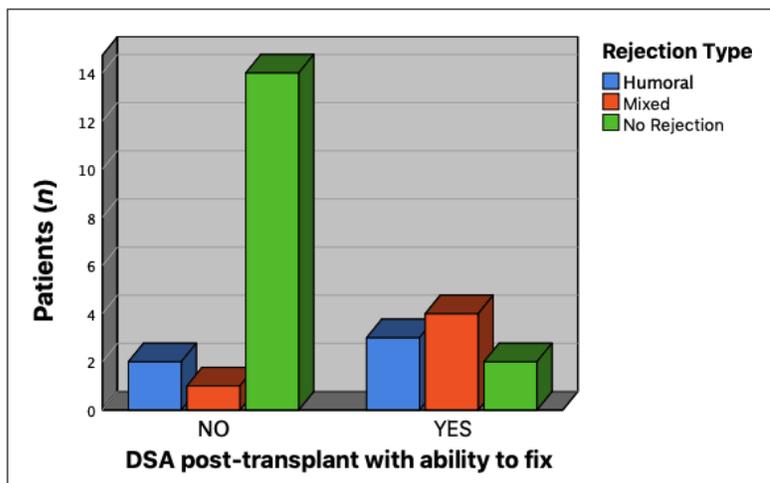


Figure 1. Association between the presence of complement-binding dnDSA and rejection events. A higher number of rejection events was observed in patients who developed C1q-binding dnDSA, with respect to those who did not bind complement ($p = 0.009$).

3.4. Renal Graft Survival Associated with the Presence of dnDSA

The median follow-up time after renal transplantation in patients without dnDSA was 17 months (range, 0–61 months). For patients with dnDSA with C1q binding capacity, it was 26 months (0–49 months), and for those with dnDSA without complement fixation, it was 17 months (0–63 months). The results showed that patients with dnDSA had shorter survival to renal transplantation than those without dnDSA ($p = 0.017$) (Figure 2).

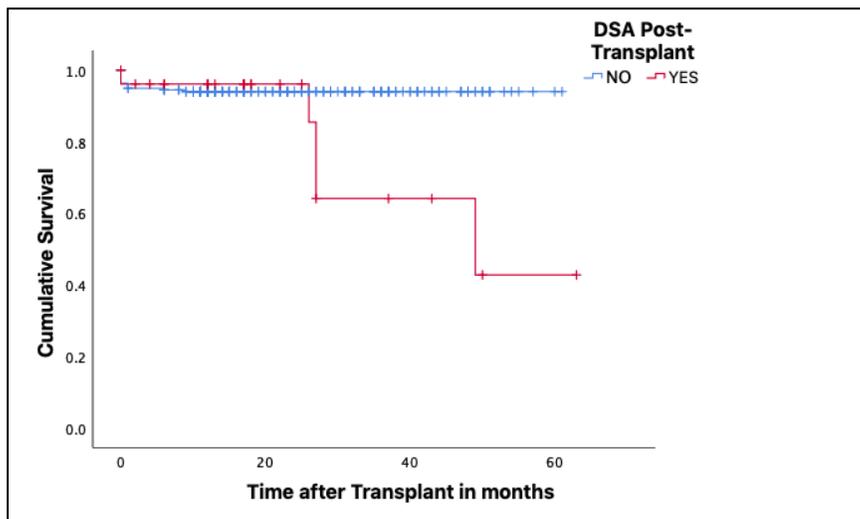


Figure 2. Kaplan-Meier curves to determine renal graft survival, according to the presence or absence of dnDSA. Lower renal graft survival is observed in patients who develop dnDSA.

When determining renal transplant survival in relation to C1q binding capacity, it was observed that patients with complement-fixing dnDSA were associated with lower renal graft survival than those with non-complement fixers ($p = 0.009$).

Finally, transplant survival was evaluated in the three populations in our study. The results showed that patients with dnDSA that did not bind to C1q and those who

did not develop dnDSA showed similar graft survival. However, individuals in the latter group presented graft loss due to non-immunological causes, which explains the differences between these two populations in the graph.

Finally, the complement-fixing dnDSA group presented the lowest survival with the highest association with the risk of graft loss ($p < 0.001$) (Figure 3).

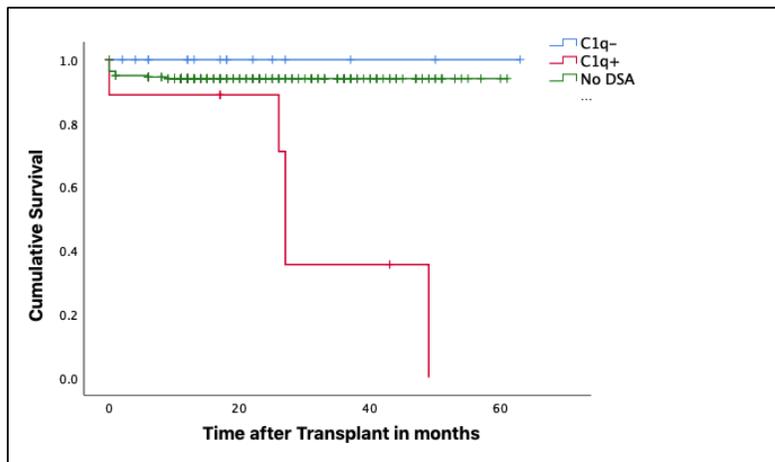


Figure 3. Kaplan-Meier curves to determine renal graft survival according to C1q-binding capacity by dnDSA. Lower renal graft survival is observed in patients who develop complement-binding dnDSA, whereas survival is similar for the other two populations.

3.5. Renal Graft Loss

Renal graft loss occurred in 18 (7.3%) patients. Ten patients lost the transplant due to non-immunological causes, three patients due to cellular rejection without the presence of dnDSA at the time of graft loss, and five patients due to immunological rejection associated with the presence of dnDSA (one patient due to humoral rejection and four due to mixed rejection). We analyzed whether the immunological events that led to transplant loss in the latter group were related to the presence of complement-binding antibodies. The results suggested the presence of C1q-binding

antibodies in all cases, with a statistically significant association between the presence of complement-fixing antibodies and renal graft loss ($p = 0.002$) (Figure 4).

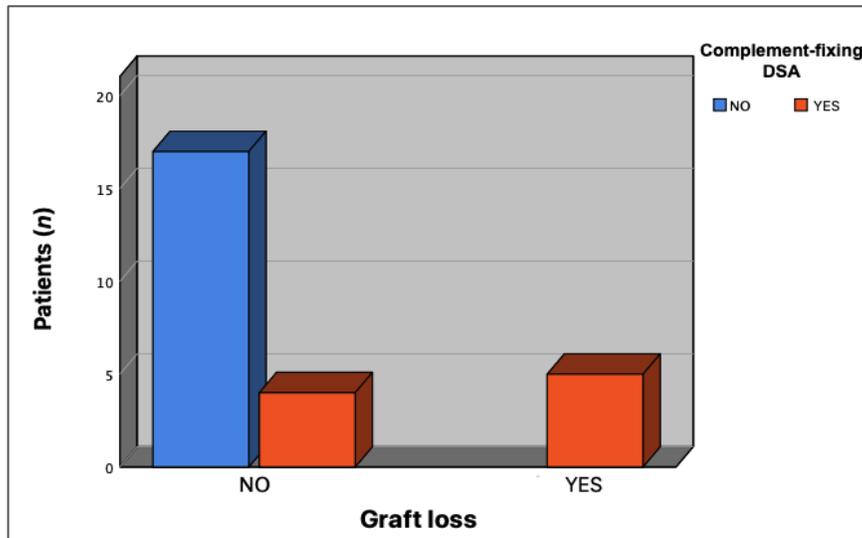


Figure 4. Association between the presence of complement-binding dnDSA and renal graft loss. Renal graft loss was observed in patients who developed C1q-binding DSA, with respect to those who did not ($p = 0.002$).

3.6. Relationship between MFI Values of dnDSA and Its C1q Binding Capacity

We performed statistical analysis in order to determine the possible association between the MFI values of post-transplantation dnDSA and their complement-binding capacity. Based on the classification model proposed by Zecher et al. [20], three categories were established to classify MFI values: MFI less than 5000, MFI between 5001–9999, and MFI greater than 10,000. We found a statistically significant association between MFI and complement fixation capacity ($p = 0.033$). Therefore, we proceeded to determine where this difference lies; in order to accomplish this, the same variables were compared in 2x2 tables, showing a statistically significant association between MFI values less than 5000 and those above 10,000 ($p = 0.017$); the rest of the associations were not statistically significant (Figure 5).

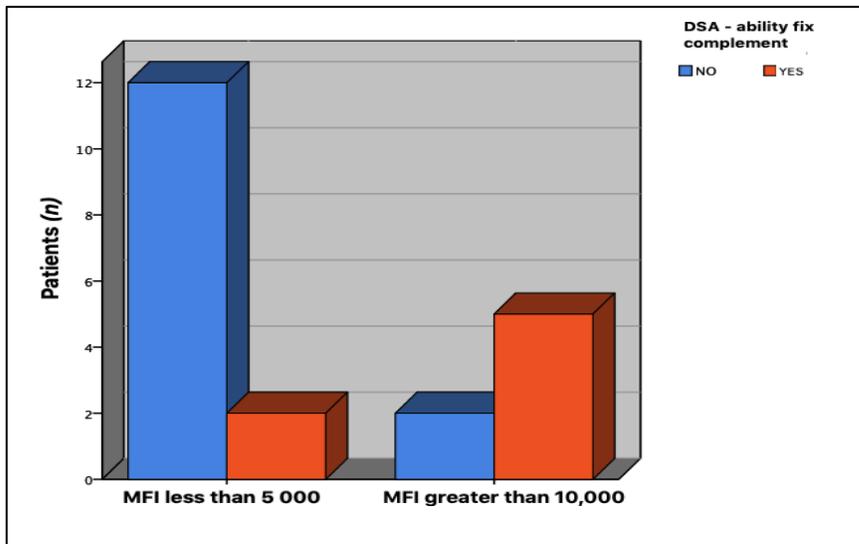


Figure 5. Association between MFI values and C1q binding capacity. Non-binding dnDSA comprise MFI values below 5000, whereas C1q-binding dnDSA are more related to MFI values above 10,000 ($p = 0.017$).

4. Discussion

AMR is one of the primary causes of renal graft loss. The main risk factor is incompatibility with donor HLA molecules owing to the development of antibodies against allogeneic HLA. Finding a good match is essential; however, given the high polymorphism of HLA molecules, it is becoming increasingly difficult to find an optimal donor. In addition, renal patients are at a high risk of sensitization events due to receiving transfusions, leading to the development of anti-HLA antibodies, which represent a barrier for the patient to be transplanted [21].

We retrospectively reviewed a cohort of 245 patients who underwent renal transplantation into the HUVN. We found that five patients showed evidence of pre-transplant DSA. However, at the time of this study, none of the patients had episodes of AMR or renal graft loss. The determination of complement fixation properties by DSA could contribute to risk measurement, as has been proposed by different authors [20,22-24]. The results of these patients demonstrated that DSA

was not able to activate complement. Therefore, these patients were less likely to develop rejection and had a positive predictive value for graft survival [20,25]. Different studies have discussed whether the presence of pre-transplant DSA is a contraindication for transplantation [22,23]. However, despite the lack of information on the role that DSA may play in pre-transplantation and renal graft survival, renal transplantation in the presence of DSA is still under debate, especially when they do not fix complement [24]. However, it is possible that the induction into an immunosuppressive regimen that these patients received, resulting in continued immunosuppression, allowed for the elimination of alloreactive T- and B-cell clones and the disappearance of pre-existing DSA. These patients were comparable with those who did not develop dnDSA. It should be noted that continuous follow-up of these patients is necessary for the early detection of DSA reappearance and its ability to activate the classical complement pathway [9,26]. Contrary to our findings, other authors have argued that the presence of DSA before transplantation is a risk factor for the development of acute AMR, poor renal function outcomes, and graft loss. Therefore, it is essential that at-risk patients undergo a good evaluation along with stricter follow-up after transplantation [21,27–29].

Our study demonstrated a significant association between the frequency of rejection events and the presence of C1q-binding dnDSA. The presence of dnDSA, which did not bind to the complement, was associated with fewer rejection events. Therefore, we found that C1q determination provides added value in the early detection of possible renal graft injury mediated by complement-binding dnDSA, which may lead to graft loss if not treated promptly. All of these associations have been widely discussed in multiple studies [30–33], confirming the importance of dnDSA categorization.

The renal graft survival assessed in our population showed similar results to the transplant survival reported for patients who developed dnDSA in different

studies[27,30,34]. In our cohort, renal survival rates at five years after transplantation were significantly decreased in patients who developed dnDSA. However, when classified according to their C1q-binding capacity, graft survival remained similar for patients without dnDSA and those with dnDSA without complement-binding capacity. In contrast, the presence of dnDSA with C1q-binding capacity was indicative of an increased risk of renal graft loss. These results correspond with those published by Loupy et al., who found an association between the risk of transplant loss and the presence of antibodies that activate the classical complement pathway [12]. Research by Tyan et al. supports this association and estimates that the presence of dnDSA can lead to loss within 1 to 2.5 years [27].

Among the recipients who developed dnDSA, 42.3% developed dnDSA only to HLA-II, 34.6% developed dnDSA only to HLA class I, and 23.1% developed antibodies against both HLA-I and HLA-II. Our data are similar to the percentages of dnDSA reported in other studies [16]. However, the association between MFI values and complement binding capacity by dnDSA agrees with that published by different authors [35,36]. This suggests that higher MFI values reflect elevated antibody titers and higher C1q binding capacity and are generally associated with an increased risk of developing AMR. Despite this association, in our study, we found that patients with C1q-binding of dnDSA with MFI greater than 10,000 had no rejection events. Similarly, we found that patients with non-C1q-binding dnDSA with MFI less than 5000 developed rejection events without graft loss. Our findings for these cases are similar to those published in several studies, which found that the association with MFI values was not equal for all dnDSA, and some could bind to C1q regardless of their MFI value [27,32,37].

Another important finding of our study was that the majority of dnDSA with C1q-binding capacity were directed against the HLA-DQ locus (7 of 9 patients). These were associated with rejection events regardless of MFI value. No associations were

found that demonstrated a significant effect from the presence of antibodies against HLA-DQ and the capacity to bind complement; however, a trend was observed that had a value close to significance ($p = 0.097$). These findings suggest that the presence of antibodies against HLA-DQ leads to a higher risk of complement activation even when MFI values are low, as reported in other investigations [33,38,39]. Different authors have published their observations on the presence of antibodies against HLA-DQ early in renal transplant rejection and the consequent development of AMR, transplant glomerulopathy, and its implication in graft survival [40–42]. Given these findings, organ allocation policies, especially those of Eurotrasplante and the Organ Procurement and Transplant Network (OPTN), have widely discussed the inclusion of the HLA-DQ match as a matching strategy in order to decrease the risk of developing de novo DSA and graft rejection. For its part, it is expected that with the reduction of the mismatch in the HLA-DQ molecule, the probability of rejection events will be significantly lower, which translates into benefits for the patient by reducing exposure to rescue immunosuppression therapies, which affect morbidity and mortality rates [43]. Based on our results, it is important to highlight the importance of searching for compatibility in the HLA-DQ locus in order to reduce the risk represented by the immunogenicity of this antigen.

Progress in the development of more sensitive techniques for the identification of dnDSA has allowed for the monitoring of transplant patients in a less-invasive way. However, the classification of dnDSA according to their complement fixation capacity could be an important step in post-transplant follow-up. Given the utility of this technique, it could predict the pathogenicity of dnDSA and allow the risk stratification of patients. It is important to recognize that much remains to be learned about the pathogenesis of dnDSA in post-transplant follow-up [30]. However, follow-up protocols could include the analysis of complement-fixing antibodies to more accurately classify these patients, especially those with stable renal function, before performing a graft biopsy [21,34].

The findings of this study support the hypothesis of the importance of the individualization of dnDSA, classifying them according to their ability to activate the classical complement pathway, risk of developing AMR events, and inducing graft loss. Therefore, the possibility of evaluating C1q binding in sensitized patients who are candidates for kidney transplantation, especially hyperimmunized patients, is a promising alternative. The studies already published, together with the data presented here, open up the possibility of being able to accept organs that would be considered “incompatible”, as a strategy to reduce mortality rates on the waiting list, and constitutes an interesting future perspective to extend this study [20,38,44].

5. Conclusions

Our results suggest that the detection of complement-binding capacity by dnDSA could be an additional prognostic marker to predict AMR outcome and graft survival in dnDSA-positive kidney transplant patients. Although our results are consistent with those previously published, the low number of renal rejection cases may be a limiting factor for this study.

References

1. Hernández, D.; Alonso-Titos, J.; Armas-Padrón, A.M.; Ruiz-Esteban, P.; Cabello, M.; López, V.; Fuentes, L.; Jironda, C.; Ros, S.; Jiménez, T.; et al. Mortality in Elderly Waiting-List Patients Versus Age-Matched Kidney Transplant Recipients: Where Is the Risk? *Kidney Blood Press. Res.* 2018, 43, 256–275. [CrossRef]
2. Kaballo, M.A.; Canney, M.; O’Kelly, P.; Williams, Y.; O’Seaghdha, C.M.; Conlon, P.J. A Comparative Analysis of Survival of Patients on Dialysis and after Kidney Transplantation. *Clin. Kidney J.* 2018, 11, 389–393. [CrossRef]
3. Kovesdy, C.P. Clinical Trials in End-Stage Renal Disease—Priorities and Challenges. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2019, 34, 1084–1089. [CrossRef]
4. Robinson, J.; Halliwell, J.; Hayhurst, J.; Flicek, P.; Parham, P.; Marsh, S. The IPD and IMGT/HLA Database: Allele Variant Databases. Available online: <http://hla.alleles.org/alleles/index.html> (accessed on 20 May 2019).
5. Edward, J. Moticka Transplantation Immunology. In *A Historical Perspective on Evidence—Based Immunology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 317–327, ISBN 978-0-12-398381-7.
6. Williams, R.C.; Opelz, G.; Weil, E.J.; McGarvey, C.J.; Chakkera, H.A. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts 2. *Transplant. Direct* 2017, 3, e152. [CrossRef]
7. Yacoub, R.; Nadkarni, G.N.; Cravedi, P.; He, J.C.; Delaney, V.B.; Kent, R.; Chauhan, K.N.; Coca, S.G.; Florman, S.S.; Heeger, P.S.; et al. Analysis of OPTN/UNOS Registry Suggests the Number of HLA Matches and Not Mismatches Is a Stronger Independent Predictor of Kidney Transplant Survival. *Kidney Int.* 2018, 93, 482–490. [CrossRef]
8. Lopes, D.; Barra, T.; Malheiro, J.; Tafulo, S.; Martins, L.; Almeida, M.; Pedroso, S.; Dias, L.; Castro Henriques, A.; Cabrita, A. Effect of Different Sensitization Events on HLA Alloimmunization in Kidney Transplantation Candidates. *Transplant. Proc.* 2015, 47, 894–897. [CrossRef]
9. Phillips, B.L.; Callaghan, C. The Immunology of Organ Transplantation. *Surgery* 2017, 35, 333–340. [CrossRef]
10. Stephen, R. Knight Ala Alasadi Marc Clancy The Immunology of Solid Organ Transplantation. *Anaesth. Intensive Care Med.* 2018, 19, 579–582. [CrossRef]
11. Puttarajappa, C.; Shapiro, R.; Tan, H.P. Antibody-Mediated Rejection in Kidney

Transplantation: A Review. *J. Transplant.* 2012,

2012, 193724. [CrossRef]

12. Loupy, A.; Lefaucheur, C.; Vernerey, D.; Prugger, C.; van Huyen, J.-P.D.; Mooney, N.; Suberbielle, C.; Frémeaux-Bacchi, V.; Méjean, A.; Desgrandchamps, F.; et al. Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival. *N. Engl. J. Med.* 2013, 369, 1215–1226. [CrossRef]

13. Prieto, F.; Cabañas, C.; Villagra, V. Monitoreo de Anticuerpos Anti-HLA En Pacientes Con Insuficiencia Renal Crónica En Lista de Espera Para Trasplante. *Rev. Nefrol. Diálisis Y Traspl.* 2016, 36, 75–81.

14. Greenspan, N.S.; Cavacini, L.A. Immunoglobulin Function. In *Clinical Immunology: Principles and Practice*; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 223–233.e1. ISBN 978-0-7020-6896-6.

15. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S.; Baker, D.L.; Baker, A. B Cell Activation and Antibody Production. In *Cellular and Molecular Immunology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018.

16. Lee, H.; Han, E.; Choi, A.R.; Ban, T.H.; Chung, B.H.; Yang, C.W.; Choi, Y.J.; Ohi, E.J. Clinical Impact of Complement (C1q, C3d) Binding de Novo Donor-Specific HLA Antibody in Kidney Transplant Recipients. *PLoS ONE* 2018, 13, e0207434. [CrossRef]

17. Martínez-Castelao, A.; Górriz, J.L.; Bover, J.; Segura-De La Morena, J.; Cebollada, J.; Escalada, J.; Esmatjes, E.; Fácila, L.; Gamarra, J.; Gràcia, S.; et al. Documento de Consenso Para La Detección y Manejo de La Enfermedad Renal Crónica. *Rev. Nefrol. Órgano Of. La Soc. Española Nefrol.* 2014, 34, 243–262. [CrossRef]

18. One Lambda, I. Product Insert: LABScreen. 2016. Available online: <https://www.veritastk.co.jp/products/pdf/E-OLI-LABScreen.pdf> (accessed on 20 May 2019).

19. One Lambda. Antibody Mediated Rejection in Organ Transplantation. 2018. Available online: https://www.thermofisher.com/onelambda/us/en/products/_jcr_content.download?document_number=TDX-MKT-0039 (accessed on 20 May 2019).

20. Zecher, D.; Bach, C.; Preiss, A.; Staudner, C.; Utpatel, K.; Evert, M.; Jung, B.; Bergler, T.; Böger, C.A.; Spriewald, B.M.; et al. Analysis of Luminex-Based Algorithms to Define Unacceptable HLA Antibodies in CDC-Crossmatch Negative Kidney Transplant Recipients. *Transplantation* 2018, 102, 969–977. [CrossRef]

21. Thurman, J.M.; Panzer, S.E.; Quintrec, M. Le The Role of Complement in Antibody Mediated

Transplant Rejection. *Mol. Immunol.*

2019, 112, 240–246. [CrossRef]

22. Zhang, R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2018, 13, 182–192. [CrossRef]

23. Malheiro, J.; Tafulo, S.; Dias, L.; Martins, L.S.; Fonseca, I.; Beirão, I.; Castro-Henriques, A.; Cabrita, A. Determining Donor-Specific Antibody C1q-Binding Ability Improves the Prediction of Antibody-Mediated Rejection in Human Leucocyte Antigen-Incompatible Kidney Transplantation. *Transpl. Int.* 2017, 30, 347–359. [CrossRef]

24. Wehmeier, C.; Amico, P.; Sidler, D.; Wirthmüller, U.; Hadaya, K.; Ferrari-Lacraz, S.; Golshayan, D.; Aubert, V.; Schnyder, A.; Sunic, K.; et al. Pre-Transplant Donor-Specific HLA Antibodies and Risk for Poor First-Year Renal Transplant Outcomes: Results from the Swiss Transplant Cohort Study. *Transpl. Int.* 2021, 34, 2755–2768. [CrossRef]

25. Crespo, M.; Torio, A.; Mas, V.; Redondo, D.; Pérez-Sáez, M.J.; Mir, M.; Faura, A.; Guerra, R.; Montes-Ares, O.; Checa, M.D.; et al. Clinical Relevance of Pretransplant Anti-HLA Donor-Specific Antibodies: Does C1q-Fixation Matter? *Transpl. Immunol.* 2013, 29, 28–33. [CrossRef]

26. Aubert, O.; Loupy, A.; Hidalgo, L.; Duong van Huyen, J.-P.; Higgins, S.; Viglietti, D.; Jouven, X.; Glotz, D.; Legendre, C.; Lefaucheur, C.; et al. Antibody-Mediated Rejection Due to Preexisting versus De Novo Donor-Specific Antibodies in Kidney Allograft Recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2017, 28, 1912–1923. [CrossRef]

27. Tyan, D.B. Application, Technical Issues, and Interpretation of C1q for Graft Outcome. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 2017, 22, 505–510. [CrossRef]

28. Itabashi, Y.; Aikawa, A.; Muramatsu, M.; Hyoudou, Y.; Shinoda, K.; Takahashi, Y.; Sakurabayashi, K.; Mizutani, T.; Oguchi, H.; Arai, T.; et al. Living-Donor Kidney Transplant With Preformed Donor-Specific Antibodies. *Exp. Clin. Transplant.* 2019, 17, 43–49. [CrossRef]

29. Gebel, H.M.; Bray, R.A.; Nickerson, P. Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA-Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk. *Am. J. Transplant.* 2003, 3, 1488–1500. [CrossRef]

30. Loupy, A.; Lefaucheur, C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N. Engl. J. Med.* 2018, 379, 1150–1160. [CrossRef]

31. Zeevi, A.; Lunz, J.; Feingold, B.; Shullo, M.; Bermudez, C.; Teuteberg, J.; Webber, S. Persistent Strong Anti-HLA Antibody at High Titer Is Complement Binding and Associated with Increased Risk of Antibody-Mediated Rejection in Heart Transplant Recipients. *J. Heart Lung Transplant.* 2013, 32,

98–105. [CrossRef]

32. Llorente, S.; Boix, F.; Eguia, J.; López, M.; Bosch, A.; Martinez, H.; Gonzalez, M.J.; López-Hernández, R.; Salgado, G.; Moya-Quiles, M.R.; et al. C1q-Fixing Human Leukocyte Antigen Assay in Immunized Renal Patients: Correlation between Luminex SAB-C1q and SAB-IgG. *Transplant. Proc.* 2012, 44, 2535–2537. [CrossRef]

33. Lan, J.H.; Tinckam, K. Clinical Utility of Complement Dependent Assays in Kidney Transplantation. *Transplantation* 2018, 102, S14–S22. [CrossRef]

34. Wiebe, C.; Gareau, A.J.; Pochinco, D.; Gibson, I.W.; Ho, J.; Birk, P.E.; Blydt-Hansen, T.; Karpinski, M.; Goldberg, A.; Storsley, L.; et al. Evaluation of C1q Status and Titer of de novo Donor-Specific Antibodies as Predictors of Allograft Survival. *Am. J. Transplant.* 2017, 17, 703–711. [CrossRef]

35. Yell, M.; Muth, B.L.; Kaufman, D.B.; Djamali, A.; Ellis, T.M. C1q Binding Activity of De Novo Donor-Specific HLA Antibodies in Renal Transplant Recipients With and Without Antibody-Mediated Rejection. *Transplantation* 2015, 99, 1151–1155. [CrossRef]

36. Visentin, J.; Vigata, M.; Daburon, S.; Contin-Bordes, C.; Fremeaux-Bacchi, V.; Dromer, C.; Billes, M.-A.; Neau-Cransac, M.; Guidicelli, G.; Taupin, J.-L. Deciphering Complement Interference in Anti-Human Leukocyte Antigen Antibody Detection with Flow Beads Assays. *Transplantation* 2014, 98, 625–631. [CrossRef]

37. Lefaucheur, C.; Viglietti, D.; Hidalgo, L.G.; Ratner, L.E.; Bagnasco, S.M.; Batal, I.; Aubert, O.; Orandi, B.J.; Oppenheimer, F.; Bestard, O.; et al. Complement-Activating Anti-HLA Antibodies in Kidney Transplantation: Allograft Gene Expression Profiling and Response to Treatment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2018, 29, 620–635. [CrossRef] [PubMed]

38. Arreola-Guerra, J.M.; Morales-Buenrostro, L.E.; Granados, J.; Castelán, N.; de Santiago, A.; Arvizu, A.; Gonzalez-Tableros, N.; López, M.; Vilatobá, M.; Alberú, J. Anti-HLA-DQ Antibodies Are Highly and Independently Related to the C1q-Binding Capacity of HLA Antibodies. *Transpl. Immunol.* 2017, 41, 10–16. [CrossRef] [PubMed]

39. Freitas, M.C.S.; Rebellato, L.M.; Ozawa, M.; Nguyen, A.; Sasaki, N.; Everly, M.; Briley, K.P.; Haisch, C.E.; Bolin, P.; Parker, K.; et al. The Role of Immunoglobulin-G Subclasses and C1q in de Novo HLA-DQ Donor-Specific Antibody Kidney Transplantation Outcomes. *Transplantation* 2013, 95, 1113–1119. [CrossRef] [PubMed]

40. Willicombe, M.; Brookes, P.; Sergeant, R.; Santos-Nunez, E.; Steggar, C.; Galliford, J.; McLean, A.; Cook, T.H.; Cairns, T.; Roufosse, C.; et al. De Novo DQ Donor-Specific Antibodies Are Associated with a Significant Risk of Antibody-Mediated Rejection and Transplant Glomerulopathy.

Transplantation 2012, 94, 172-177. [CrossRef] [PubMed]

41. Devos, J.M.; Gaber, A.O.; Knight, R.J.; Land, G.A.; Suki, W.N.; Gaber, L.W.; Patel, S.J. Donor-Specific HLA-DQ Antibodies May Contribute to Poor Graft Outcome after Renal Transplantation. *Kidney Int.* 2012, 82, 598-604. [CrossRef]

42. Iniotaki-Theodoraki, A.G.; Boletis, J.N.; Trigas, G.C.; Kalogeropoulou, H.G.; Kostakis, A.G.; Stavropoulos-Giokas, C.G. Humoral Immune Reactivity against Human Leukocyte Antigen (HLA)-DQ Graft Molecules in the Early Posttransplantation Period. *Transplantation* 2003, 75, 1601-1603. [CrossRef]

43. Tambur, A.R.; Kosmoliaptsis, V.; Claas, F.H.J.; Mannon, R.B.; Nickerson, P.; Naesens, M. Significance of HLA-DQ in Kidney Transplantation: Time to Reevaluate Human Leukocyte Antigen-Matching Priorities to Improve Transplant Outcomes? An Expert Review and Recommendations. *Kidney Int.* 2021, 100, 1012-1022. [CrossRef]

44. Okabe, Y.; Noguchi, H.; Miyamoto, K.; Kaku, K.; Tsuchimoto, A.; Masutani, K.; Nakamura, M. Preformed C1q-Binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Graft Function After Kidney Transplantation. *Transplant. Proc.* 2018, 50, 3460-3466. [CrossRef]