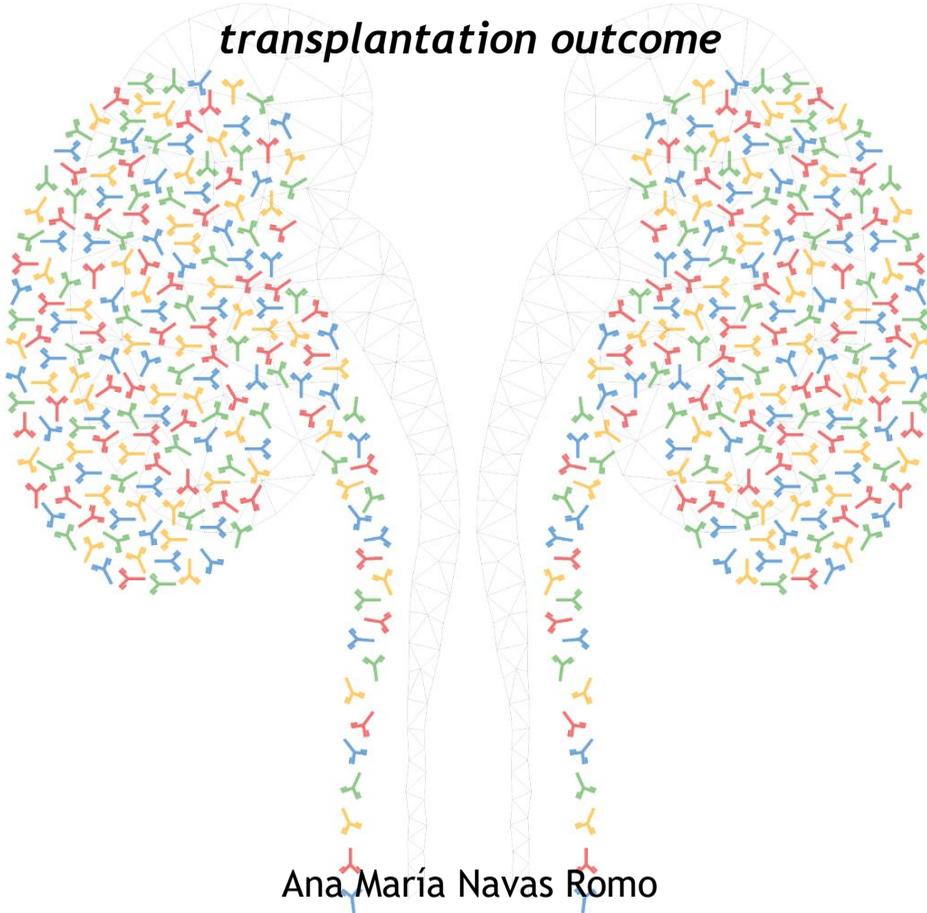




UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Marcadores inmunológicos predictores de evolución del trasplante

*Immunological biomarkers predicting
transplantation outcome*



Ana María Navas Romo

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

Directores

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

TITULO: *MARCADORES INMUNOLÓGICOS PREDICTORES DE EVOLUCIÓN
DEL TRASPLANTE*

AUTOR: *Ana María Navas Romo*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Programa de Doctorado en Biomedicina

Marcadores inmunológicos predictores de evolución del trasplante

Immunological biomarkers predicting transplantation outcome

Ana María Navas Romo

Trabajo de Tesis Doctoral dirigido por

Prof. Dr. Rafael Solana Lara

Dra. Corona Alonso Díaz

Córdoba, 31 Octubre 2019



TÍTULO DE LA TESIS:

Marcadores inmunológicos predictores de evolución del trasplante

DOCTORANDO/A:

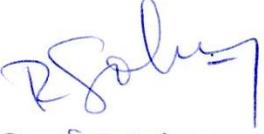
Dña. Ana María Navas Romo comenzó sus estudios de Doctorado en el año 2014 en el Programa de Doctorado en Biomedicina. La fase experimental de dicha tesis ha sido realizada en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y durante este tiempo ha ampliado el conocimiento científico, que ya había adquirido durante su periodo formativo como Especialista en Inmunología en la UGC de Inmunología del citado hospital (2012-2016) y como alumna del Máster en Investigación Biomédica Traslacional (2013-2015). Dicho conocimiento se ha centrado en el área de la Histocompatibilidad e Inmunología del Trasplante, y más concretamente, sobre el impacto que ejercen los anticuerpos anti-HLA y sus propiedades sobre el aloinjerto renal trasplantado. La doctoranda ha concluido satisfactoriamente el Programa de Formación propuesto y aceptado por la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biomedicina, habiendo sido aceptadas las Memorias de Seguimiento de las distintas anualidades. Asimismo, la doctoranda ha aprendido a diseñar y desarrollar la metodología de trabajo de un proyecto de investigación traslacional y transmitir el resultado de su investigación a la comunidad científica. Los resultados obtenidos del trabajo de tesis doctoral han sido publicados en un artículo original titulado *Characterization of the C1q-binding ability and the IgG1-4 subclass profile of preformed anti-HLA antibodies by solid phase assays* por la revista *Frontiers in Immunology* (Q1) y han sido presentados en diferentes congresos de ámbito nacional e internacional.

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

Córdoba, 15 de Octubre de 2019

Firma del/de los director/es


Fdo.: DRA ALONSO


Fdo.: DR. SOLANA

La investigación presentada en esta Tesis Doctoral se ha realizado en la UGC de Inmunología y Alergia del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, en colaboración con el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) y el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección del Prof. Dr. Rafael Solana Lara y la Dra. Corona Alonso Díaz.



« La vie n'est facile pour aucun de nous. Mais quoi, il faut avoir de la persévérance, et surtout de la confiance en soi. Il faut croire que l'on est doué pour quelque chose, et que, cette chose, il faut l'atteindre coûte que coûte »

Marie Skłodowska Curie

Varsovia, Polonia 1867 - Passy, Francia 1934

Premio Nobel de Física en 1903.

Premio Nobel de Química en 1911.

Agradecimientos

Muchos son los que me han apoyado (y soportado) durante este arduo, lento y larguísimo camino, que, por fin, aunque parecía que no, llega ahora a su fin. Estas escuetas palabras son para ellos.

Doctora Alonso y Profesor Solana, mis mentores y guías. Nunca dejaron de confiar en mis posibilidades y siempre estuvieron ahí para sacarme de apuros.

Profesionales de la UGC de Inmunología. Especial mención a Rafaela Obrero, mi amiga y confidente. Gracias Rafaela, por tus horas pipeteando y escuchando. Doctora Jurado, la Jefa, que nos da carta blanca para inventar, idear, innovar e implementar y Paula y Antonio, aire fresco. Y Profesionales de la UGC de Nefrología. Doctora Agüera y Doctor Rodríguez-Benot, gracias por vuestro conocimiento y dedicación.

Gracias a cada uno de mis amigos de siempre (Ana, Lourdes, Irene, Cristina, Nacho, Rafa y Pablo), que aguantaron el: “Hoy no puedo, que estoy con la tesis” y estuvieron ahí para decirme: “Venga, que ya queda poco” y “Ole tú”, cuando por fin terminé. Pablo, gracias por tu creatividad. Y nuevos amigos. Carmen, nadie como tú entiende mi montaña rusa.

Mi familia. Ellos son los incondicionales. Los que te ven llorar y te levantan, los que te miman y alaban tu progreso, por mínimo que sea, los que están siempre ahí, en silencio, pero están, para cuándo, cómo y dónde los necesites, sin pedir explicación alguna. Gracias Mami y Papito. Gracias Chico y Cuñada... Y mi familia política. Comprensivos con las ausencias y cariñosos siempre.

Y gracias a ti. Mi media langosta. Este trabajo es también tuyo. Formamos un buen equipo, ¿no crees? El azar te puso en mi camino, hace ya más de seis años. Desde entonces hemos compartido alegrías y tristezas, frustraciones, enfados, satisfacciones, pero, sobre todo, muchas, muchas, muchas horas de guardia. Gracias por aguantarme. Gracias por ayudarme. Gracias por quererme.



Índice

Índice

Resumen	19
Introducción	35
Breve Historia del Trasplante.....	37
El complejo mayor de histocompatibilidad: la gran barrera.....	52
La biología de los anticuerpos	58
El complemento y la vía clásica y su implicación en el trasplante	64
Las técnicas de detección	67
Hipótesis	81
Objetivos.....	85
Materiales y Métodos.....	89
Estudio de las características de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida	91
<i>Muestras de suero de la cohorte de estudio.....</i>	91
<i>Detección y caracterización de los anticuerpos anti-HLA mediante el ensayo estandarizado SAB-panIgG: suero neto y diluido</i>	92
<i>Detección y caracterización de los anticuerpos anti-HLA por el ensayo estandarizado SAB-panIgG: pre-tratamiento con calor y EDTA</i>	93
<i>Caracterización de la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA por el ensayo estandarizado SAB-C1q</i>	94
<i>Ensayo IgG1-4 SAB-subclass para determinar el perfil de subclases.....</i>	94
<i>Análisis estadístico</i>	95
Estudio de la evolución del aloinjerto renal trasplantado según las propiedades de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida	97
<i>Selección de pacientes y diseño del estudio.....</i>	97
<i>Detección y caracterización de los anticuerpos anti-HLA antes y después del trasplante</i>	98

<i>Función del aloinjerto renal</i>	99
<i>Análisis estadístico</i>	99
Resultados.....	103
Estudio de las características de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida	105
<i>Análisis de los anticuerpos anti-HLA panIgG en las muestras de suero neto y diluido 1:16</i>	105
<i>Análisis de la capacidad de unir C1q: efecto de la dilución 1:16, pre-tratamiento con EDTA y calor</i>	107
<i>Anticuerpos anti-HLA: subclases IgG1-4</i>	110
<i>Perfil de subclases de IgG, fuerza y reactividad C1q de los anticuerpos anti-HLA</i>	113
<i>Relación entre la fuerza de la IgG1 y la capacidad de unir C1q según locus HLA</i>	117
Estudio de la evolución del aloinjerto renal trasplantado según las propiedades de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida	119
<i>Características de los pacientes</i>	119
<i>Estatus de DSA antes y después del trasplante</i>	121
<i>Aparición de DSA de novo</i>	122
<i>Función del aloinjerto renal</i>	126
<i>Eventos de rechazo del aloinjerto renal</i>	128
<i>Supervivencia del aloinjerto renal</i>	129
Discusión.....	133
Conclusiones	161
Estudio de las características de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida	163
<i>Conclusiones</i>	163

Estudio de la evolución del aloinjerto renal trasplantado según las propiedades de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida	165
<i>Conclusiones</i>	165
Conclusión final	167
Glosario de abreviaturas.....	173
Glosario de figuras.....	175
Glosario de tablas	181
Referencias	183
Anexos.....	205
ANEXO 1: PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA: CRIBADO (MIXED I/II) Y ESPECIFICIDADES (SAB)	207
ANEXO 2: PROCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA FIJADORES DE C1q EN SUERO (SAB-C1q ASSAY)	210
ANEXO 3: PRE-TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS: DILUCIÓN, CALOR Y EDTA.....	212
ANEXO 4: PREPARACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-IgG1-4.....	214
Producción científica derivada de la tesis	217



Resumen

Antecedentes. La alorrespuesta humoral, particularmente la mediada por la presencia de anticuerpos frente a los antígenos leucocitarios humanos (HLA) del aloinjerto, se asocia a un incremento en la prevalencia de rechazo y a una reducción en la supervivencia del trasplante. La mayor sensibilidad de los ensayos de fase sólida, basados en el empleo de microesferas magnéticas recubiertas con un único antígeno HLA (*single antigen beads* o SAB), los consolidó como técnica gold-estándar para identificar estos anticuerpos anti-HLA, garantizando un mayor éxito en los programas de trasplante de órgano sólido. La intensidad de fluorescencia media (MFI) proporcionada por el ensayo estandarizado (SAB-panIgG) es el valor que se usa habitualmente para estratificar el riesgo inmunológico, asumiendo que es una estimación semicuantitativa fiable del nivel de anticuerpos circulantes. Sin embargo, este valor se ve frecuentemente afectado por ciertos efectos inhibitorios, que enmascaran la concentración real a la que se encuentra el anticuerpo en sangre. Más allá del valor MFI, ciertas características intrínsecas, como su capacidad para activar la cascada del complemento (SAB-C1q) o el perfil de subclases de IgG1-4 que lo conforma (SAB-subclass), han sido estudiadas con el objetivo de elucidar sus propiedades funcionales y definir de forma más precisa la relevancia clínica de los anticuerpos, usados como biomarcadores de la evolución del trasplante. No obstante, todavía existen cuestiones por resolver.

Objetivo. El objetivo de este trabajo de tesis doctoral fue esclarecer la relación entre las diferentes propiedades de los anticuerpos anti-HLA identificables por los métodos de detección disponibles (valor MFI, capacidad de activar la cascada del complemento y perfil de subclases de IgG1-4) y evaluar prospectivamente el impacto de dichas propiedades sobre la evolución del aloinjerto renal trasplantado.

Métodos. Para estudiar la relación entre las diferentes propiedades de los anticuerpos anti-HLA utilizadas en la estratificación del riesgo inmunológico, se analizaron las

muestras de suero de 20 pacientes HLA-sensibilizados en lista de espera de trasplante renal, utilizando los ensayos de fase sólida disponibles: SAB-panIgG (para detectar y definir las especificidades de anticuerpos anti-HLA panIgG), SAB-subclass (para identificar la presencia de subclases IgG1-4 que componen una determinada especificidad de anticuerpo anti-HLA) y SAB-C1q (para definir los anticuerpos capaces de fijar C1q, el primer componente de la cascada del complemento humano por la vía clásica). Los ensayos SAB-panIgG y SAB-subclass se realizaron sobre muestras de suero neto y previamente diluido 1:16. Además, en el ensayo SAB-panIgG, se evaluaron los pre-tratamientos con calor (56 °C durante 30 minutos) y EDTA (25 mM) como métodos para eliminar el efecto inhibitorio. Por otra parte, para estudiar el impacto de las propiedades de los anticuerpos anti-HLA, se examinó la función, ocurrencia de eventos de rechazo y supervivencia temprana del aloinjerto renal en una cohorte de 14 pacientes hiperinmunizados trasplantados con DSA preformados no fijadores de C1q (DSA+), en relación a una cohorte control de 58 pacientes trasplantados con anticuerpos anti-HLA preformados no específicos de donante (DSA-). Asimismo, se exploraron los cambios producidos en el perfil del DSA, así como en sus propiedades intrínsecas (valor MFI, capacidad de activar la cascada del complemento y perfil de subclases IgG1-4).

Resultados. Al analizar las muestras de suero de los 20 pacientes en lista de espera de trasplante, se identificaron 1.285 anticuerpos anti-HLA como positivos, 473 (36,8%) de los cuales resultaron ser fijadores de C1q. La dilución de las muestras de suero aumentó la correlación entre la fuerza de los anticuerpos, estimada como el valor MFI, y su capacidad de unir C1q ($r_{\text{neto}} = 0,248$ vs. $r_{\text{diluido}} = 0,817$). Los pre-tratamientos con calor y EDTA también aumentaron dicha correlación ($r_{\text{calor}} = 0,699$ y $r_{\text{EDTA}} = 0,656$), si bien, ésta no fue tan elevada como la obtenida tras la dilución. El ensayo SAB-subclass reveló al menos una subclase de IgG1-4 en 1.012 (78,8%) de los anticuerpos positivos predefinidos en el ensayo SAB-panIgG. Las subclases con fuerte capacidad de activar complemento, principalmente

IgG1, fueron particularmente frecuentes (98,9%) y, de hecho, no se encontraron diferencias entre anticuerpos C1q-positivos y C1q-negativos en relación a su presencia (99,4 vs. 98,5%; $p = 0,193$). Por el contrario, las subclases incapaces o débilmente capaces de activar el complemento (IgG4/IgG2) se detectaron con más frecuencia en anticuerpos fijadores de C1q (78,9 vs. 38,6%; $p < 0,001$). La correlación entre la capacidad de unir C1q y la fuerza de la subclase IgG1 resultó ser fuerte ($r_{\text{IgG1}} = 0,796$). Aunque menor, la correlación entre la fuerza de la subclase IgG2 y la capacidad de unir C1q también resultó ser fuerte ($r_{\text{IgG2}} = 0,758$), estando ambas subclases estrechamente relacionadas ($r_{\text{IgG1-IgG2}} = 0,817$). No se encontró ninguna correlación entre la capacidad de unir C1q y la fuerza de las subclases IgG3 e IgG4.

Por otra parte, en relación al análisis de las muestras de suero de los 14 pacientes trasplantados con DSA preformados no fijadores de C1q (DSA+), se observó que el valor MFI del DSA disminuyó significativamente en el post-trasplante ($4.467,28 \pm 2.052,95$ vs. $2.030,25 \pm 1.979,36$; $p = 0,002$) en 12 (85,7%) de los pacientes, mientras que en 2 (14,3%) de ellos aumentó. Ningún DSA modificó su estatus C1q. El valor MFI de las subclases del DSA también disminuyó significativamente, excepto el de la subclase IgG3, que permaneció invariable (IgG1: $5.443,36 \pm 9.033,25$ vs. $1.488,91 \pm 2.035,98$; $p = 0,028$; IgG2: $752,34 \pm 1.958,23$ vs. $17,24 \pm 15,04$; $p = 0,022$; IgG3: $88,50 \pm 215,23$ vs. $91,93 \pm 140,22$; $p = 0,386$ e IgG4: $257,89 \pm 612,41$ vs. $47,66 \pm 63,39$; $p = 0,037$). La proporción de pacientes que desarrollaron DSA *de novo* fue similar en el grupo DSA+ con respecto al grupo DSA- (7,1 vs. 5,2%; $p = 1,000$). Los valores de creatinina sérica (mg/dL), filtrado glomerular ($\text{mL}/\text{min}/\text{m}^2$), proteínas en orina (mg/dL) y cociente creatinina/proteínas en orina (mg/mg) tampoco fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$) en ninguno de los intervalos de tiempo analizados (15, 30, 90, 180 y 365 días post-trasplante). En el grupo DSA-, una proporción significativamente mayor de pacientes fue diagnosticada de rechazo celular (TCMR; 0 vs. 41,7%; $p = 0,035$), mientras que hubo una clara tendencia en la

proporción de biopsias con depósitos de C4d en el grupo DSA+ (75,0 vs. 33,3%; $p = 0,096$). No se encontraron diferencias en relación a la ocurrencia de eventos de TCMR con componente humoral (62,5 vs. 33,3%; $p = 0,219$) ni de rechazo mediado por anticuerpos sin componente celular (ABMR; 12,5 vs. 8,3; $p = 1,000$). La supervivencia del aloinjerto renal evaluada hasta el final del periodo de seguimiento fue similar entre los dos grupos (86,7 vs. 93,2%; $p = 0,329$).

Conclusiones. Las diferentes propiedades de los anticuerpos anti-HLA utilizadas para definir su potencial patológico (valor MFI, capacidad de unir C1q y tipo de subclase IgG1-4 circulante), parecen estar relacionadas, aunque de una forma distinta a la que en un principio cabría esperar. Así, un perfil particular de subclases de IgG (IgG1/IgG3 o IgG2/IgG4) en sí mismo no determina la capacidad de unir complemento de un anticuerpo anti-HLA, pues las primeras (IgG1/IgG3), que son potentes activadoras del complemento, están presentes tanto en anticuerpos C1q-positivos como C1q-negativos y las segundas (IgG2/IgG4) son, paradójicamente, más frecuentes en anticuerpos C1q-positivos. Es la fuerza (MFI) de las subclases que componen un anticuerpo, principalmente de la ubicua IgG1, que habitualmente aparece combinada con IgG2, la que mejor se correlaciona con la capacidad de unir C1q. Dicha fuerza (MFI) real del anticuerpo se estima con mayor exactitud al analizar las muestras de suero previamente diluidas, condición que permite evitar el denominado efecto prozona, un artefacto común en pacientes altamente HLA-sensibilizados. Bajo un contexto inmunosupresor, en el post-trasplante, el valor MFI tanto del DSA como de sus subclases particulares disminuye, mientras que su capacidad de unir C1q, un demostrado biomarcador de peor pronóstico, suele permanecer invariable. A pesar de la incuestionable interacción del DSA con el endotelio, evidenciada por la presencia de depósitos de C4d, la función y supervivencia tempranas del aloinjerto renal de pacientes trasplantados con DSA preformados no fijadores de C1q es similar con respecto a la de pacientes trasplantados sin DSA. Los datos de una funcionalidad y

supervivencia renal similares unidos a la invariabilidad en las propiedades funcionales del DSA asociadas a su potencial patológico (principalmente su capacidad de unir C1q), durante el primer año de seguimiento, sugieren que el trasplante renal en presencia de DSA preformados no fijadores de C1q podría ser factible en aquellos pacientes altamente sensibilizados con pocas opciones de trasplante.



Abstract

Background. Humoral alloresponse, particularly that mediated by the presence of antibodies against allograft human leukocyte antigens (HLA), is associated with an increased prevalence of rejection and a reduced transplant survival. The higher sensitivity of solid phase assays, based on magnetic microbeads coated with single HLA antigens (*single antigen beads* or SAB), consolidated them as the gold-standard method to identify these anti-HLA antibodies, ensuring a greater success in solid-organ allograft allocation programs. Mean fluorescence intensity (MFI) value provided by the standardized assay (SAB-panIgG) is regularly used to stratify the immunological risk, assuming it as a reliable semiquantitative estimation of the circulating antibody-level. However, this value is often affected by several inhibitory effects, which mask the real concentration of antibodies in blood. Beyond MFI, certain intrinsic characteristics, such as the complement-binding ability (SAB-C1q) or the IgG1-4 subclass profile comprising a particular specificity (SAB-subclass), have been examined to clarify their functional properties and more accurately define the clinical relevance of antibodies, used as biomarkers of transplant outcome. However, there are still unresolved issues.

Aim. The aim of this study was to elucidate the relationship between the different properties of anti-HLA antibodies detectable with the available assays (the MFI value, the ability to activate the complement cascade and the IgG1-4 subclass profile) and prospectively evaluate the impact of those properties on kidney transplanted allograft outcome.

Methods. In order to study the relationship between different anti-HLA antibody properties used to stratify the immunological risk, serum-samples from 20 HLA-sensitized patients awaiting kidney transplantation were analyzed by the available solid-phase assays: SAB-panIgG (to detect and define the specificities of panIgG anti-HLA antibodies), SAB-subclass (to identify the presence of IgG1-4 subclasses comprising a particular anti-

HLA antibody specificity) and SAB-C1q (to define those antibodies capable of binding C1q, the first component of human complement classical pathway). SAB-panIgG and SAB-subclass were performed on neat and 1:16 pre-diluted serum-samples. Additionally, in SAB-panIgG, heat (56 °C for 30 minutes) and EDTA (25 mM) pre-treatments were evaluated as methods to avoid the inhibitory effect. Furthermore, in order to study the impact of anti-HLA antibody properties, allograft function, the occurrence of rejection events and early allograft survival rate were evaluated in a cohort of 14 highly-sensitized transplanted patients with preformed non-C1q-binding DSA (DSA+) and contrasted with a control cohort of 58 transplanted patients with preformed non-DSA anti-HLA antibodies (DSA-). Changes produced in the profile and in the intrinsic properties (the MFI value, the ability to activate the complement cascade and the IgG1-4 subclass profile) of the DSA were also explored.

Results. When analyzing serum samples belonging to the 20 patients awaiting kidney transplantation, a total of 1,285 anti-HLA antibodies were identified as positive, 473 (36.8%) of which were C1q-binding. Serum-dilution enhanced the correlation between the antibody-strength, measured as the MFI and the C1q-binding ability ($r_{\text{neat}} = 0.248$ vs. $r_{\text{diluted}} = 0.817$). Even though the heat and EDTA pre-treatments also improved that correlation ($r_{\text{heat}} = 0,699$ y $r_{\text{EDTA}} = 0,656$), it was not as high as that obtained after serum-dilution. SAB-subclass assay revealed at least one IgG1-4 subclass in the 1,012 (78.8%) positive antibody-specificities predefined by SAB-panIgG. Strong complement-binding subclasses, mainly IgG1, were particularly frequent (98.9%) and no differences were found between C1q-positive and C1q-negative antibodies regarding their presence (99.4% vs. 98.5%; $p=0.193$). In contrast, non- or weak C1q-binding subclasses (IgG4/IgG2) were more commonly detected in C1q-binding antibodies (78.9% vs. 38.6%; $p < 0.001$). Interestingly, a strong association was found between the C1q-binding ability and the IgG1 strength ($r_{\text{IgG1dil}} = 0.796$). Though lower, the correlation between the IgG2 strength and the C1q-

binding ability was also strong ($r_{\text{IgG2dil}} = 0.758$), being both subclasses closely related ($r_{\text{IgG1-IgG2}} = 0.817$). No correlation was found with the C1q-binding ability and the strength of IgG3/IgG4 subclasses.

Furthermore, regarding the analysis of serum samples belonging to the 14 patients transplanted with preformed non-C1q-binding DSA (DSA+), it was observed that in 12 (85.7%) patients, the DSA MFI value significantly decreased after transplantation ($4,467.28 \pm 2,052.95$ vs. $2,030.25 \pm 1,979.36$; $p = 0.002$), whereas in 2 (14.3%) of them it increased. No DSA changed their C1q-binding status. The MFI value of IgG-DSA subclasses significantly decreased as well, except that of the IgG3, which remained invariable (IgG1: $5,443.36 \pm 9,033.25$ vs. $1,488.91 \pm 2,035.98$; $p = 0.028$; IgG2: $752.34 \pm 1,958.23$ vs. 17.24 ± 15.04 ; $p = 0.022$; IgG3: 88.50 ± 215.23 vs. 91.93 ± 140.22 ; $p = 0.386$ and IgG4: 257.89 ± 612.41 vs. 47.66 ± 63.39 ; $p = 0.037$). The proportion of patients who developed *de novo* DSA was similar in the DSA+ with regard to the DSA- group (7.1 vs. 5.2%; $p = 1.000$). Neither the creatinine serum level (mg/dL), glomerular filtration rate (mL/min/m²), urine protein level (mg/dL) nor the urine creatinine/protein ratio (mg/mg) were significantly different ($p < 0.05$) between groups at any point throughout the follow-up time (15, 30, 90, 180 and 365 days after transplantation). While a significantly higher proportion of patients in the DSA- group were diagnosed with T-cell mediated rejection (TCMR; 0 vs. 41.7%; $p = 0.035$), a clear trend was found in the proportion of biopsies with C4d staining in the DSA+ group (75.0 vs. 33.3%; $p = 0.096$). No significant differences were found in the occurrence of TCMR with humoral component (62.5 vs. 33.3%; $p = 0.219$) nor in the occurrence of antibody-mediated rejection without cellular component (ABMR; 12.5 vs. 8.3; $p = 1.000$). Early kidney allograft survival until the end of the follow-up time was similar between both groups (85.7 vs. 93.2%; $p = 0.329$).

Conclusions. The different properties of anti-HLA antibodies used to define their pathological potential (the MFI value, the ability to bind C1q and the circulating IgG1-4 subclass profile) seem to be related, albeit in a distinct manner as it initially could be expected. Thus, a particular profile of IgG subclasses (IgG1/IgG3 or IgG2/IgG4) itself does not determine at all the ability to bind complement of anti-HLA antibodies, given that the first (IgG1/IgG3), which are potent complement activators, are present both in C1q-positive and C1q-negative antibodies and the second (IgG2/IgG4) are, paradoxically, more frequent in C1q-positive antibodies. It is the subclass strength (MFI), mainly that of the ubiquitous IgG1, which usually appears combined with IgG2, that best correlates with the ability to bind C1q. That real strength (MFI) is more exactly estimated when analyzing diluted serum-samples, which allows to avoid the prozone effect, a common artifact in highly HLA-sensitized patients. Under an immunosuppressant context, the MFI value of the DSA and the particular IgG subclasses comprising it decreases after transplantation, while its C1q-binding ability, a proven worse prognosis biomarker, uses to remain invariable. Despite the undeniable interaction between the DSA and the kidney endothelium, evinced by the presence of C4d staining, early allograft function and survival rate of patients transplanted with preformed non-C1q-binding DSA is similar with respect to those of patients transplanted without DSA. The similar functionality and renal survival together with the invariability of DSA functional properties associated with their pathological potential (mainly the ability to bind C1q), during the first year of follow-up, suggest that kidney transplantation with preformed non-C1q-binding DSA could be feasible in those highly-sensitized patients with scarce transplantation recourses.



Introducción

Breve Historia del Trasplante

La idea de curar mediante la sustitución aquellos órganos o tejidos enfermos por otros sanos de la misma naturaleza, existe desde hace milenios. En importantes obras del arte sacro se escenifica el milagro de San Cosme y San Damián, médicos cristianos del siglo III que logran con éxito sustituir la pierna gangrenada de un enfermo por la pierna sana de un esclavo difunto (Figura 1). La representación del inverosímil trasplante, obrado según la fe cristiana a través del milagro, nos sitúa en perspectiva ante el hecho de que, al menos desde un punto de vista conceptual, el trasplante como procedimiento de sanación tiene muchos siglos de historia (Figura 2).



Figura 1. *Milagros de los santos médicos Cosme y Damián.* Atribuida a Fernando del Rincón. Hacia 1510. Óleo sobre tabla, 188 x 155 cm. Se representan dos milagros de estos gemelos que difundieron la medicina y el cristianismo: la reposición de una pierna gangrenada tomando una sana de un difunto, y la extracción de una serpiente de la boca de un segador. Museo Nacional del Prado.

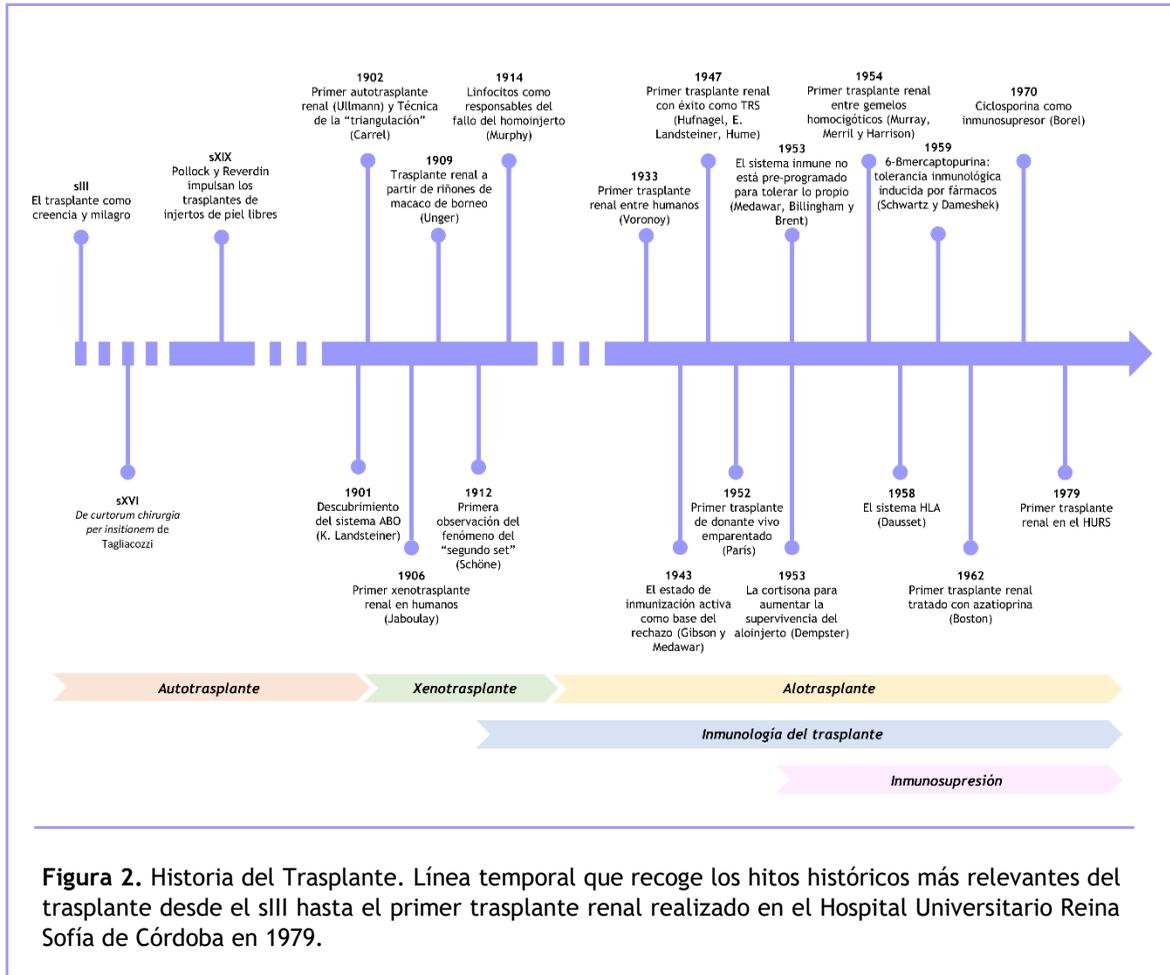


Figura 2. Historia del Trasplante. Línea temporal que recoge los hitos históricos más relevantes del trasplante desde el sIII hasta el primer trasplante renal realizado en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba en 1979.

Milagros, mitos y leyendas al margen, en Asia y Europa las primeras formas de trasplante fueron impulsadas probablemente, por la común práctica de cruentas formas de tortura. Desde esta perspectiva, el trasplante (de piel) surgió como procedimiento necesario para reconstruir zonas mutiladas del cuerpo, como narices u orejas, a fin de dignificar la imagen y mitigar el sufrimiento de la humillada víctima (1). En la Europa del siglo XVI, médicos renacentistas, pioneros de la cirugía plástica, aplicaban con éxito

técnicas de reconstrucción nasal basadas en el trasplante de colgajos de piel autólogos, si bien procedimientos similares se venían practicando ya en la India desde hacía varios siglos antes (1, 2). De los más célebres cirujanos europeos de la época, cabe destacar a Gaspare Tagliacozzi (Bologna 1546-1599), considerado padre de la rinoplastia y autor de "*De curtorum chirurgia per insitionem*", tratado quirúrgico publicado en 1597 por el que obtuvo un enorme reconocimiento en toda Europa. En su obra Tagliacozzi describe el proceso de reconstrucción nasal utilizando colgajos de piel obtenidos de la parte inferior del propio brazo del paciente y desarrolla un sistema de inmovilización mientras el colgajo trasplantado se asienta sobre su nueva ubicación (Figura 3) (1).

Figura 3. Ilustración original incluida en el *De curtorum chirurgia per insitionem* de Gaspare Tagliacozzi (1597), mostrando el "Método Italiano" para la reconstrucción nasal total.



En el siglo XIX, los trasplantes de injertos de piel libres, impulsados por el cirujano suizo Jacques-Louis Reverdin (1842-1929) y el británico George Pollock (1897-1917), comienzan a realizarse con éxito para cubrir quemaduras, úlceras y heridas abiertas. Reverdin, padre del injerto libre de piel, introdujo un importante avance técnico cuando

aún era estudiante, al utilizar injertos de piel delgados de pequeña área ("injertos de pellizco"), en lugar de los grandes y gruesos tomados hasta la fecha, donde la grasa subcutánea y el resto de tejidos adyacentes impedirían la correcta revascularización de la piel implantada (1-3). George Pollock popularizó en Inglaterra el procedimiento de Reverdin, siendo el primero en utilizar injertos de piel para cubrir heridas provocadas por quemaduras; su primera paciente, una niña de 8 años que había sufrido quemaduras severas en los muslos tras incendiarse su vestido (1). Curiosamente ninguno de ellos ni de otros muchos contemporáneos, entusiastas del trasplante de piel, parecieron intuir que el éxito o fracaso del procedimiento, más allá de aspectos técnicos, podría tener una base fisiológica.

Efectivamente, durante esa época, se utilizaban en el procedimiento tanto injertos de piel autólogos (procedentes del mismo individuo), como heterólogos (provenientes de donantes ajenos) asumiendo indiferencias en la probabilidad de éxito. En retrospectiva, algunos autores dudan incluso del éxito afirmado por Reverdin, al menos del éxito completo, dado que afirmó haber utilizado injertos de piel provenientes de su propio brazo para sanar la herida de un paciente sin describir fenómeno de rechazo alguno (1). Por su parte Pollock, en un informe que fue completamente ignorado, describió cómo en un mismo paciente mientras los autoinjertos se mantenían, los homoinjertos de piel procedentes de él y de otros donantes acabaron fallando (2). Es muy posible que la falta de rigor en la observación motivara que el fracaso en el procedimiento y su asociación implícita con la naturaleza del implante pasase inadvertido durante décadas y no fue sino hasta bien entrado el siglo XX, en el que se establecen las bases inmunológicas del rechazo, cuando hay un consenso unánime sobre la mayor probabilidad del fracaso del injerto que proviene de otro individuo.

Si el éxito en el trasplante de piel libre fue debido, en gran medida, al avance técnico introducido por Reverdin en el siglo XIX, de forma análoga en el siglo XX el trasplante de órgano sólido fue impulsado por el desarrollo de la anastomosis vascular gracias al investigador francés Alexis Carrel (1873-1944). No fue, no obstante, Carrel, sino Mathieu Jaboulay, Jefe de Cirugía en Lyon donde se formó Carrel, junto con el cirujano alemán Julius Dörfla los primeros en introducir la técnica de sutura vascular de espesor completo (2). M. Jaboulay tiene además el honor de ser el primero en realizar un trasplante renal en seres humanos, concretamente a una mujer con síndrome nefrótico a la quien Jaboulay implanta en su codo el riñón procedente de un cerdo. Era el año 1906. Ese mismo año intentaría un segundo xenotrasplante de riñón en una paciente anéfrica usando una cabra como animal donante. Antes que él, Emerich Ullmann, ya había comunicado, en Marzo de 1902, a la sociedad médica Vienesa, la realización del primer trasplante (autotrasplante) de órgano sólido de la historia, un riñón de perro implantado en el cuello del propio animal. Tres años después de los primeros intentos de trasplante renal en humanos por Jaboulay, en 1909, Ernst Unger, cirujano berlinés con una amplia trayectoria en el trasplante de órganos experimental, realizaba un tercer xenotrasplante sobre una paciente afecta de nefritis crónica utilizando los riñones de un macaco de borneo (4). A pesar del éxito técnico procedimental, los xenoinjertos apenas si funcionaron durante algunas horas en el mejor de los casos y todos los pacientes trasplantados murieron poco tiempo después (2, 4).

Por su parte Carrel, que no consigue un cargo en la Universidad de Lyon, donde se formó como residente de cirugía, tras una breve estancia en París, se traslada a Estados Unidos en 1904. Allí experimenta con animales y publica numerosos trabajos en el campo de la sutura vascular y el trasplante de órganos y tejidos, primero en colaboración con Charles Guthrie durante su estancia de 12 meses en el Hull Physiological Laboratory de la Universidad de Chicago (1905-1906) y desde 1906 ya como investigador del Instituto

Rockefeller para la Investigación Médica de Nueva York, donde extiende su investigaciones al campo de la preservación de órganos y tejidos y al desarrollo de cultivos celulares. Sus trabajos en el campo de trasplante de órganos y vasos sanguíneos y el diseño de la técnica de "triangulación" para la anastomosis vascular término-terminal, le harían valedor del Premio Nobel en 1912 (Figura 4) (2, 4-6).

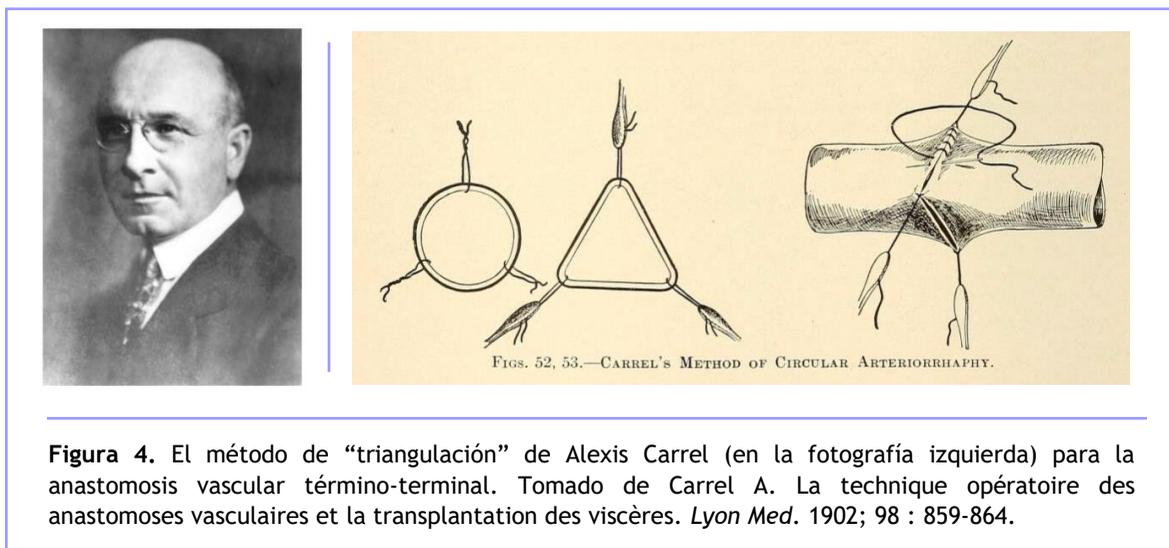


Figura 4. El método de "triangulación" de Alexis Carrel (en la fotografía izquierda) para la anastomosis vascular término-terminal. Tomado de Carrel A. La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. *Lyon Med.* 1902; 98 : 859-864.

Pero la investigación de Carrel en el trasplante de órganos no sólo supuso un importante avance desde el punto de vista técnico, su amplia experiencia trasplantadora dejó claro que mientras los autoinjertos de órgano sólido podrían tener algún éxito, los homoinjertos fracasan sin excepción. Mal augurio para los todavía acérrimos defensores del trasplante de homoinjertos. En 1914, James B. Murphy del Instituto Rockefeller, ya apunta a los linfocitos como células responsables del fallo del homoinjerto al observar que los fenómenos de rechazo suelen ir acompañados de infiltración linfocitaria. J.B. Murphy también describe cómo los estados de linfocitosis y linfopenia, que logra inducir experimentalmente en el huésped gracias, entre otros métodos, al empleo de rayos X,

disminuyen y aumentan respectivamente su susceptibilidad al desarrollo de tumores alogénicos, lo que evidencia el papel de estas células en los fenómenos de inmunidad y rechazo (7). Influenciado por los interesantes trabajos de su colega J. B. Murphy, Carrel decide irradiar algunos de sus receptores para evitar el rechazo. Desgraciadamente, sus inéditos experimentos nunca vieron la luz (2).

La década de los años 20, aún con el ambiente enrarecido tras el conflicto armado de la Primera Guerra Mundial, supuso un serio frenazo para la investigación médica experimental en el campo del trasplante tras el frenético avance logrado a principios del siglo XX. Algunos investigadores, como Frank C. Mann de la Clínica Mayo, continuaron la línea del trasplante de homoinjertos sin llegar a realizar contribuciones importantes más allá de corroborar el bien documentado trabajo de Carrel respecto al rechazo y sin explorar los métodos, sugeridos por Carrel, para evitar este fenómeno (2). Llegados los años 30 tendría lugar uno de los acontecimientos más importantes en la historia del trasplante. El 3 abril de 1933 el cirujano soviético Yu Yu Voronoy realiza el primer trasplante renal entre humanos (Figura 5). Voronoy que trabaja desde 1931 en el instituto de cirugía y transfusiones de Jerson (Ucrania) recibe a una mujer de 26 años en coma anúrico secundario a una intoxicación aguda por mercurio tras un intento de suicidio. Voronoy, que ya tiene cierta experiencia en el trasplante experimental animal usando la técnica de sutura vascular de Carrel, decide tratar el estado anúrico trasplantando a la paciente un riñón procedente de un donante de 60 años fallecido por fractura craneal, de grupo sanguíneo ABO incompatible y 6 horas de isquemia. El riñón fue implantado en el muslo medial derecho. La paciente, que apenas si tuvo diuresis, murió el 5 de Abril, dos días después del trasplante (8). Visto en retrospectiva, fenómenos inmunológicos asociados a, sobre todo la incompatibilidad sanguínea ABO (donante grupo B y receptor grupo 0) y quizá el excesivo tiempo de isquemia (sin preservación del órgano), pudieron ser la causa del fracaso prematuro de la función renal. Voronoy entre 1933 y 1949

realizaría otros 4 intentos de alotrasplante entre humanos, todos ellos sin éxito (8). A pesar de su fracaso, Voronoy logró todo hito. Comenzó con él la ilusionante etapa del alotrasplante de riñón en humanos, que culminaría décadas más tarde con la incorporación de este procedimiento a la práctica clínica como terapia de absoluta garantía frente a la insuficiencia renal.



Figura 5. Publicación que narra el primer trasplante renal humano en la revista española *El Siglo Médico* (título del artículo, 1936). Equipo de cirugía que realizó el primer trasplante renal humano junto con el Dr. Voronoy (fotografía derecha). Tomados de Matevossian y cols. (8).

En la década de los 40 y principios de los años 50 varios equipos de cirugía en París, Boston, Dinamarca y Londres realizaban activamente trasplante experimental de órganos en perros. Se observa nuevamente el fenómeno de "segundo set", por el que un segundo homoinjerto es rechazado más rápidamente y se busca, aunque sin demasiado éxito, la presencia de anticuerpos circulantes en el huésped (2). También se ensayan estrategias para evitar el rechazo. William James Dempster, de la Escuela Médica de Londres, experimenta irradiando a receptores de homoinjertos y prueba el efecto de la cortisona (9, 10), que había logrado multiplicar por 3 ó 4 la supervivencia de homoinjertos de piel en roedores (11). Paralelamente a la investigación, continuaron los intentos de trasplante

en seres humanos. En 1950 Richard Lawler trasplantó un riñón a una mujer afecta de enfermedad renal crónica en fase aún no terminal secundaria a poliquistosis. El riñón implantado, para sorpresa de todos, funcionó al menos 53 días, siendo extirpado a los 10 meses con signos evidentes de rechazo. Tres años antes, en 1947, el equipo formado por Charles Hufnagel, Ernest Landsteiner, hijo del célebre Karl Landsteiner, Premio Nobel de Medicina en 1930 por el descubrimiento y tipificación de los grupos sanguíneos, y David Hume del Hospital Peter Bent Brigham de Boston, realizaron quizá, el primer trasplante de riñón que tuvo éxito como terapia renal sustitutiva. Ante la falta de diálisis, el equipo decidió trasplantar un riñón de donante fallecido a una mujer ingresada por insuficiencia renal aguda secundaria a un aborto séptico. Unieron el riñón a los vasos antecubitales, y drenaron la orina producida sobre un frasco. Aunque funcionó apenas unas horas, este primitivo trasplante probablemente salvó la vida de la mujer que después recuperaría su función renal (2, 4). Alentado por el éxito parcial de estos procedimientos, el francés Rene Küss impulsa un programa de trasplante renal en París, justificado igualmente por la ausencia de diálisis o cualquier otro tratamiento para la insuficiencia renal terminal. Desde 1951, dos equipos de París trabajando por separado, realizarían hasta 9 homotrasplantes renales. El último de la serie realizado el 24 de Diciembre de 1952 en el Hospital Necker de París, fue el primer trasplante de donante vivo emparentado. Ninguno mostró una supervivencia significativa. En Boston, David Hume realizaría otros tantos trasplantes renales entre los años 1951 y 1953. Todos, excepto uno cuya función se mantuvo durante 5,5 meses, fracasaron (2, 4). La experiencia práctica y experimental acumulada durante la primera mitad del siglo XX parecía dejar claro que el éxito únicamente podría lograrse trasplantado un riñón procedente de un individuo genéticamente idéntico, desaconsejándose, por poco ético, cualquier otro tipo de intento. Finalmente, el 23 de Diciembre de 1954, el equipo formado por Murray, Merrill y Harrison, del Hospital Peter Bent Brigham de Boston (Massachusetts, USA), realiza el

primer trasplante renal entre gemelos homocigóticos (Figura 6) (12). Como ya se postulaba, la homología genética entre donante y receptor evitó el rechazo y el injerto funcionó durante 8 años. Todo un hito. Por su contribución al desarrollo del trasplante de órganos como tratamiento de las enfermedades humanas, Joseph Edward Murray sería galardonado con el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1990.

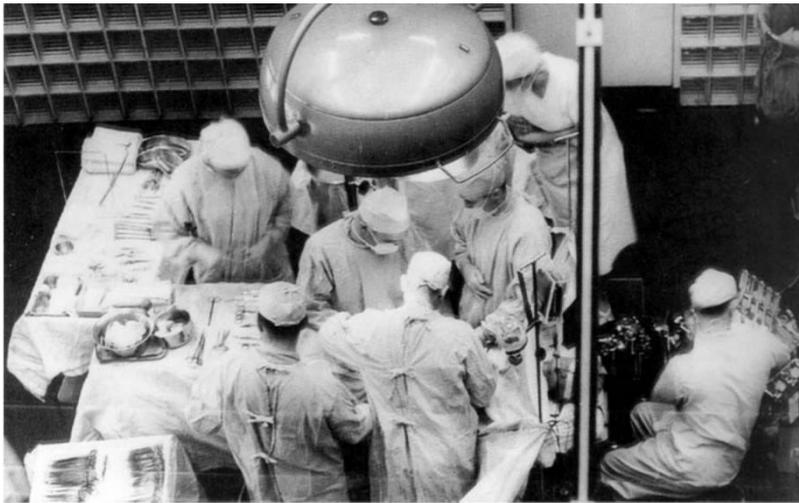


Figura 6. Joseph Murray y su equipo llevando a cabo el primer trasplante renal con éxito a largo plazo en 1954 entre gemelos idénticos. Tomado de Barker y cols. (2).

Convertido en el principal escollo, comienza una intrépida búsqueda por dilucidar definitivamente los mecanismos inmunológicos desencadenantes del rechazo. Los trabajos de J. B. Murphy a principios de siglo XX y Leo Loeb en los años 30 ya habían demostrado la naturaleza celular del rechazo y el papel central de los linfocitos. No obstante, muchos eran los investigadores que sugerían una respuesta de base humoral, con el desarrollo de anticuerpos frente a los antígenos presentes en el homoinjerto, como mecanismo efector del rechazo. Se conocía el fenómeno de "segundo set" por el que un segundo homoinjerto trasplantado sobre un sujeto con injerto previo era rechazado con

más premura. Este fenómeno fue observado por primera vez hacia 1912 por Georg Schöne, considerado por muchos el primer inmunólogo del trasplante de la historia y quien, trabajando en el laboratorio del prestigioso investigador alemán Paul Ehrlich, determinó que los homoinjertos de piel siempre eran rechazados y que los injertos posteriores del mismo donante eran rechazados más rápidamente que los primeros (2). Décadas más tarde, en 1943, el cirujano plástico de origen escocés Thomas Gibson y el británico Peter Brian Medawar propondrían un estado de inmunización activa en el receptor como base de este fenómeno (13).



Figura 7. Sir Peter Medawar (fotografía izquierda) llevando a cabo un injerto de piel en una vaca (fotografía derecha). La inesperada aceptación de los injertos intercambiados entre bovinos gemelos fue la clave para entender la tolerancia. Tomada de Barker y cols. (2).

Medawar era un joven zoólogo del Magdalen College de Oxford que focalizó su investigación hacia el trasplante de tejidos, concretamente al trasplante experimental

de injertos de piel, al estallar la Segunda Guerra Mundial en Europa (14). Su trabajo en la Unidad de Quemados de la Royal Infirmary de Glasgow sobre el destino de injertos de piel en humanos junto a Gibson (13), sus investigaciones sobre el trasplante experimental de injertos de piel en conejos (15, 16) y su descubrimiento, algunos años más tarde, de la tolerancia adquirida sentarían las bases modernas de la inmunología del trasplante (Figura 7). Medawar confirma, aunque mucha era la evidencia acumulada hasta la fecha, que mientras los autoinjertos son tolerados, el destino de los homoinjertos es siempre el rechazo. Caracteriza histológicamente dicho fenómeno como una reacción inflamatoria aguda, que involucra: proliferación vascular y linfática, infiltrado masivo de linfocitos y monocitos y edema, seguida de necrosis y muerte celular. Medawar establece que la intensidad de la respuesta del "segundo set" difiere en función del grado de identidad genética entre los individuos donantes (15, 16), lo que parecía confirmar la existencia de un estado inmunológico sistémico con especificidad y memoria tras un proceso de alosensibilización previo.

En 1953, ya de vuelta en Oxford, Medawar junto con Billingham y Brent demuestran que ratones inoculados durante su desarrollo embrionario con esplenocitos de un donante, no desarrollan rechazo cuando le son implantados injertos de piel de dicho donante durante su edad adulta (Figura 8) (17). Es decir, esplenocitos de una cepa donante injertados por infusión intravenosa en ratones inmunológicamente inmaduros eran capaces de inducir un estado de tolerancia en el individuo adulto, siendo rechazados los homoinjertos de otra cepa donante genéticamente distinta. Algunos años antes, Frank Macfarlane Burnet, biólogo australiano, había desarrollado el concepto de tolerancia frente a lo propio, sin duda uno de los dogmas centrales de la inmunología moderna. Las células inmunocompetentes, para responder de manera eficiente, tienen que aprender a discriminar entre lo propio y lo no-propio y postulaba que dicho aprendizaje debía ocurrir durante el desarrollo embrionario o durante una etapa inmediatamente posterior a éste.

Con su trabajo, Billingham, Brent y Medawar probaron experimentalmente la hipótesis de Burnet por la que el sistema inmune no está pre-programado para tolerar lo propio, sino que aprende a hacerlo como resultado de la exposición a moléculas propias durante su desarrollo temprano (14). Medawar y Burnet compartirían el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1960 por el descubrimiento de la tolerancia inmunológica adquirida.



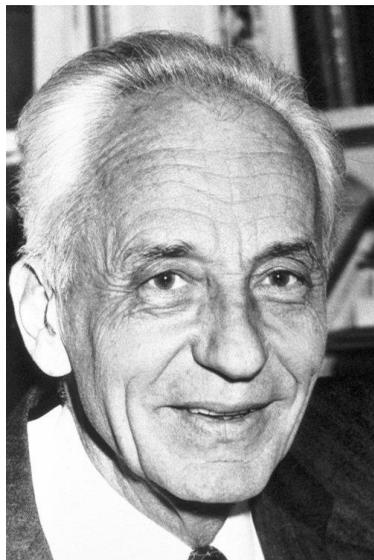
Figura 8. Rupert Billingham y Leslie Brent en su laboratorio (fotografía izquierda), donde inoculaban ratones neonatales con esplenocitos (imagen superior derecha). Los ratones adultos aceptaban los homoinjertos de piel de la cepa donante (imagen inferior derecha). Tomada de Barker y cols. (2).

Los métodos experimentales para producir tolerancia revolucionaron el panorama del trasplante planteando la posibilidad de inducir en el receptor un estado de plasticidad inmunológica temporal, similar a la etapa del desarrollo fetal (18). Al fin se vislumbraba una posibilidad teórica de superar el fatídico rechazo. En 1959 Schwartz y Dameshek demuestran que la 6-betamercaptopurina, que se utilizaba en el tratamiento de la leucemia, es eficaz en conejos para prevenir la formación de anticuerpos frente a la seroalbúmina humana. Ellos determinaron que el estado fetal no es esencial para inducir

en el adulto una condición de ausencia de respuesta ante lo exógeno y llamaron a esta observación *tolerancia inmunológica inducida por drogas* (19). Pronto, tras demostrar su eficacia en el trasplante experimental, se plantea el uso de azatioprina, un derivado de la 6-betamercaptopurina. El 5 de abril de 1962 un hombre de 24 años, trasplantado de riñón de donante cadavérico en el hospital Peter Bent Brigham, fue el primero en ser tratado inicialmente con azatioprina (20). El buen resultado de esta droga, combinado con el empleo de corticoesteroides para tratar eventualmente los episodios de rechazo, supusieron el nacimiento de la era moderna de la inmunosupresión. No obstante, no es sino hasta el descubrimiento del efecto inmunosupresor de la ciclosporina por Jean Borel y colaboradores en 1970 cuando se da un salto cualitativo que resulta crítico en la historia del trasplante. Las ciclosporinas, ciclopéptidos de 11 aminoácidos que inhiben de forma específica la proliferación linfocitaria y no así la proliferación de otras células somáticas, son producidas de forma natural por varios géneros de Ascomicetos, entre ellos *Tolypocladium inflatum*, usado para la producción a gran escala por su facilidad de cultivo industrial (21). Su uso como fármaco de primera línea en pacientes trasplantados permitió situar la tasa de éxito de supervivencia del injerto tras el primer año en torno a un 80%. Al fin, el alotrasplante no era visto como una quimera y sí como un tratamiento fiable y efectivo cuya aplicación comenzó a extenderse a miles de centros por todo el mundo.

Más allá de establecer la naturaleza del rechazo como una respuesta inmunológica frente a lo ajeno con especificidad y memoria, únicamente eludible induciendo farmacológicamente estados de tolerancia en el receptor, quedaba aún pendiente conocer cuál o cuáles eran las dianas antigénicas presentes en el injerto instigadoras de tal fenómeno. En respuesta a esta pregunta, Jean Dausset en 1958 (Figura 9), describe la existencia de diferentes grupos antigénicos en las células sanguíneas de la serie blanca que difieren de los antígenos eritrocitarios, tipificados unos 30 años antes por Karl Landsteiner. El primer antígeno que caracterizó, al que denominó MAC, el hoy HLA-A2,

estaba presente en el 60% de los individuos. Dichos antígenos serían responsables de los fenómenos de alosensibilización en pacientes politrasfundidos con el consiguiente desarrollo de anticuerpos anti-antígenos leucocitarios humanos (anti-HLA) desencadenantes de las reacciones transfusionales (22).



216

Iso-leuco-anticorps

PAR J. DAUSSET (Paris, France)

Les progrès relativement lents de l'immunologie des leucocytes ne sont pas dus à la rareté des anticorps qui au contraire sont très fréquemment rencontrés dans le sang des malades polytransfusés, mais plutôt aux difficultés que l'on rencontre à se procurer des antigènes leucocytaires en quantité suffisante et suffisamment purs. Malgré ces obstacles un certain nombre de faits nouveaux ont pu être acquis.

Figura 9. Publicación en la que Jean Dausset (fotografía izquierda) describe por primera vez la existencia de grupos de antígenos leucocitarios (22). Por este trabajo recibiría el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1980.

El mismo año, Van Rood y cols. (23) identifican la presencia de estos anticuerpos aglutinantes de leucocitos en el suero de mujeres multíparas a partir de la observación clínica de una mujer que había recibido una transfusión como consecuencia de una hemorragia post-parto. Dos horas y media después de comenzar la transfusión, la paciente comenzó a tener escalofríos y su temperatura ascendió a 38,9 °C, mientras que la tensión descendió de 115/70 a 70/30 y vomitó varias veces. Los análisis de laboratorio excluyeron la posibilidad de incompatibilidad eritrocitaria, identificándose, no obstante, que anticuerpos frente a los leucocitos estaban presentes en un título bastante elevado. Dado

que la paciente nunca antes había recibido una transfusión, consideraron la posibilidad de que los anticuerpos frente a los leucocitos hubieran aparecido durante embarazos previos (6 en total).

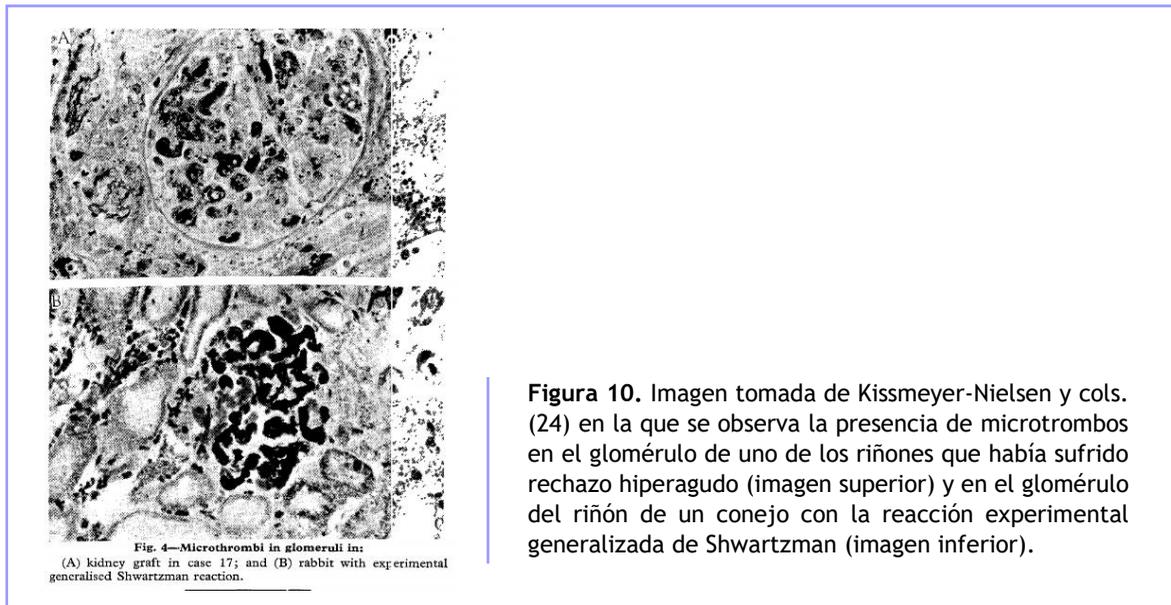
La evidencia mostraba que el contacto con sangre y/o tejido fetal inducía una respuesta humoral con formación de un tipo de aloanticuerpos dirigidos contra antígenos leucocitarios humanos. Fue lógico inferir entonces, que si dichos antígenos HLA (*del acrónimo inglés Human Leukocyte Antigen*) se encontraran también en los tejidos del órgano trasplantado, serían con toda probabilidad las principales moléculas responsables de desencadenar los fenómenos de rechazo inmunológico. Además, los eventos de sensibilización frente a estos antígenos que promovían el desarrollo de anticuerpos, podrían, desde un punto de vista teórico, tener un efecto patológico sobre el injerto trasplantado.

El complejo mayor de histocompatibilidad: la gran barrera

A pesar de los avances en el entendimiento de los mecanismos inmunológicos subyacentes al rechazo y los postulados acerca de una alorrespuesta humoral como mediadora de este fenómeno, pasada la mitad del siglo XX aún no se había demostrado fehacientemente la existencia de anticuerpos circulantes frente a aloantígenos tisulares como causa primaria en el rechazo de los órganos trasplantados.

Fue en 1966 cuando Kissmeyer-Nielsen y cols. (24), relacionan por primera vez la ocurrencia de dos fenómenos de rechazo hiperagudo con la preexistencia de anticuerpos dirigidos frente a los antígenos presentes en el tejido de los donantes. Curiosamente, los dos fenómenos de rechazo se produjeron en dos mujeres multíparas de 33 y 38 años, que habían recibido diálisis peritoneal como tratamiento sustitutivo previo al trasplante, a lo largo de cuyo procedimiento, habían sido trasfundidas en varias ocasiones con sangre

completa y plasma. Inmediatamente después del trasplante, los autores observaron que los riñones adquirirían un color, tono y temperaturas normales, habiendo secreción de orina durante unos 10 minutos. Tras este tiempo, la secreción de orina disminuyó gradualmente y cesó por completo tras la primera hora, momento en el que el riñón trasplantado comenzó a adquirir una coloración violácea y perdió el tono. El análisis histológico de ambos injertos reveló la presencia de microtrombos en las arteriolas y capilares glomerulares y yuxtaglomerulares, con ausencia de infiltrado celular (Figura 10). Dado que ciertos antígenos presentes en los leucocitos y trombocitos parecían ser importantes en los procesos de isoinmunización, según habían descrito Dausset y cols. (22), Kissmeyer-Nielsen y cols. atribuyeron a dichos antígenos HLA presentes en células y tejidos del donante la causa de los rechazos.



El sistema HLA humano o generalmente conocido como Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) es una familia de genes localizados en el brazo corto del

cromosoma 6 (6p21) (Figura 11), cuyos productos desempeñan un papel esencial en la defensa frente a patógenos extraños y en la vigilancia inmune tumoral. Su mapa genético extendido abarca una amplia región de 7,6 MB y está conformada por varias regiones génicas que desde el telómero hacia el centrómero son definidas como: la subregión extendida de Clase I (3,9 MB), la subregión clásica de Clase I (1,9 MB), la subregión clásica de Clase III (0,7 MB), la subregión clásica de Clase II (0,9 MB) y la subregión extendida de Clase II (0,2 MB) (25).

En las subregiones de Clase I y II clásicas se localizan los genes, de expresión codominante y altamente polimórficos, cuyos productos son las glicoproteínas de membrana responsables de la presentación de antígenos a los linfocitos T. El polimorfismo genético implica la existencia de varios alelos, es decir, variantes genéticas que codifican un mismo antígeno HLA, lo que permite la generación de proteínas diferentes. La existencia de proteínas diferentes permite, en un individuo, exponer y presentar multitud de péptidos o antígenos diferentes a los linfocitos T, lo que supone una herramienta básica para la defensa frente a la gran diversidad de patógenos extraños que existen. La mayoría de las variaciones alélicas de los genes HLA se encuentran en los exones 2 y 3 para las moléculas de Clase I y en el exón 2 para las moléculas de Clase II (26), que son los exones que codifican la región de unión al antígeno. Los polimorfismos genéticos de cada individuo pueden identificarse y caracterizarse (tipaje o genotipaje HLA) mediante distintos métodos (27). Los genes de los loci *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-Cw* codifican las moléculas HLA de Clase I y los genes de los loci *HLA-DR*, *HLA-DP* y *HLA-DQ* codifican moléculas HLA de Clase II (Figura 11).

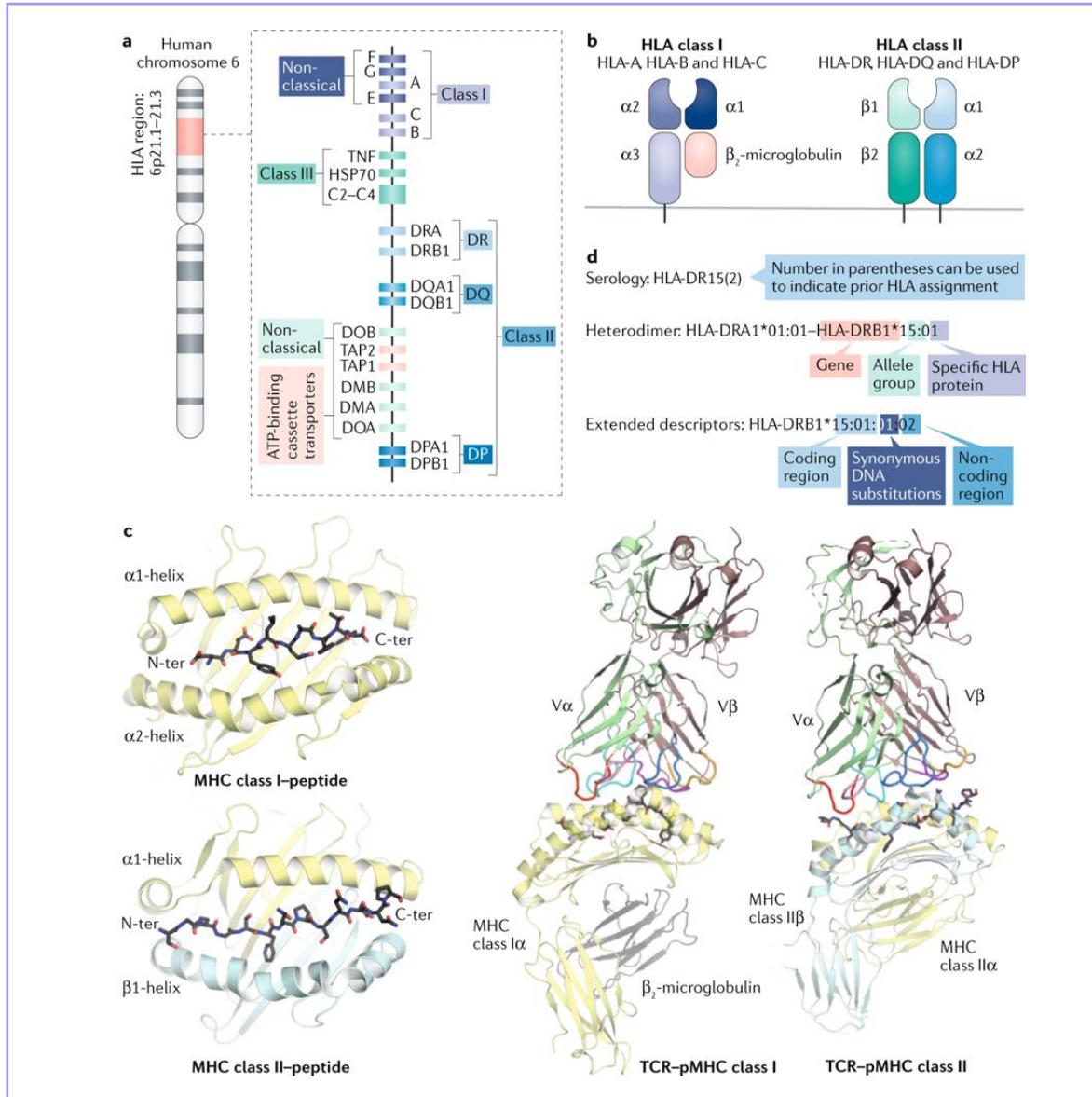


Figura 11. La biología del HLA. Diagrama simplificado del locus MHC humano (A), estructura esquematizada de las moléculas HLA de Clase I y II (B), estructura tridimensional del sitio de unión del péptido en las moléculas HLA de Clase I y II (C) y sistema de nomenclatura HLA (D), tomada de Robson et. al (28).

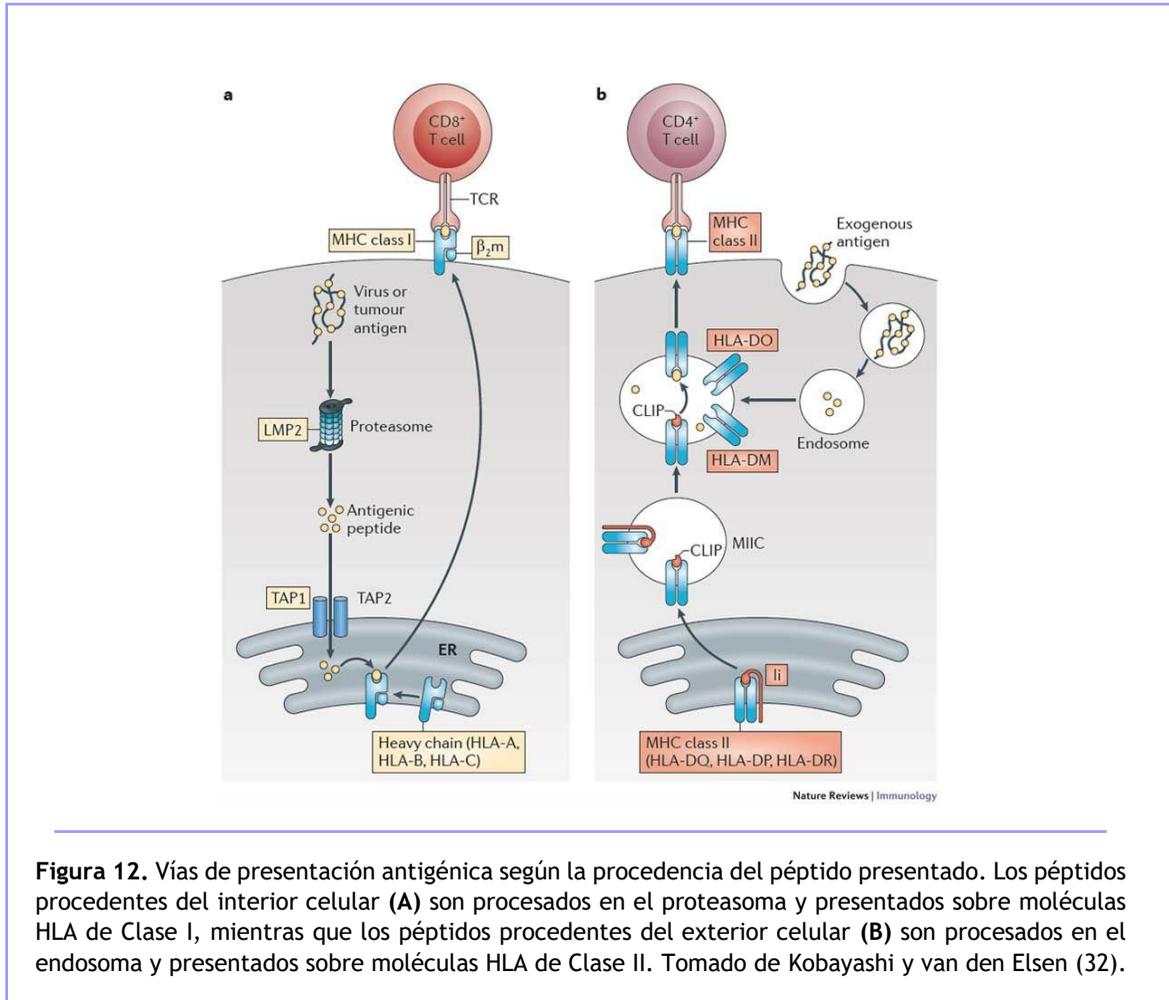


Figura 12. Vías de presentación antigénica según la procedencia del péptido presentado. Los péptidos procedentes del interior celular (A) son procesados en el proteasoma y presentados sobre moléculas HLA de Clase I, mientras que los péptidos procedentes del exterior celular (B) son procesados en el endosoma y presentados sobre moléculas HLA de Clase II. Tomado de Kobayashi y van den Elsen (32).

Las moléculas de Clase I están compuestas por una cadena α polimórfica unida de forma no covalente a la cadena β_2 -microglobulina no polimórfica, con los segmentos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ formando el sitio de unión al antígeno (Figura 11). Se expresan de forma constitutiva en la superficie de todas las células nucleadas y unen péptidos procedentes del catabolismo proteico endógeno que tiene lugar en el proteasoma y que presentan a las

células T CD8⁺ (Figura 12) (28). Las moléculas de Clase II están compuestas por una cadena α y una cadena β , con los segmentos $\alpha 1$ y $\beta 1$ formando el sitio de unión al antígeno (Figura 11). Se encuentran constitutivamente en la superficie de las células presentadoras de antígenos profesionales (linfocitos B, células dendríticas y macrófagos), aunque su expresión puede ser inducida por interferón γ y en otros linajes, como en células endoteliales durante una respuesta inflamatoria secundaria, por ejemplo, al daño originado por la isquemia-reperfusión (29, 30). Exponen péptidos exógenos captados por fagocitosis o endocitosis que presentan a las células T CD4⁺ (Figura 12) (28, 31).

Hoy día sabemos que el MHC era el que estaba detrás del rechazo de los aloinjertos tisulares, pues su alto polimorfismo (33), resultado de la selección natural como ventaja evolutiva para la protección de las poblaciones, identificaba un individuo como único y diferente a cualquier otro, lo que era detectado por el sistema de autenticación humano, el sistema inmune, y eliminado cual patógeno infeccioso.

Avanzando en el tiempo, llegamos hasta abril de 1969, cuando Patel y Terasaki (34), estudiando la evolución de 226 trasplantes de riñón, demuestran la relación entre el rechazo hiperagudo de los injertos trasplantados y el resultado positivo de la prueba cruzada por linfocitotoxicidad dependiente de complemento, resaltando su utilidad clínica previa al trasplante, y asociando dicho rechazo a la presencia de anticuerpos citotóxicos dirigidos frente a los antígenos HLA del donante. Treinta y cuatro años después, Terasaki enuncia el que podría ser considerado uno de los dogmas centrales de la Histocompatibilidad: *La Teoría Humoral del Trasplante* (35), en la que pone de manifiesto la relevancia clínica de los anticuerpos dirigidos frente a los antígenos HLA (anticuerpos anti-HLA) del donante (donante específicos o DSA) en el desarrollo de rechazo tanto hiperagudo, como agudo y crónico de los aloinjertos. *Los anticuerpos anti-HLA eran, en realidad, la gran barrera para el éxito del trasplante.*

La biología de los anticuerpos

Ha quedado establecido, entonces, que el reconocimiento del alo-HLA por el sistema inmune del receptor, tras la exposición a tejidos alogénicos (embarazo, transfusiones o trasplante) induce una respuesta inmune alogénica que conduce a la producción de anticuerpos, en un proceso que se conoce como *sensibilización*. Los anticuerpos, a través de diferentes funciones efectoras, son responsables del daño, y en último término, del rechazo del aloinjerto (36), siendo el endotelio vascular del donante, presente en la interfase entre el tejido del donante y el sistema inmune del receptor, la principal diana de la alo-respuesta inmune (37). La existencia de los anticuerpos como un “agente” en la sangre capaz de neutralizar la toxina de la difteria fue descrita por primera vez en 1890 por von Behring y Kitasato. Más de 100 años de investigación sobre ellos han permitido elucidar su estructura, propiedades y funciones, así como el papel tan importante que desempeñan como vehículo de unión de la respuesta inmune adaptativa y los mecanismos efectores del sistema inmune innato.

Los anticuerpos son glicoproteínas pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas, concretamente, heterodímeros compuestos por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas idénticas (H), y dos cadenas ligeras idénticas (L) de tipo K o λ , unidas por puentes disulfuro (Figura 13). Cada cadena pesada presenta un dominio variable N-terminal (VH) y de tres a cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4), con una región adicional bisagra entre CH1 y CH2. Las cadenas ligeras constan, de manera similar, de un dominio variable N-terminal (VL) y un dominio constante (CL). La cadena ligera se asocia con los dominios VH y CH1 para formar el brazo Fab (Fab = *fragment antigen binding*), y funcionalmente, las regiones V interaccionan para formar el sitio de unión al antígeno. Dos heterodímeros de cadena pesada-ligera (HL) se combinan en una única molécula (H_2L_2) vía puentes disulfuro en la región bisagra e interacciones no

covalentes entre los dominios CH3-CH4. La parte del anticuerpo formada por debajo de la región bisagra y los dominios CH2/CH3 es lo que se conoce como Fc (*fragment crystalline*).

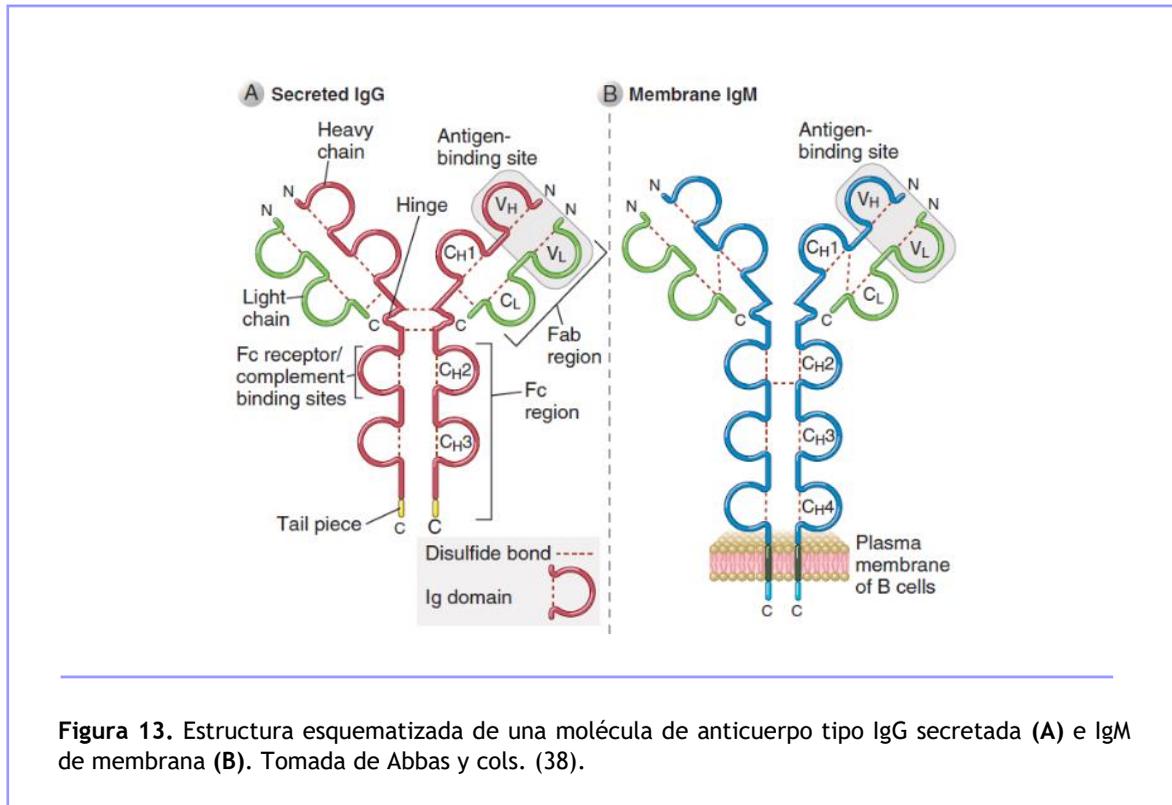
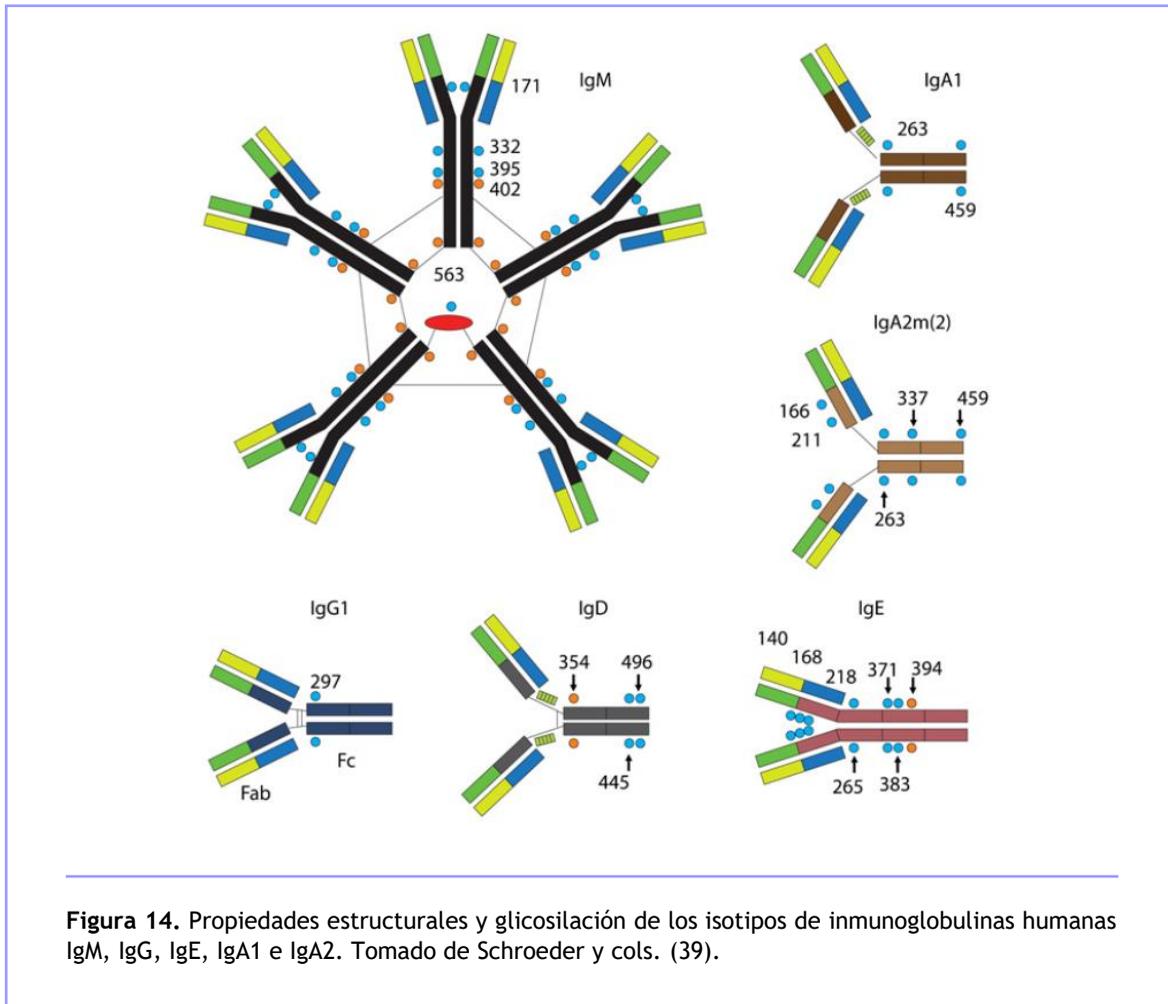


Figura 13. Estructura esquematizada de una molécula de anticuerpo tipo IgG secretada (A) e IgM de membrana (B). Tomada de Abbas y cols. (38).

Cada dominio variable contiene tres regiones de variabilidad de secuencia denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDRs. Esta variabilidad de secuencia permite la unión de multitud de antígenos diferentes. Existen varias clases de dominios C de cadena pesada que definen los isotipos y subtipos (subclases) de inmunoglobulinas humanas: IgM, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (IgA1 e IgA2), IgD e IgE

(Figura 14). Las regiones constantes son además las responsables de las funciones efectoras de los anticuerpos.



Una célula B sólo puede expresar un isotipo de inmunoglobulina al mismo tiempo, excepto en caso de la IgD e IgM de membrana (mIgM). La mIgM es, precisamente, el primer isotipo de inmunoglobulina que se produce. La IgM también es la primera inmunoglobulina

en ser secretada tras la activación de la célula B, dado que el cambio de mIgM a IgM secretada únicamente requiere un procesamiento alternativo del mRNA para eliminar el dominio transmembrana CH4. La expresión de IgG, IgA e IgE, sin embargo, requiere un reordenamiento genético más complejo, de manera que su secreción no se produce hasta aproximadamente una semana tras la exposición inicial al antígeno. El cambio de isotipo de inmunoglobulina viene determinado en gran medida por la presencia de determinadas citoquinas y la disponibilidad de moléculas co-estimuladoras (40-43) y suele ser T CD4⁺ dependiente. En el contexto del trasplante, todavía no se conocen exactamente cuáles son los factores que pueden propiciar un cambio de isotipo (44).

En cualquier caso, las manifestaciones histológicas del rechazo mediado por anticuerpos (ABMR) son un reflejo de las funciones que los anticuerpos llevan a cabo tras su unión al endotelio vascular, originando señalización e inflamación endotelial, activación de la cascada del complemento por la vía clásica y reclutamiento de células efectoras (45). El hecho de que algunos pacientes con DSA no experimenten ABMR ha conducido a pensar que existen otros factores que deben influir en la susceptibilidad o no del rechazo del órgano trasplantado, más allá de la mera presencia de anticuerpos. Estos factores podrían estar relacionados, por consiguiente, con las propias características y funciones de los isotipos y subclases de anticuerpos circulante.

Entre los cinco isotipos de inmunoglobulinas, la IgG se considera el principal efector del ABMR a través de la activación de la cascada del complemento (46). La IgG es, además, el isotipo de gammaglobulina más abundante en la circulación y supone entre el 10 y el 20% de las proteínas plasmáticas. Se divide en cuatro subclases con diferente actividad biológica: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que, aunque altamente conservadas, difieren en su región constante (Tabla 1), implicada en la unión a los receptores Fc (FcγRs) y al componente C1q del complemento, particularmente en los dominios bisagra. El exón

bisagra de la IgG1 comprende 15 aminoácidos y es muy flexible. La IgG2 tiene la región bisagra más corta que la IgG1, con 12 aminoácidos, y también más rígida, debido a la hélice poli-prolina estabilizada por hasta cuatro puentes disulfuro extra entre cadenas. La región bisagra de la IgG4 también contiene 12 aminoácidos, pero su flexibilidad es intermedia entre la de la IgG1 y la de la IgG2 (47). La IgG3 tiene una región bisagra mucho más larga que cualquier otra subclase de IgG, estando los fragmentos Fab relativamente lejos del fragmento Fc, lo que le otorga una gran flexibilidad y es también responsable de su gran peso molecular en comparación con otras subclases.

En cuanto a la activación del complemento, la IgG3 es la más potente activadora, seguida estrechamente por la IgG1 y en mucha menor medida, por la IgG2 (48). La subclase IgG4 no tiene actividad detectable del complemento y habitualmente es considerada como subclase no fijadora de complemento.

La interacción de las subclases de IgG con sus FcγRs es más compleja. Los FcγRs se expresan en una variedad de células linfoides y mieloides, incluyendo las células B, monocitos, células natural killer (NK), neutrófilos, mastocitos y ocasionalmente, células T (49). El sistema de FcγRs humano está compuesto por tres principales clases: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Los FcγRII y FcγRIII presentan además varias isoformas. Únicamente el FcγRIIb desencadena funciones inhibitoras vía dominios ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif); los otros FcγRs son activadores. La interacción entre el Fc y el FcγRIIIa sobre, por ejemplo, las células NK, estimula la liberación de perforinas y granzimas, lo que provoca la apoptosis de la célula diana. Esta interacción también promueve la síntesis de citoquinas que potencian la expresión del HLA en el endotelio del donante y reclutan células inflamatorias (50, 51). Tanto los anticuerpos fijadores (IgG1/IgG3) como los no fijadores de complemento (IgG2/IgG4) pueden inducir este proceso de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

En general, las subclases IgG3 e IgG1 tienen mayor afinidad por los FcγRs, mientras que las subclases IgG2 e IgG4 se unen a un repertorio más restringido de FcγRs (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades de las subclases de IgG humanas. Modificada de Vidarsson y cols. (48).

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
General				
Masa molecular (kD)	146	146	170	146
Aminoácidos en la región bisagra	15	12	62	12
Puentes disulfuro entre cadenas pesadas	2	4	11	2
Nivel sérico medio en el adulto (g/L)	6,98	3,8	0,51	0,56
Abundancia relativa (%)	60	32	4	4
Vida media (días)	21	21	7/~21	21
Transferencia placentaria	++++	++	++/++++	+++
Respuesta de los anticuerpos a:				
Proteínas	++	+/-	++	++
Polisacáridos	+	+++	+/-	+/-
Alérgenos	+	(-)	(-)	++
Activación del complemento				
Unión a C1q	++	+	+++	-
Receptores Fc				
FcγRI	+++	-	++++	++
FcγRIIaH131	+++	++	++++	++
FcγRIIaR131	+++	+	++++	++
FcγRIIb/c	+	-	++	+
FcγRIIIaF158	++	-	++++	-
FcγRIIIaV158	+++	+	++++	++
FcγRIIIb	+++	-	++++	-
FcγRn (a pH<6,5)	+++	+++	++/+++	++

Existen también diferencias en cuanto a la afinidad de las subclases de IgG por sus antígenos. Berkowska y cols. (52) encontraron que en las células B de sangre periférica, los transcritos de IGHG2 e IGHG4 contenían mayor cantidad de hipermutaciones somáticas en las regiones variables en comparación con los transcritos de IGHG1 e IGHG3. Así pues, el cambio de subclase secuencial hacia IgG2 e IgG4 podría indicar más reacciones en el centro germinal y una actividad más prolongada de la enzima *citidin deaminasa inducida por activación*, generadora de tales mutaciones.

Por último, existe una evidencia emergente de que la unión del DSA al HLA sobre el endotelio vascular inicia una cascada intracelular de señalización con implicaciones para la función y estructura de la célula endotelial. Estas modificaciones incluyen un aumento de la expresión de los ligandos de las moléculas de adhesión leucocitaria, la alteración del citoesqueleto y la potenciación de la proliferación y supervivencia celular (53). Estos cambios constituyen la base de la fibrosis y la proliferación intimal presentes en el rechazo crónico mediado por anticuerpos (54).

El complemento y la vía clásica y su implicación en el trasplante

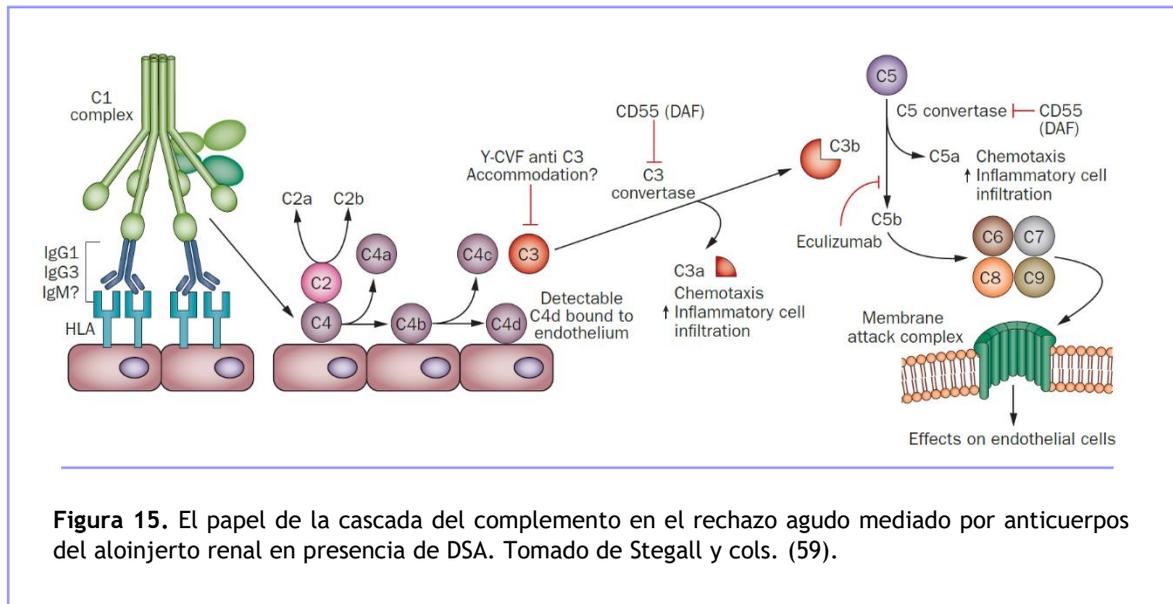
Desde la década de los 50 hasta mediados de los 80, el principal problema a solucionar en el contexto del trasplante era el rechazo agudo celular (TCMR), que era extremadamente común y difícil de tratar y la primera causa de pérdida del aloinjerto (55). Además, la prueba cruzada por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) evitaba el rechazo hiperagudo, descartando donantes incompatibles por la presencia de anticuerpos citotóxicos en el suero de receptores. El desarrollo de potentes fármacos inmunosupresores disminuyó la incidencia de TCMR a menos del 10% en el primer año después del trasplante, considerándose actualmente un motivo raro de pérdida del aloinjerto (56). Dado que el TCMR comenzó a ser controlado por los clínicos, las

investigaciones se centraron en la presencia de anticuerpos en los receptores como barrera para el éxito del trasplante.

El desarrollo en 1991 de la técnica que permitía la detección histológica del producto del complemento C4d (57), escindido a partir del componente C4b fijado sobre el endotelio vascular del aloinjerto, proporcionó evidencia real de la interacción entre el DSA y el aloinjerto, poniendo de manifiesto que el sistema del complemento era parte activa de la fisiopatología del ABMR. El sistema del complemento incluye más de 40 proteínas, solubles y que se unen a la membrana, incluyendo receptores y varias proteínas reguladoras (58). Desde su primera descripción por Ehrlich a final del siglo XIX y su subsecuente caracterización por Bordet, como el factor lítico termolábil del suero, a la cascada del complemento se le ha atribuido un papel muy importante dentro de la respuesta inmune (59). Sin embargo, no fue hasta tiempo después que el papel de los factores del complemento comienza a estudiarse de manera extensa, y particularmente sobre los órganos trasplantados.

De las tres vías de activación del complemento (60), la vía clásica es la principal responsable de la activación del complemento mediada por la presencia de DSA. La unión del DSA sobre su alo-antígeno diana en el endotelio del aloinjerto renal permite el reclutamiento del componente C1q. La unión del componente C1q a la porción Fc del DSA recluta las serín-proteasas C1r y C1s, formando el complejo C1. El complejo C1 interacciona entonces, con los componentes C4 y C2, que se expresan en sus formas inactivas, escindiéndolos y subsecuentemente formando C4bC2a, una molécula con función de convertasa de C3. La convertasa de C3 escinde el componente C3 en C3a y C3b. El fragmento C3b puede unirse a la convertasa de C3, transformándose en la convertasa de C5. La convertasa de C5 escinde el componente C5 en C5a y C5b. La unión de C5b a la superficie celular dispara la formación del complejo de ataque a la membrana

(MAC), tras el subsecuente reclutamiento de los componentes C6, C7, C8 y varias moléculas (10-18) de C9 (Figura 15). Los poros formados por el MAC sobre la membrana celular conducen a su muerte por lisis osmótica.



La activación de la cascada del complemento, no sólo conduce a la muerte celular por lisis osmótica, sino también a la producción de mediadores solubles como las anafilotoxinas C3a y C5a, que son potentes quimioatrayentes para los neutrófilos y monocitos (61) y alteran la microvasculatura, incrementando la permeabilidad e induciendo la expresión de moléculas de adhesión. Ciertas proteínas reguladoras, incluyendo el factor acelerador del decaimiento o DAF (CD55), la proteína cofactor de membrana o MPC (CD46) y el CD59, expresados en la superficie de las células endoteliales, y el C1-inhibidor sérico y el factor H, limitan la inflamación y confieren protección durante la activación del complemento (44). Debido a la resistencia general de las células

endoteliales a la lisis mediada por complemento por la alta expresión de las proteínas reguladoras, la relevancia fisiológica de la formación terminal del MAC durante el rechazo, no está clara (62) y parece que sólo altos títulos de anticuerpos fuertemente fijadores de complemento podrían superar la inhibición y provocar la citólisis endotelial. No obstante, la relevancia clínica de los anticuerpos anti-HLA sobre la evolución de los aloinjertos trasplantados es indiscutible, independientemente de si son capaces o no de activar la cascada del complemento y de si el daño producido sobre el aloinjerto es secundario a dicha activación. Así pues, pronto comenzaron a desarrollarse, estandarizarse y evolucionar técnicas que permitieran su detección y caracterización.

Las técnicas de detección

El primer método para la detección de anticuerpos anti-HLA se introdujo en los años 60 (34, 63) y pronto se erigió como la prueba esencial para evitar el rechazo hiperagudo de los injertos trasplantados (34). Dicha prueba detectaba la citotoxicidad del suero del potencial receptor frente a las células del donante (linfocitos), mediante un procedimiento en tres pasos (Figura 16). En el primero, el suero del receptor se incubaba con las células (linfocitos) del donante. Más tarde, se adicionaba una fuente de complemento exógeno, generalmente procedente de suero de conejo. En la última fase, un colorante vital permitía la identificación de las células muertas frente a las vivas. Un resultado positivo de la prueba era indicativo de muerte celular o citotoxicidad y por tanto de la existencia de anticuerpos citotóxicos preformados en el suero del receptor frente a las células del donante, lo que contraindicaba por completo el trasplante. Este método se denominó prueba cruzada por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

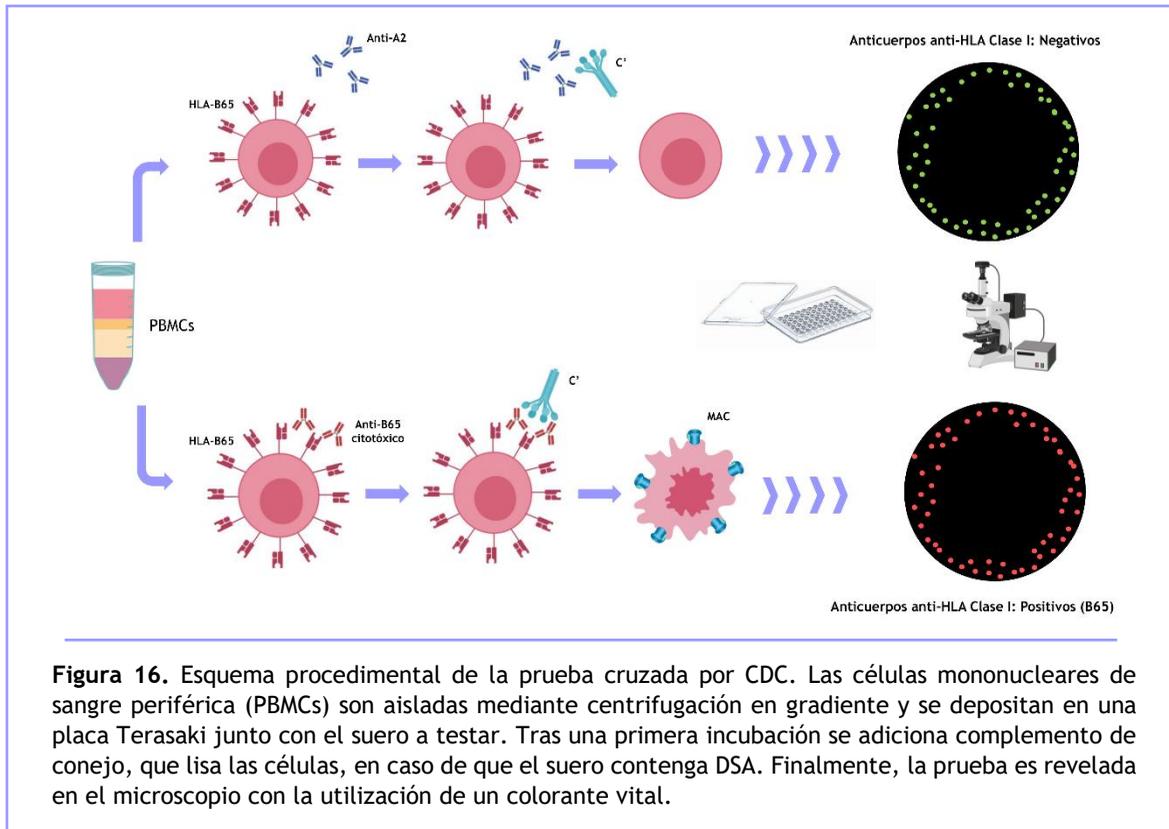
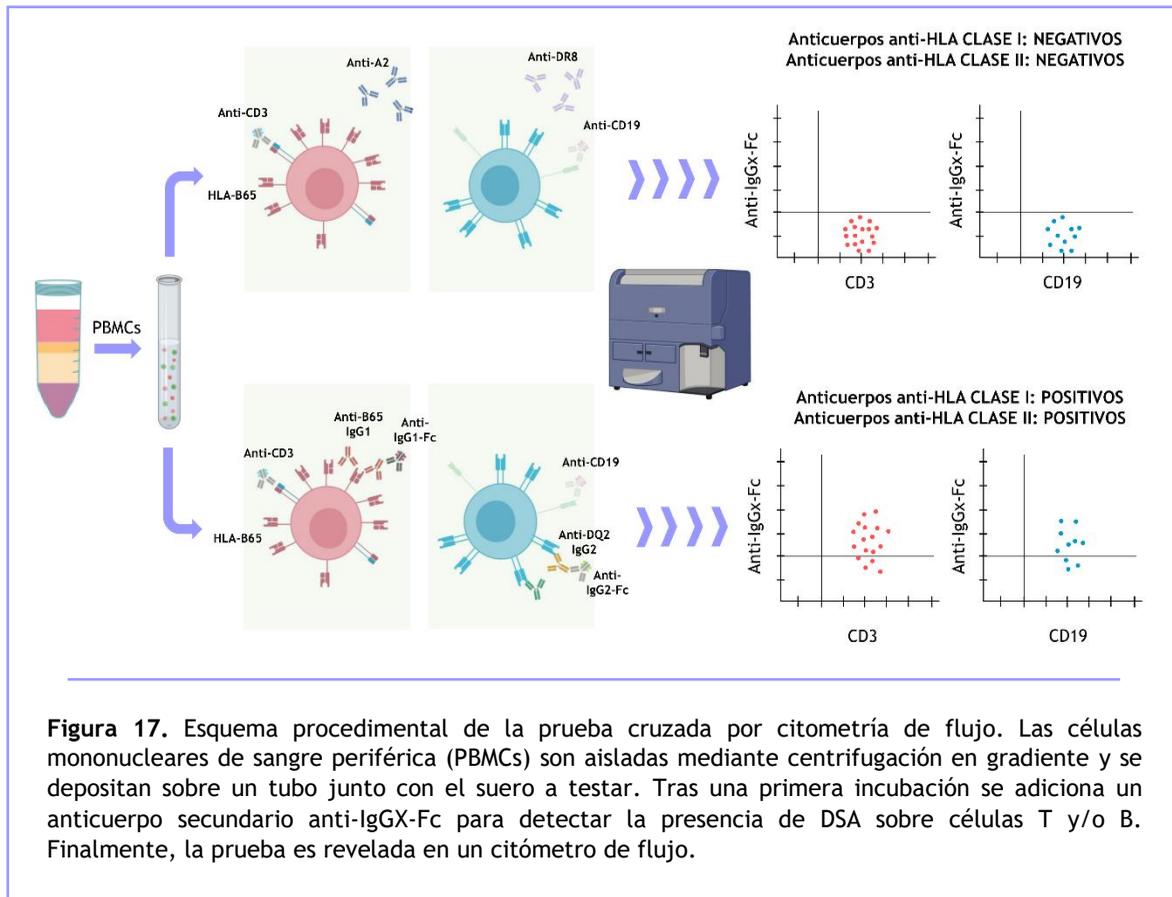


Figura 16. Esquema procedimental de la prueba cruzada por CDC. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) son aisladas mediante centrifugación en gradiente y se depositan en una placa Terasaki junto con el suero a testar. Tras una primera incubación se adiciona complemento de conejo, que lisa las células, en caso de que el suero contenga DSA. Finalmente, la prueba es revelada en el microscopio con la utilización de un colorante vital.

Una vez estandarizada la prueba cruzada por CDC comenzó a utilizarse de manera rutinaria en los laboratorios de histocompatibilidad para identificar los anticuerpos citotóxicos presentes en el suero de los pacientes en lista de espera de trasplante a partir de la utilización de grupos celulares de tipaje HLA conocido y ha sido la base para la identificación de anticuerpos anti-HLA durante casi tres décadas. Determinadas desventajas apartaron a la prueba cruzada por CDC del cribado habitual de anticuerpos, como la dependencia de la disponibilidad y viabilidad de las células utilizadas o su baja sensibilidad, a pesar de haber introducido ciertas modificaciones que pretendían solucionar o mejorar los resultados, como prolongar los tiempos de incubación, el uso de

un anticuerpo secundario (64), de 1,4-ditiotreitol (DTT) o el calentamiento de los sueros para eliminar falsos positivos por IgM (65) y la separación de células T y B para diferenciar positividad de anticuerpos frente a HLA de Clase I o II, respectivamente (66). Debido a que es el único ensayo funcional disponible en muchos centros, aún persiste como prueba final de compatibilidad en el momento justo antes del trasplante.



En los años 80, la citometría de flujo fue introducida en la práctica rutinaria para la determinación de la presencia de anticuerpos anti-HLA. El test consistía en incubar las

células del donante o, al igual que en la prueba cruzada por CDC, un grupo de células de tipaje HLA conocido, con el suero del receptor y añadir un anticuerpo monoclonal secundario conjugado con un fluorocromo que se uniera de forma específica a la fracción Fc de la IgG humana (Figura 17). Este anticuerpo secundario permitía detectar la unión antígeno HLA-anticuerpo, en el caso de que en el suero del receptor hubiera anticuerpos anti-HLA dirigidos frente a las células con las que se había realizado la incubación. La combinación del anticuerpo anti-Fc-IgG con otros anticuerpos que detectaban marcadores específicos de determinados tipos celulares (CD3 o CD19) permitía diferenciar además entre anticuerpos frente a HLA de Clase I y/o II. La lectura del resultado se realizaba en un citómetro de flujo y la positividad se expresaba como el canal medio de fluorescencia. La principal ventaja con respecto a la CDC era el aumento en la sensibilidad para la detección (67). Sin embargo, al no ser un ensayo funcional, no era posible diferenciar entre anticuerpos citotóxicos o no citotóxicos, pero sí era posible discriminar entre diferentes subclases de IgG1-4 o entre IgG e IgM, simplemente con modificar la especificidad del anticuerpo monoclonal secundario utilizado.

A partir de los años 90 comenzaron a desarrollarse los ensayos de fase sólida. El primero en aparecer fue una modificación del convencional ELISA o *enzyme-linked immunosorbent assay* (68). En el ELISA modificado, las glicoproteínas HLA, obtenidas a partir de líneas celulares transformadas con el virus de Epstein Barr, eran inmunoprecipitadas e inmovilizadas en los pocillos de las placas. El suero a testar se añadía entonces a los pocillos y los anticuerpos anti-HLA se unían, en caso de estar presentes, a sus dianas en las moléculas HLA. Un anticuerpo secundario anti-Fc-IgG conjugado con una molécula reportera, como la fosfatasa alcalina, y su acción sobre un sustrato, revelaba el resultado de la reacción (Figura 18). El ELISA era más sensible que la CDC para detectar los anticuerpos anti-HLA (69) y no dependía de la disponibilidad de células de donantes altruistas, sin embargo, pronto entró en desuso, cuando se produjo toda la expansión de

los ensayos basados en bolas utilizando el fluorocitómetro Luminex® a principios del siglo XXI, los cuales se han erigido como el “gold-standard” actual para la detección de anticuerpos anti-HLA (70).

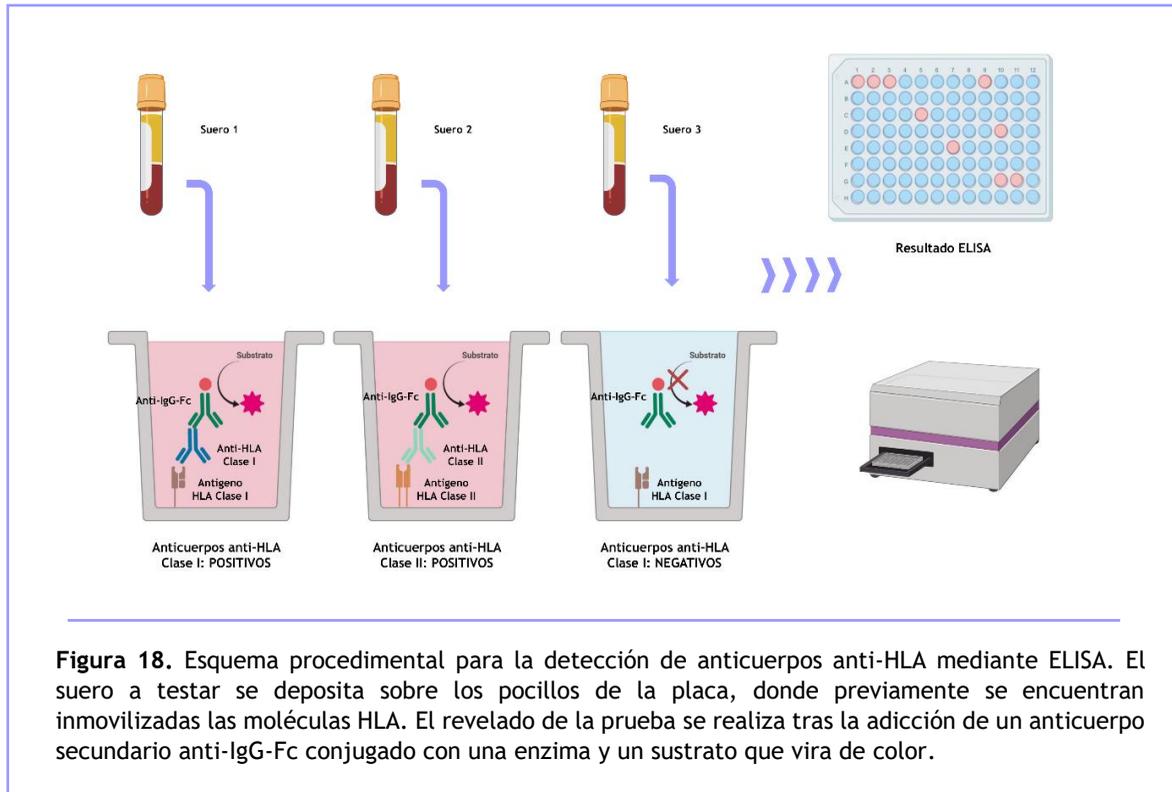
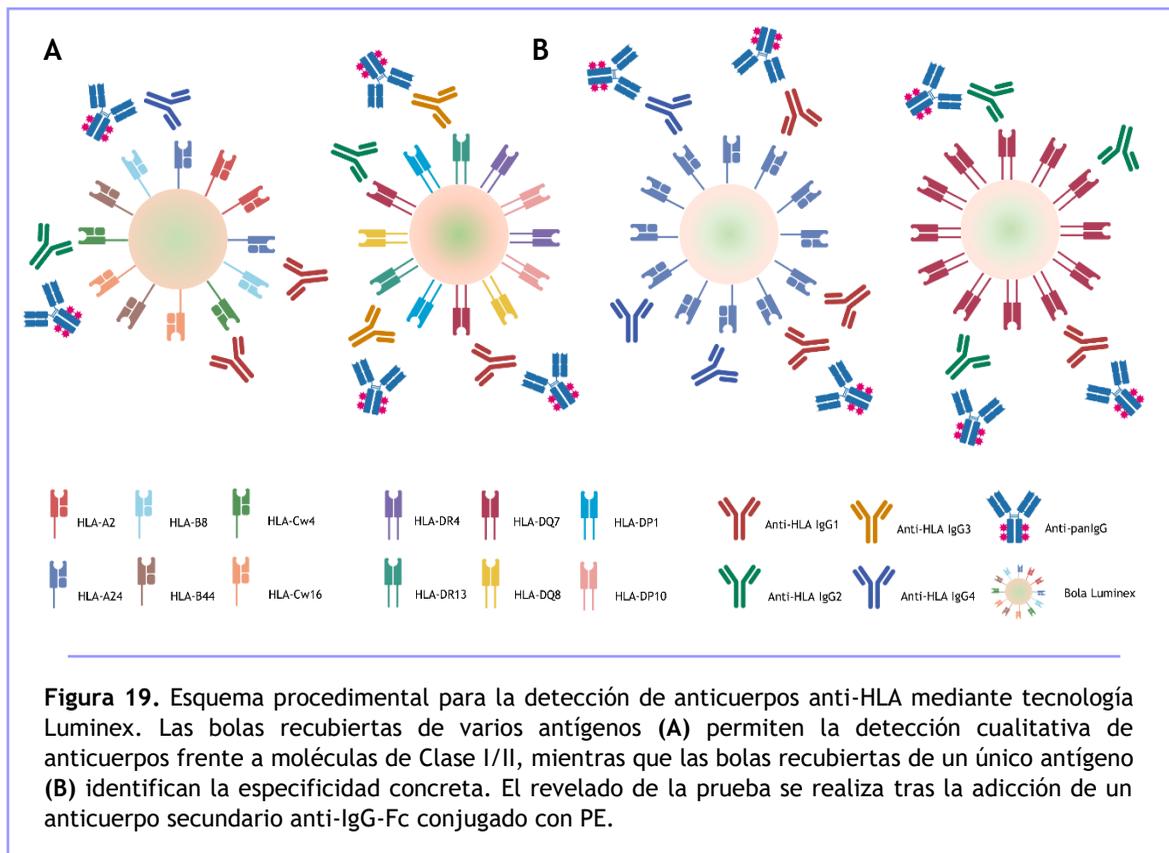


Figura 18. Esquema procedimental para la detección de anticuerpos anti-HLA mediante ELISA. El suero a testar se deposita sobre los pocillos de la placa, donde previamente se encuentran inmovilizadas las moléculas HLA. El revelado de la prueba se realiza tras la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG-Fc conjugado con una enzima y un sustrato que vira de color.

Los ensayos que utilizan la tecnología Luminex consisten en el empleo de múltiples micro-bolas de poliestireno recubiertas de una mezcla (Mixed) o un único tipo de antígeno (single antigen bead-SAB) HLA purificado. Cada bola se diferencia de otra porque presenta una proporción particular de dos fluorocromos que producen una señal única que es detectada en el fluorocitómetro Luminex. El procedimiento del ensayo consiste en la incubación del suero del paciente con la mezcla de bolas. Si el paciente presenta

anticuerpos anti-HLA, éstos se unirán a sus antígenos diana sobre las bolas. En una segunda incubación, un anticuerpo anti-Fc-IgG conjugado con ficoeritrina (PE) detectará la unión antígeno-HLA-anticuerpo (Figura 19).

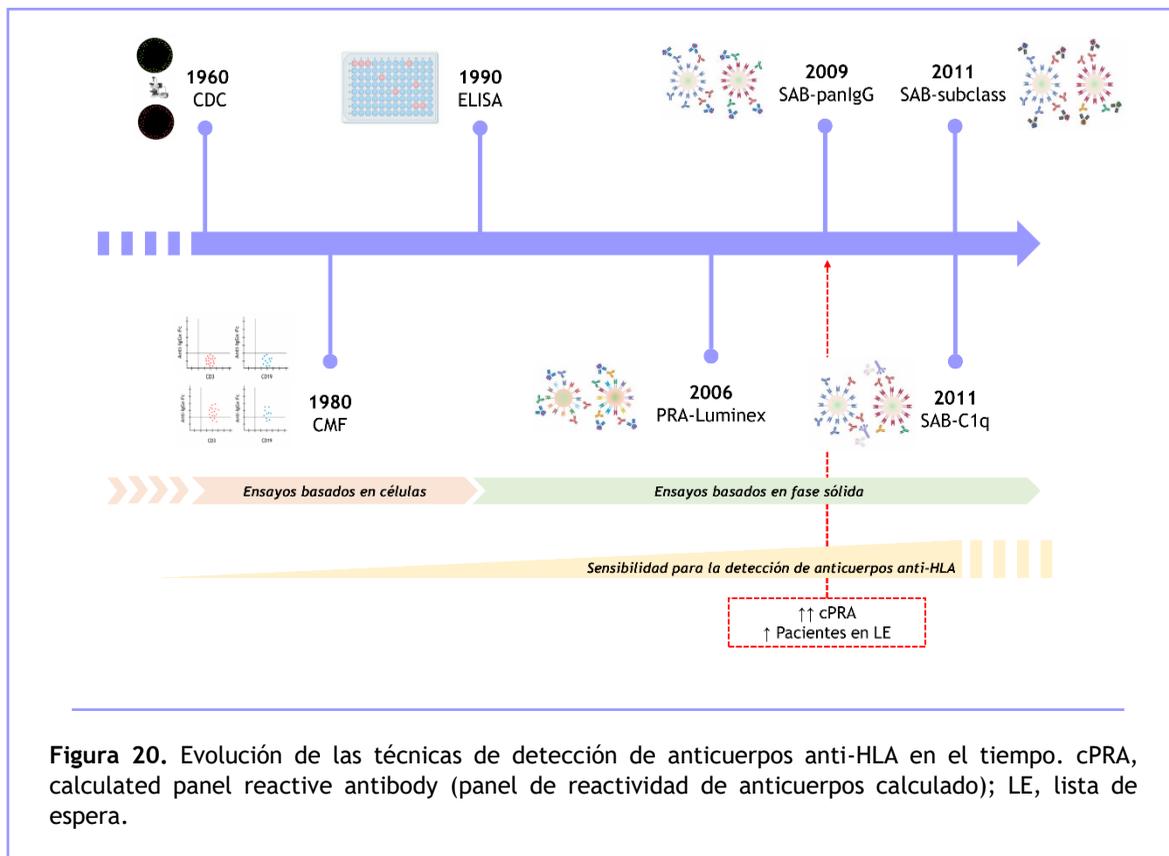


Existen tres niveles de detección: en el primero, se detecta la presencia de anticuerpos frente a moléculas HLA de Clase I y/o II, mediante el uso de bolas recubiertas con mezclas de antígenos obtenidas a partir de líneas de células linfoblastoides; en el segundo, es posible detectar la presencia de anticuerpos frente a grupos de antígenos HLA de Clase I o de Clase II, mediante el uso de bolas derivadas de una única línea celular;

en el tercero, se identifican individualmente aquellas especificidades HLA para las que el suero presenta anticuerpos gracias al uso de bolas que están recubiertas con un único tipo de molécula HLA producida de forma recombinante (70). La plataforma Luminex presenta dos láseres, el primero excita a una longitud de onda de 630 nm la mezcla de fluorocromos presente en cada bola y por tanto identifica cada bola de forma individual, el segundo excita a una longitud de onda de 532 nm la PE que está conjugada al anticuerpo secundario y por tanto identifica si se ha producido la unión antígeno-HLA-anticuerpo. El grado de fluorescencia emitido en conjunto se expresa como valor de intensidad de fluorescencia media o MFI. Así es posible detectar de manera altamente sensible y reproducible, en el suero del paciente, la presencia de anticuerpos y además identificar la especificidad o especificidades HLA frente a las que van dirigidos en un sencillo procedimiento de no más de 3 horas de duración. A partir de los anticuerpos anti-HLA detectados es posible realizar una *VXM* o *virtual cross-match* con los datos del tipaje de un donante concreto.

En los últimos años, el ensayo SAB, como método de identificación de anticuerpos anti-HLA, ha revolucionado los algoritmos de intercambio de aloinjertos para los pacientes que esperan un trasplante de órgano sólido, gracias a la realización de una *VXM* no-invasiva (70), con el objetivo de evitar o prevenir el daño sobre el aloinjerto que podrían causar los anticuerpos anti-HLA indetectables por otras técnicas menos sensibles, como la CDC (71, 72), que poco a poco está siendo reemplazada por la *VXM*. Sin embargo, la alta sensibilidad del ensayo SAB ligada a la premisa de que la presencia de cualquier anticuerpo supone un riesgo inaceptable independientemente de sus propiedades, ha limitado el acceso al trasplante de los pacientes sensibilizados, incrementando el número de especificidades HLA positivas y, por tanto, prohibidas y prolongando excesivamente su tiempo en lista de espera (Figura 20) (73). Aunque la implementación de los ensayos de fase sólida ha reducido la incidencia de rechazo (74, 75), el impacto de los anticuerpos

anti-HLA detectados únicamente por estos ensayos todavía supone objeto de discusión y, de hecho, una proporción de pacientes trasplantados con DSA y resultado negativo de la prueba cruzada por CDC, presentan evoluciones aceptables del aloinjerto (76-78), evidenciando que no todos los DSA son igual de deletéreos (72, 79).



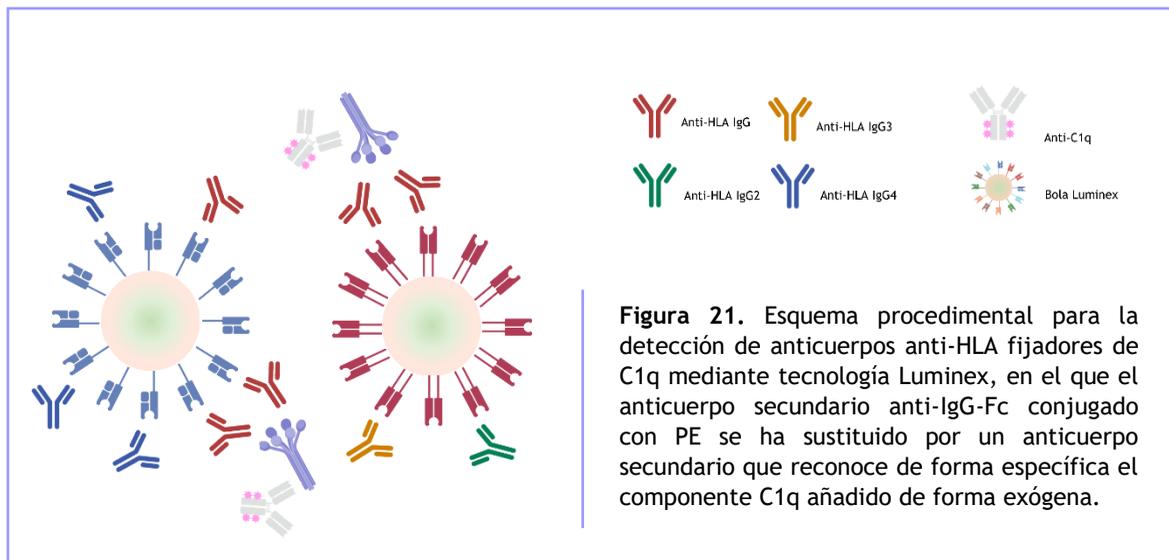
Ciertos aspectos técnicos del ensayo SAB parecen ser los responsables de no poder discriminar entre los anticuerpos clínicamente relevantes de los más inocuos (80). Además, a pesar de que la prohibición total de cualquier DSA en el pre-trasplante es, sin duda, la estrategia más ventajosa, no siempre es factible. En ausencia de información

concerniente a las propiedades funcionales y con el propósito de mejorar el consolidado algoritmo restrictivo para el intercambio de órganos, el riesgo inmunológico de los anticuerpos anti-HLA se ha estratificado según su valor MFI (79, 81-83), asumiendo que este valor es una estimación fiable del nivel de anticuerpos. Aunque el ensayo SAB no está aprobado como método cuantitativo y no existe un consenso universal sobre el umbral que define un anticuerpo como deletéreo, muchos centros trasplantadores consideran todas aquellas incompatibilidades HLA frente a las que existen anticuerpos con valores MFI por encima de 5.000 como totalmente inaceptables (84-87).

Varios estudios han demostrado una correlación directa entre valores MFI altos de los DSA y un incremento en la incidencia de ABMR y fallo prematuro del aloinjerto (88-90). No obstante, algunos aspectos metodológicos pueden conducir a estimaciones muy alejadas del nivel real de los aloanticuerpos (91), hecho que sugiere que el valor MFI no es siempre un método preciso para determinar su riesgo. El efecto prozona es el fenómeno más común por el que altos títulos de anticuerpos se detectan como anticuerpos con valores bajos de MFI (<5.000). Este efecto, particularmente frecuente en los pacientes altamente sensibilizados, enmascara especificidades potencialmente peligrosas. De manera similar, anticuerpos prohibidos considerados como perjudiciales debido a su valor MFI (>5.000) podrían no ser tan patológicos al no estar altamente concentrados (91).

Más allá del valor MFI, el ensayo SAB-C1q se ha propuesto como una herramienta para discriminar el subconjunto de anticuerpos capaces de unir C1q y valorar su potencial patogénico, teniendo en cuenta que la cascada del complemento es la principal vía de daño mediado por anticuerpos (59). El ensayo SAB-C1q (Figura 21) no es sino una modificación al ensayo SAB-panIgG, que incluye un paso previo para eliminar el complemento endógeno del suero a testar y la sustitución del anticuerpo secundario anti-Fc-IgG conjugado con PE por un anticuerpo secundario que se una a la fracción C1q del

complemento, añadido de forma exógena (92). Hasta ahora, algunos autores han descrito una estrecha relación entre la presencia de DSA fijadores de C1q y el riesgo de pérdida del aloinjerto (93-95). Entre ellos, Molina y cols. (96), evaluando retrospectivamente el impacto de los DSA y su capacidad de unir C1q en una cohorte de 389 pacientes trasplantados de riñón, llegaron a la conclusión de que la presencia de DSA fijadores de C1q y no la presencia de DSA no fijadores de C1q, constituía un factor predictor independiente de la supervivencia del aloinjerto renal. A pesar de estos resultados, todavía no se ha esclarecido si este mayor riesgo es debido al alto nivel del DSA o a su propia capacidad para unir C1q (90, 97). De hecho, parece haber una relación directa entre la capacidad de unir complemento de los anticuerpos anti-HLA y su fuerza (91, 96, 98).



Como ya se ha expuesto anteriormente, los principales mecanismos efectores a través de los que los aloanticuerpos pueden inducir daño en los aloinjertos trasplantados incluyen la activación celular para promover proliferación e inflamación, el desarrollo de

funciones mediadas por los receptores-Fc y principalmente, la activación del sistema del complemento (45, 99). Dado que las cuatro subclases de IgG presentan diferentes propiedades estructurales y funcionales (44), desencadenando diferentes mecanismos patológicos de daño del aloinjerto, las cuatro subclases de IgG deben producir diferentes fenotipos de daño. Así, Lefaucheur y cols. (100) publicaron que la presencia de IgG3 como DSA inmunodominante (iDSA) conducía a ABMR agudo con incremento del daño microvascular y presencia de depósitos de C4d, mientras que la presencia de IgG4 como iDSA conducía a ABMR subclínico con predominancia de lesiones crónicas. Además, este grupo mostró que los pacientes con IgG3-iDSA tenían una supervivencia del aloinjerto renal significativamente inferior en relación a cuando se detectaba la presencia de otras subclases de IgG. Más recientemente, Hamdani y cols. (101) en una pequeña cohorte de pacientes pediátricos trasplantados de riñón mostraron que la presencia de IgG3-DSA estaba independientemente asociada con disfunción del injerto. Todos estos hallazgos sugieren el valor añadido que podría tener la detección de las subclases de IgG como biomarcador inmunológico predictor de la evolución de los aloinjertos trasplantados.

Por tanto, bajo todas estas premisas, el presente trabajo de tesis doctoral pretendía investigar las características de los anticuerpos anti-HLA circulantes en una cohorte de pacientes altamente sensibilizados en lista de espera de trasplante renal, incluyendo el valor MFI (neto y diluido 1:16), la capacidad de unir C1q y el perfil de subclases de IgG1-4, con el objetivo de mejorar el conocimiento sobre las relaciones entre las diferentes propiedades de los anticuerpos, principales biomarcadores de la evolución del trasplante, e integrarlas. Una vez estudiada la relación entre las características de los anticuerpos anti-HLA proporcionadas por los diferentes ensayos de detección disponibles, se planteó, además, evaluar prospectivamente el impacto de la presencia de DSA no-fijadores de C1q preformados sobre la evolución del aloinjerto renal. Para ello, se caracterizó la distribución de subclases de IgG antes y después del trasplante y se

analizó el efecto de los DSA no fijadores de C1q sobre la aparición de eventos de rechazo y la supervivencia del aloinjerto con respecto a una cohorte de pacientes trasplantados con anticuerpos anti-HLA no-DSA, empleada como grupo control.



Hipótesis

La fuerza, medida como valor de intensidad de fluorescencia media o MFI de los anticuerpos dirigidos frente a las moléculas HLA, su capacidad para activar la cascada del complemento por la vía clásica, a través de su unión al componente C1q vía Fc, y el perfil de subclases de IgG1-4 que componen cada una de las especificidades de anticuerpos anti-HLA identificadas, son propiedades que pueden ser caracterizadas mediante las técnicas de detección por ensayos de fase sólida disponibles y, de forma independiente, estratificar el riesgo inmunológico de un anticuerpo. Dichas propiedades están relacionadas entre sí y además están relacionadas con la evolución del aloinjerto renal trasplantado.



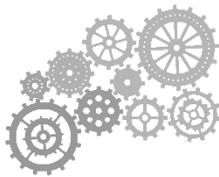
Objetivos

El objetivo general de este proyecto de tesis doctoral fue:

Buscar marcadores inmunológicos pronósticos de la evolución de injertos trasplantados.

Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Investigar las características de los anticuerpos anti-HLA preformados en una cohorte de pacientes altamente sensibilizados y en lista de espera de trasplante renal, incluyendo: el valor MFI (en el suero neto y diluido), la capacidad de unir C1q y el perfil de subclases de IgG1-4, utilizando los ensayos de fase sólida disponibles y sus modificaciones y establecer relaciones entre dichas propiedades.
- Evaluar prospectivamente el impacto sobre la evolución del aloinjerto renal de las características de los anticuerpos anti-HLA preformados, incluyendo: capacidad de unir C1q y perfil de subclases de IgG1-4, en una pequeña cohorte de pacientes trasplantados con DSA.



Materiales y Métodos

Estudio de las características de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida

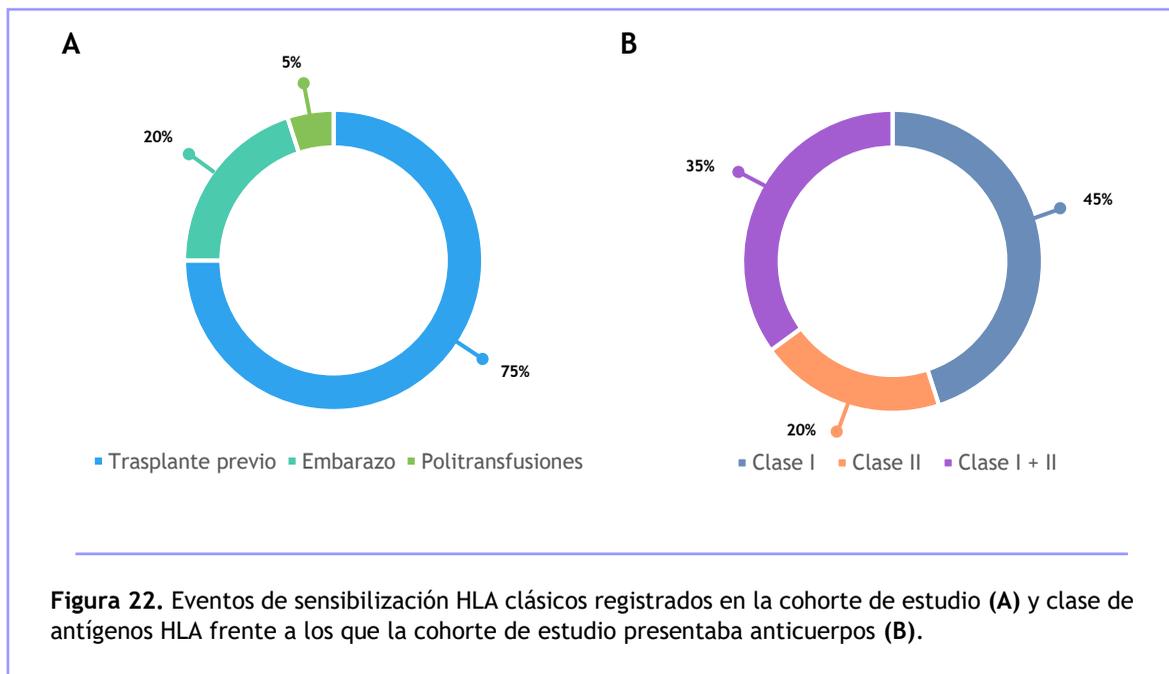
Muestras de suero de la cohorte de estudio

Las muestras de suero utilizadas para el estudio de las propiedades de los anticuerpos anti-HLA pertenecían a 20 pacientes altamente sensibilizados, es decir, con un panel de reactividad de anticuerpos calculado (cPRA) igual o superior al 75%, en lista de espera de trasplante renal en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. La cohorte de estudio estaba compuesta por 11 (55%) hombres y 9 (45%) mujeres y la media de edad del grupo fue de $47,35 \pm 11,5$ años. En el momento del análisis de los sueros, el valor medio de cPRA de los pacientes fue de $97,5 \pm 4,69$ según la base de datos americana *Organ Procurement and Transplantation Network*. Únicamente se analizaron pacientes altamente sensibilizados por su complejidad inmunológica, que, a menudo, limita su acceso al trasplante y por las características que muestran los anticuerpos en estos pacientes, siendo más frecuente la posibilidad de encontrar efectos prozona.

Los eventos de sensibilización-HLA clásicos en estos pacientes, registrados en las bases de datos del Hospital Universitario Reina Sofía, fueron: trasplante previo en 15 (75%) pacientes, dos de los cuales habían sido además poli-trasfundidos; embarazo en 4 (20%) pacientes y múltiples transfusiones sanguíneas en 1 (5%) paciente (Figura 22.A). Entre la cohorte de estudio, 9 (45%) pacientes presentaron anticuerpos anti-HLA dirigidos frente a moléculas de Clase I, 4 (20%) frente a moléculas de Clase II y 7 (35%) frente a moléculas de Clase I + II (Figura 22. B).

Las muestras de suero de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio estaban conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la seroteca de la UGC de Inmunología y fueron analizadas para

detectar las especificidades de anticuerpos anti-HLA mediante el ensayo estandarizado SAB-panIgG y el SAB modificado para identificar la composición de subclases de IgG1-4 (SAB-subclass). Todos los análisis se realizaron utilizando un único lote de reactivos.



Este estudio fue realizado de acuerdo a la Declaración de Helsinki y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Reina Sofía (ref. 2465). Todos los pacientes del estudio proporcionaron consentimiento escrito informado.

Detección y caracterización de los anticuerpos anti-HLA mediante el ensayo estandarizado SAB-panIgG: suero neto y diluido

Las muestras de suero fueron analizadas para detectar la presencia de anticuerpos circulantes frente a moléculas HLA-A, -B, -Cw, -DR, -DP y -DQ, mediante el ensayo SAB-

panlgG (LABScreen, One Lambda, Inc.) en plataforma Luminex, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (ver Anexo 1). Como software de adquisición de datos se utilizó el programa Luminex 100 IS y como software de análisis de datos se utilizó el programa Fusion 3.3 (One Lambda, Inc).

Dado que Tambur y cols. (91) y Zeevi y cols. (98) habían descrito que la mayoría de las especificidades de anticuerpos anti-HLA con efecto prozona alcanzan su valor más elevado de MFI en una dilución 1:16 del suero, también se analizaron todas las muestras de suero diluidas 1:16 (ver Anexo 3), con el objeto de determinar el valor real MFI y desenmascarar los posibles efectos prozona. Todas las diluciones se llevaron a cabo con tampón fosfato salino (PBS).

Se estableció como punto de corte para considerar un anticuerpo positivo, un valor $MFI \geq 1.000$. Las especificidades de anticuerpos anti-HLA positivas se clasificaron en débiles ($MFI < 5.000$) o fuertes ($MFI \geq 5.000$).

Detección y caracterización de los anticuerpos anti-HLA por el ensayo estandarizado SAB-panlgG: pre-tratamiento con calor y EDTA

Las muestras de suero, adicionalmente, fueron pre-tratadas para desenmascarar los posibles efectos inhibitorios causados por factores diferentes al nivel de anticuerpos (efecto inhibitorio causado por complemento y presencia de IgM, principalmente). El efecto prozona y la interferencia por complemento/IgM se han empleado en la literatura científica como conceptos indistintos. Sin embargo, Berth y cols. (102) las describen como entidades separadas. Para ello, las muestras de suero netas fueron, por una parte, calentadas a 56 °C durante 30 minutos y luego analizadas por el ensayo estandarizado SAB-panlgG según el protocolo proporcionado por el fabricante (ver Anexos 1 y 3). Por otra parte, las muestras de suero neto fueron pre-tratadas con EDTA (ácido

etilendiaminotetraacético) a una concentración final de 25 mM (91, 103) y a continuación analizadas por el ensayo estandarizado SAB-panIgG, también de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante (ver Anexos 1 y 3).

Caracterización de la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA por el ensayo estandarizado SAB-C1q

La capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA fue determinada utilizando el ensayo estandarizado SAB-C1q (One Lambda, Inc.) sobre muestras de suero neto según el protocolo proporcionado por el fabricante (ver Anexo 2). Todas las muestras de suero neto fueron pre-calentadas a 56 °C durante 30 minutos tal y como se indica en el protocolo citado para eliminar el componente C1q endógeno, dado que dicho componente se añade de forma exógena más adelante en el test. Aquellos anticuerpos con un valor MFI \geq 500 se consideraron fijadores de C1q.

Ensayo IgG1-4 SAB-subclass para determinar el perfil de subclases

El ensayo SAB-subclass se llevó a cabo tal y como previamente había sido descrito (104). Para ello, el ensayo estandarizado SAB-panIgG se modificó, reemplazando la inmunoglobulina de cabra secundaria anti-panIgG humana conjugada con PE por anticuerpos monoclonales específicos dirigidos frente a cada una de las subclases de IgG1-4 (Figura 23; IgG1 clon HP6001, IgG2 clon 31-7-4, IgG3 clon HP6050, IgG4 clon HP6025; Southern Biotech). Para llevar a cabo la técnica, 20 μ L de suero neto fueron mezclados con 2,5 μ L de las bolas recubiertas con antígenos HLA purificados (LABScreen, One Lambda, Inc.) durante 30 minutos en oscuridad, agitación y a temperatura ambiente. Tras esta primera incubación se realizó un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo no unido a las bolas, utilizando 150 μ L de tampón de lavado (One Lambda, Inc.) y centrifugando durante 5 minutos a 1.300 g. Tras descartar el sobrenadante, se añadieron

100 μ L de cada uno de los anticuerpos monoclonales secundarios conjugados con PE para detectar de forma específica las subclases IgG1-4. Cada una de las 4 reacciones se llevó a cabo de forma independiente. Las concentraciones de anticuerpo monoclonal utilizadas fueron las mismas que ya habían descrito otros con anterioridad (ver Anexo 4) (100). El anticuerpo secundario se incubó durante 30 minutos en oscuridad, agitación y a temperatura ambiente. De nuevo, se realizó un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo secundario no unido, utilizando 150 μ L de tampón de lavado (One Lambda, Inc.) y centrifugando durante 5 minutos a 1.300 g. Finalmente, se añadieron 80 μ L de PBS para su adquisición en la plataforma Luminex. En este test, se consideraron reacciones positivas todas aquellas que mostraron un valor MFI \geq 500. Adicionalmente, todos los sueros fueron analizados mediante el ensayo SAB-subclass tras su dilución previa 1:16 en PBS (ver Anexo 3), con el objeto de detectar posibles efectos prozona en cada una de las subclases de IgG.

Análisis estadístico

Para la descripción de las variables continuas se utilizaron la media y las desviaciones estándar (SD) y para la descripción de las variables discretas, el número total y la frecuencia. Para la comparación de datos cualitativos, se utilizó el test χ^2 , mientras que para la comparación de datos cuantitativos paramétricos se utilizó el test T de Student. El test de Pearson fue utilizado como test de correlación. La correlación se clasificó según el coeficiente de correlación (r) obtenido en: débil ($r < 0,5$), moderada ($0,5 > r < 0,75$) y fuerte ($r > 0,75$). Para realizar los análisis estadísticos se tuvieron en cuenta los valores de MFI brutos, dada la no estandarización de alguna de las técnicas utilizadas. Todos los sueros del estudio fueron incluidos en los análisis. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

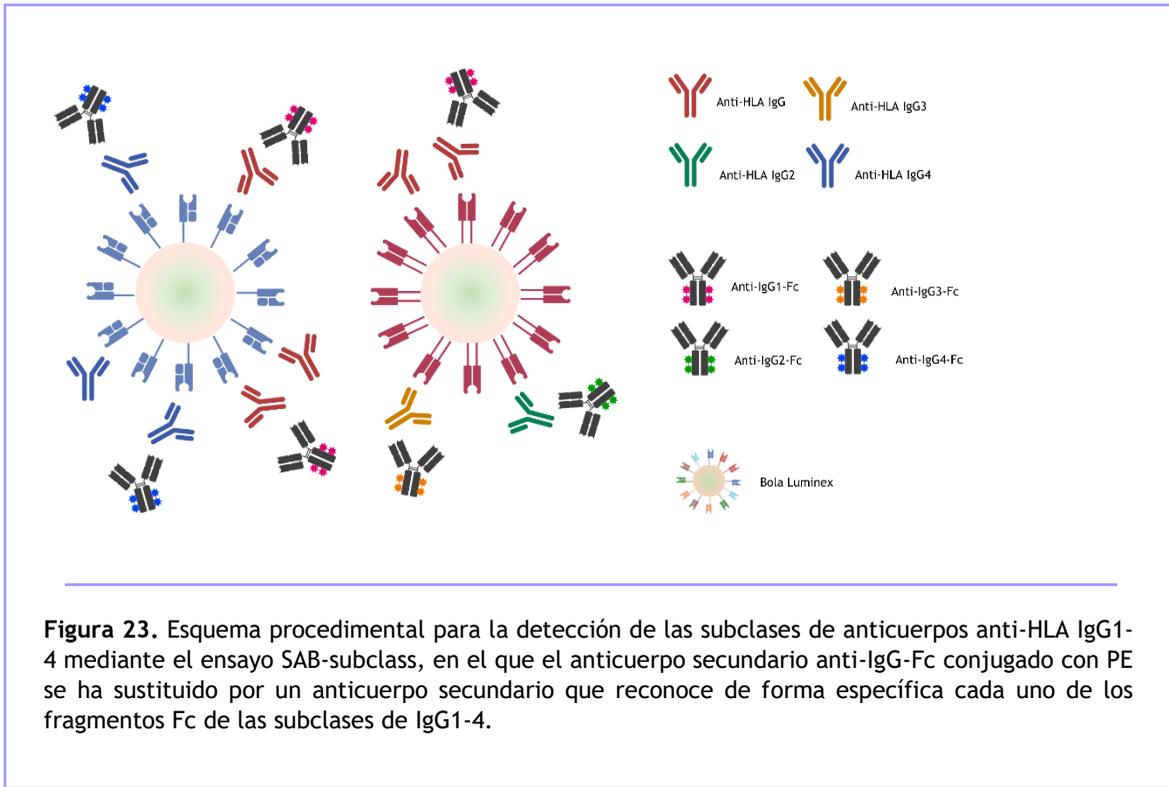


Figura 23. Esquema procedimental para la detección de las subclases de anticuerpos anti-HLA IgG1-4 mediante el ensayo SAB-subclass, en el que el anticuerpo secundario anti-IgG-Fc conjugado con PE se ha sustituido por un anticuerpo secundario que reconoce de forma específica cada uno de los fragmentos Fc de las subclases de IgG1-4.

Estudio de la evolución del aloinjerto renal trasplantado según las propiedades de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida

Selección de pacientes y diseño del estudio

De 297 pacientes trasplantados de riñón único en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba entre Enero de 2013 y Abril de 2018, se incluyeron un total de 72 (24,24%) en los que se había detectado la presencia de anticuerpos anti-HLA circulantes en el momento del trasplante. De estos 72 pacientes, 14 (19,4%) fueron trasplantados con DSA preformados no fijadores de C1q, constituyendo el grupo de estudio DSA+, mientras que 58 (80,6%) fueron trasplantados con anticuerpos anti-HLA preformados no-DSA, constituyendo el grupo control DSA- (Figura 24). No se incluyeron aquellos pacientes cuya presencia de anticuerpos (débiles) fue secundaria a una patología inflamatoria crónica. La relevancia clínica de estos anticuerpos, aun considerando que pudieran ser DSA, es incierta (78).

El protocolo de inmunosupresión aplicado a todos los pacientes fue triple terapia consistente en un inhibidor de la calcineurina (tacrolimus), un inhibidor de la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina (micofenolato mofetilo o micofenolato sódico) y corticoides (prednisona). Dado el alto riesgo inmunológico, todos ellos recibieron terapia de inducción consistente en timoglobulina (1 mg/kg) durante los primeros 3 a 5 días o basiliximab (40 mg). Los TCMR agudos fueron tratados con bolos de esteroides durante tres días consecutivos. Los ABMR agudos fueron tratados normalmente con timoglobulina (4 dosis) o rituximab (4 dosis) y plasmaféresis.

Todos los trasplantes fueron realizados con donante isogrupo ABO y con resultado negativo para la prueba cruzada con células T + B por CDC. Este estudio fue llevado a cabo conforme a la Declaración de Helsinki y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Reina Sofía (ref. 2465) y todos los pacientes proporcionaron consentimiento informado escrito.

Detección y caracterización de los anticuerpos anti-HLA antes y después del trasplante

Para determinar las especificidades de anticuerpos anti-HLA positivas, las muestras de suero neto, antes y después del trasplante, se analizaron mediante el ensayo estandarizado SAB-panIgG (LABScreen, One Lambda, Inc.) en una plataforma Luminex (LABScan 100), usando el programa xPonent vs. 4.2 como software de adquisición y el programa Fusion 4.3 como software de análisis (One Lambda, Inc.). El ensayo fue realizado según el protocolo proporcionado por el fabricante (ver Anexo 1). Aquellos anticuerpos anti-HLA con valores MFI superiores a 1.000 fueron considerados positivos.

En el grupo DSA+ además se determinó la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA detectados en el suero antes y un año después del trasplante, para lo que se utilizó el ensayo estandarizado SAB-C1q (One Lambda, Inc.), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (ver Anexo 2). En este caso, todas las especificidades con un valor MFI por encima de 500 fueron consideradas C1q-positivas. Igualmente, en el grupo DSA+ se estudió el perfil de subclases de IgG1-4 que componían los anticuerpos anti-HLA detectados antes y un año después del trasplante. Para ello, se llevó a cabo el ensayo SAB-subclass, modificando el estandarizado SAB por reemplazamiento del anticuerpo secundario conjugado con PE, que, en este caso, detectaría de forma específica cada una de las subclases de IgG en cuatro reacciones independientes. Dicho

ensayo se llevó a cabo como anteriormente se había descrito (100), utilizando 100 μL de cada anticuerpo monoclonal dirigido frente a cada una de las subclases IgG1-4 (IgG1 clon HP6001, IgG2 clon 31-7-4, IgG3 clon HP6050, IgG4 clon HP6025; Southern Biotech; ver Anexo 4). Todas las especificidades con valores MFI superiores a 500 fueron consideradas positivas. Los análisis se realizaron utilizando un único lote de reactivos.

Función del aloinjerto renal

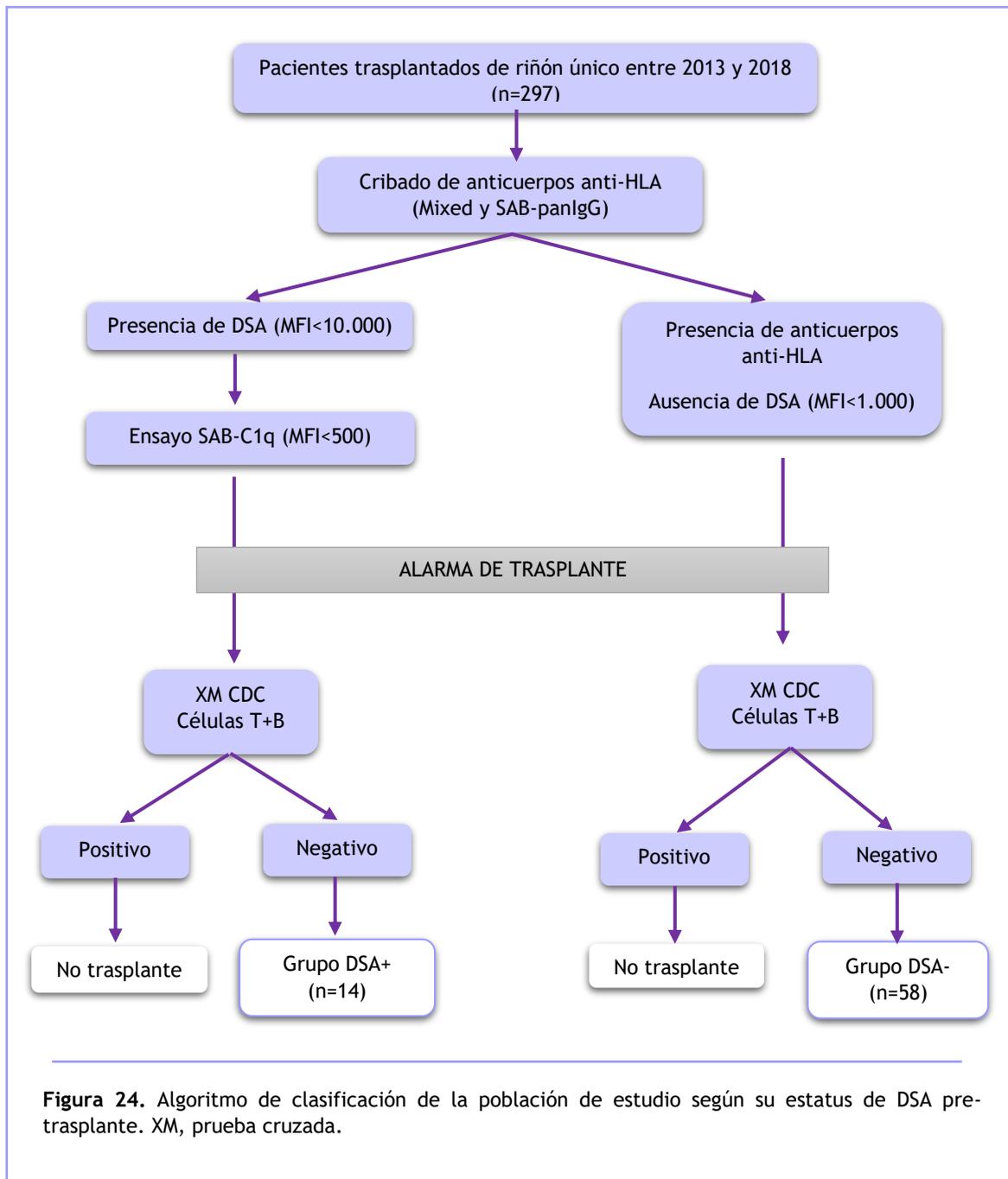
La función del aloinjerto renal fue evaluada, tanto en el grupo de estudio (DSA+), como en el grupo control (DSA-), a partir de los niveles séricos de creatinina (mg/dL) y proteínas en orina (mg/dL) a los 15 días y en el primer, tercer, sexto y doceavo mes tras el trasplante. También se evaluó el filtrado glomerular ($\text{mL}/\text{min}/\text{m}^2$) y el cociente proteína/ creatinina en orina (mg/mg) en los mismos intervalos de tiempo, así como el retraso en la función del injerto renal, definido como la necesidad de recibir diálisis durante la primera semana después del trasplante.

Los eventos de rechazo se identificaron, a lo largo de todo el periodo de seguimiento, según el informe de biopsia renal emitida por los patólogos locales siguiendo los criterios de Banff vigentes en cada momento (54, 105, 106). Las biopsias se realizaron siempre dentro de la práctica clínica habitual y en un contexto de disfunción del aloinjerto renal. La supervivencia del injerto fue analizada desde el momento del trasplante hasta el final del periodo de seguimiento.

Análisis estadístico

Para la descripción de variables cuantitativas continuas se utilizaron la media y la SD, mientras que para la descripción de variables cuantitativas discretas se utilizaron el número total y la frecuencia. El test χ^2 fue utilizado para comparar datos cualitativos.

Para el análisis de variables no paramétricas, se utilizaron los test U de Mann Whitney, y F de Fisher. El test Kolmogorov-Smirnov fue el test de normalidad utilizado. Para la comparación de datos cuantitativos pareados no paramétricos se utilizó el test de Wilcoxon. La supervivencia fue analizada considerando la pérdida del aloinjerto como evento de interés y representada en curvas Kaplan-Meier. La pérdida del aloinjerto fue definida como la vuelta a diálisis del paciente. Los datos de supervivencia fueron censurados en el momento del fallecimiento del paciente o pérdida en el seguimiento. Para comparar la supervivencia del aloinjerto entre el grupo de estudio y el grupo control se utilizó el test Log-rank. Todos los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.





Resultados

Estudio de las características de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida

Análisis de los anticuerpos anti-HLA panIgG en las muestras de suero neto y diluido 1:16

El ensayo estandarizado SAB-panIgG, llevado a cabo con las muestras de suero neto de los 20 pacientes HLA-sensibilizados en lista de espera de trasplante renal incluidos en el estudio, definió 1.236 (47,6%) especificidades de anticuerpos panIgG positivas (MFI \geq 1.000) de las 2.594 bolas-Luminex analizadas. Entre las 1.236 especificidades de anticuerpos positivas, 727 (58,8%) mostraron valores fuertes de MFI (MFI \geq 5.000) y 509 (41,2%) fueron clasificadas como especificidades débiles (Figura 25).

A continuación, el ensayo SAB-panIgG fue llevado a cabo con muestras de suero diluidas 1:16. La dilución desenmascaró la presencia de 49 especificidades de anticuerpos con valores de MFI fuertes que originalmente habían sido detectadas como negativas (Figura 25). Como resultado, un total de 1.285 especificidades de anticuerpos (1.236 detectadas en el suero neto más las 49 reveladas tras la dilución) fueron entonces consideradas positivas. Además, como se muestra en la Figura 25, 72 (14,1%) de los 509 anticuerpos débilmente positivos en el suero neto se convirtieron en especificidades fuertes tras la dilución. De forma similar, la dilución del suero aclaró la presencia de 114 (15,7%) especificidades fuertes. Por tanto, tras la dilución, un total de 235 (18,3%) especificidades de anticuerpos cambiaron dramáticamente su estatus: 121 de negativas o débiles a especificidades fuertes y 114 de fuertes a negativas.

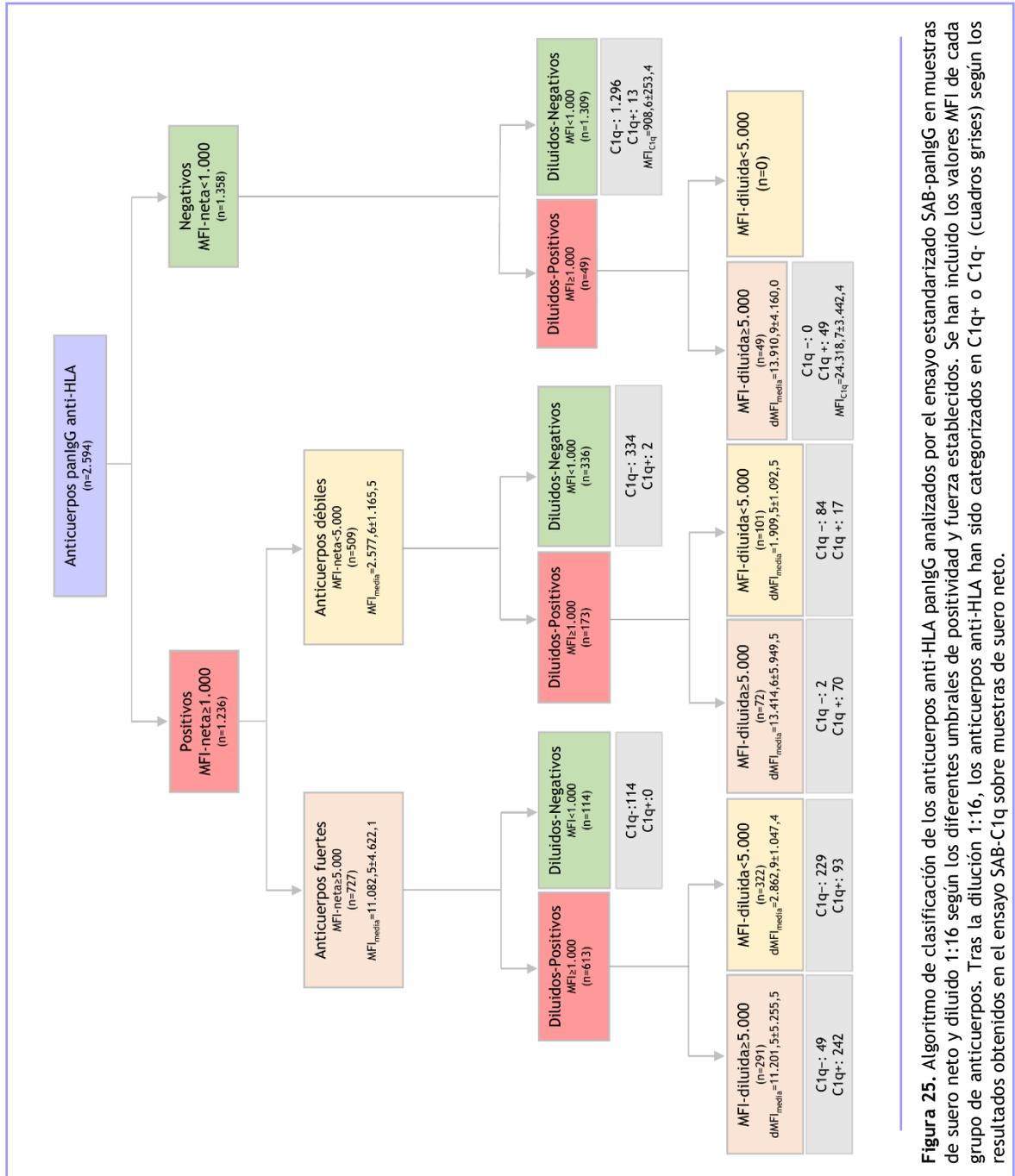


Figura 25. Algoritmo de clasificación de los anticuerpos anti-HLA panIgG analizados por el ensayo estandarizado SAB-panIgG en muestras de suero neto y diluido 1:16 según los diferentes umbrales de positividad y fuerza establecidos. Se han incluido los valores MFI de cada grupo de anticuerpos. Tras la dilución 1:16, los anticuerpos anti-HLA han sido categorizados en C1q+ o C1q- (cuadros grises) según los resultados obtenidos en el ensayo SAB-C1q sobre muestras de suero neto.

La Tabla 2 muestra detalles sobre las 1.285 especificidades de anticuerpos detectadas, de las cuales, 806 (62,7%) estaban dirigidas frente a moléculas de Clase I y 479 (37,3%) frente a moléculas de Clase II.

Tabla 2. Caracterización de los anticuerpos anti-HLA panIgG positivos según la molécula HLA frente a la que estaban dirigidos.

	Anticuerpos anti-HLA panIgG positivos (n=1.285) ^a
Dirigidos frente a moléculas HLA-Clase I, n (%)	806 (62,7)
<i>Frente a HLA-A, n (%)</i>	290 (22,6)
<i>Frente a HLA-B, n (%)</i>	436 (33,9)
<i>Frente a HLA-Cw, n (%)</i>	80 (6,2)
Dirigidos frente a moléculas HLA-Clase II, n (%)	479 (37,3)
<i>Frente a HLA-DR, n (%)</i>	210 (16,3)
<i>Frente a HLA-DP, n (%)</i>	67 (5,2)
<i>Frente a HLA-DQ, n (%)</i>	202 (15,7)

^aSuma de los 1.236 anticuerpos detectados en las muestras de suero neto y los 49 desenmascarados tras la dilución 1:16.

Análisis de la capacidad de unir C1q: efecto de la dilución 1:16, pre-tratamiento con EDTA y calor

Como otros autores anteriormente habían propuesto, se exploró la relación entre la capacidad de unir C1q de los anticuerpos y su fuerza, estimada como el valor MFI. Entre los 1,285 anticuerpos anti-HLA positivos predefinidos por el ensayo SAB-panIgG, 437 (36,8%) resultaron ser C1q-positivos. Se identificaron, además, 13 especificidades indetectables tanto en el ensayo SAB-panIgG con suero neto como con suero diluido 1:16 (Figura 25) que también fueron C1q-positivas, pero cuyo valor MFI en el ensayo SAB-C1q resultó ser bajo ($908,6 \pm 253,4$). No se detectó la presencia de ninguna subclase de IgG en estas 13 especificidades, de manera que se consideraron falsas reacciones C1q-

positivas. En ningún caso se atribuyó dicha reactividad C1q a la presencia de IgM aislada, dado el pre-tratamiento con calor del suero realizado en el ensayo SAB-C1q.

El valor MFI medio obtenido en el ensayo SAB-panIgG sobre muestras de suero neto de los anticuerpos capaces de unir C1q resultó ser significativamente más elevado que el de los incapaces de unir C1q ($9.204,6 \pm 6.302,3$ vs. $6.193,3 \pm 4.829,1$; $p < 0,001$). No obstante, la correlación entre el valor MFI obtenido en el ensayo SAB-panIgG y el obtenido en el ensayo SAB-C1q fue débil ($r_{\text{neto}} = 0,248$), tal y como se muestra en la Figura 26.A. Así, el 29,2% (138/473) de los anticuerpos capaces de unir C1q presentaban valores MFI débiles en el análisis del suero neto, mientras que el 53,9% (392/727) de los anticuerpos fuertes resultaron ser incapaces de unir C1q.

Como se esperaba, tras la dilución, la correlación entre la capacidad de unir complemento de los anticuerpos y su fuerza, estimada como valor MFI (Figura 26.B), mejoró considerablemente ($r_{\text{diluido}} = 0,817$). Entre las 138 especificidades C1q-positivas que presentaban valores de MFI bajos en el suero neto, dicho valor incrementó significativamente tras la dilución en 119 (86,2%) de ellas ($1.777,1 \pm 1.583,8$ vs. $13.747,3 \pm 5.228,6$; $p < 0,001$). Del mismo modo, el valor MFI de las 392 especificidades fuertes incapaces de unir C1q disminuyó significativamente tras la dilución ($10.149,1 \pm 4.082,3$ vs. $2.625,6 \pm 2.280,7$; $p < 0,001$).

La Figura 26 también muestra el efecto de los pre-tratamientos con calor (Figura 26.C) y con EDTA (Figura 26.D) sobre la correlación entre el valor MFI de los anticuerpos anti-HLA panIgG y su capacidad de unir C1q. Como se observa en la Figura 26, el pre-tratamiento de los sueros, tanto con EDTA como con calor, mejora la correlación con respecto a la que se obtiene con los sueros netos no-tratados ($r_{\text{calor}} = 0,699$ y $r_{\text{EDTA}} = 0,656$, respectivamente) y parece ser particularmente útil para eliminar el efecto prozona, pero no llega a ser una correlación tan fuerte como la obtenida con la dilución. Curiosamente,

la correlación que se obtuvo entre los valores MFI de los sueros pre-tratados con calor y los pre-tratados con EDTA fue prácticamente perfecta ($r = 0,952$, Figura 27), lo que indica que el efecto que producen ambos tratamientos sobre los sueros podría ser similar.

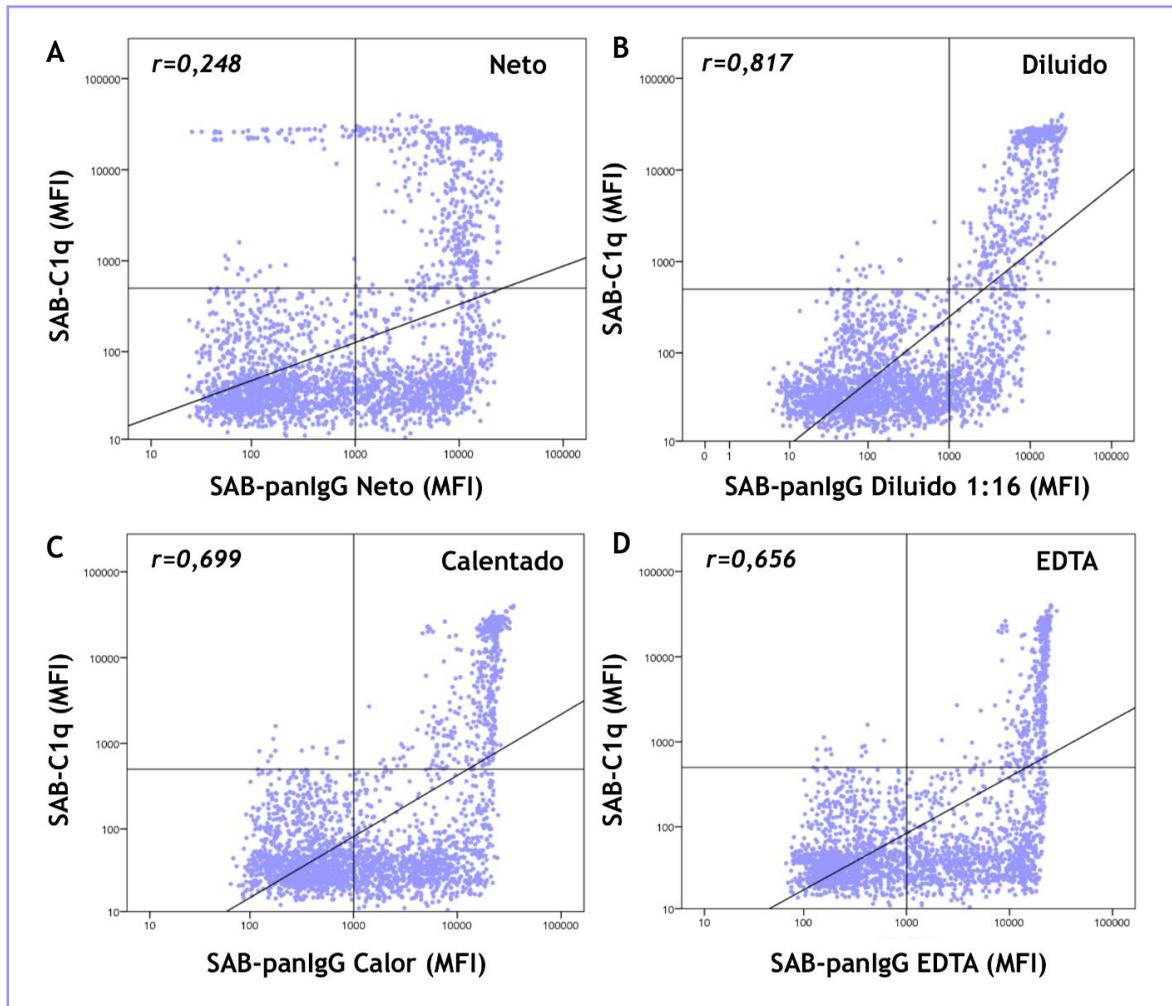
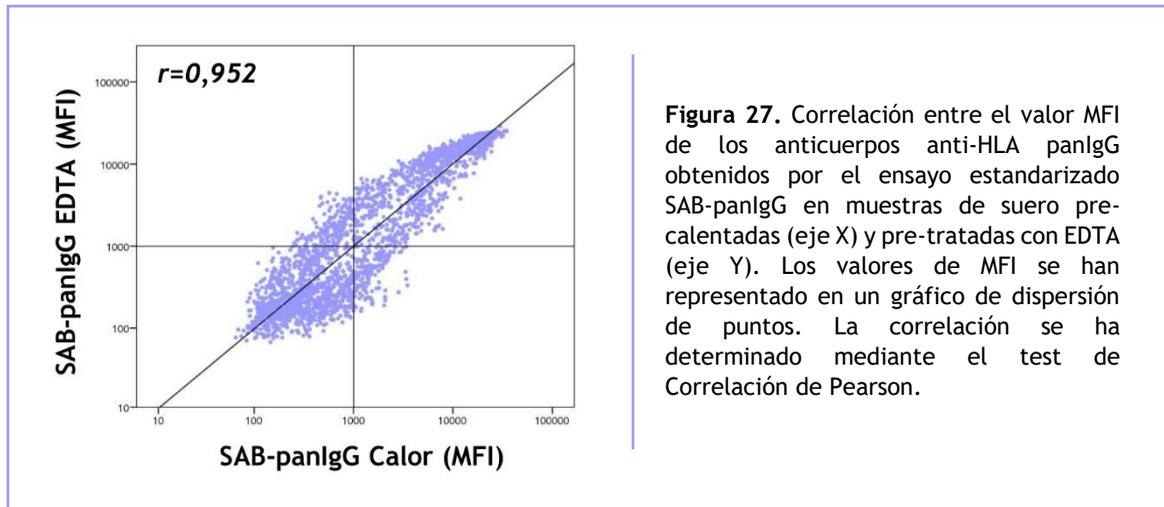


Figura 26. Correlación entre el valor MFI obtenido en el ensayo SAB-panIgG de las 2.594 bolas analizadas en muestras de suero neto (A), diluidas 1:16 (B), pre-tratadas con calor (C) y pre-tratadas con EDTA (D) y el valor MFI obtenido en el ensayo SAB-C1q. Los valores MFI se han representado en un gráfico de dispersión de puntos. La correlación se ha calculado utilizando el test de Correlación de Pearson.



Anticuerpos anti-HLA: subclases IgG1-4

El ensayo SAB-subclass se llevó a cabo para identificar la distribución de subclases de IgG1-4 dentro de las 1.285 especificidades de anticuerpos anti-HLA predefinidas por SAB-panIgG (Tabla 3). En 1.012 (78,8%) anticuerpos anti-HLA panIgG el análisis detectó la presencia de al menos una subclase de IgG1-4. De éstas, la IgG1 fue, con mucha diferencia, la subclase más frecuentemente identificada, estando presente en el 95,3% de los anticuerpos anti-HLA, seguida de IgG2 (54,7%), IgG3 (13,8%) e IgG4 (13,0%). En 273 (21,2%) especificidades de anticuerpos anti-HLA panIgG positivas no se detectó la presencia de ninguna subclase. Estas especificidades de anticuerpos, predeciblemente, presentaron valores MFI bastante bajos ($2.774,7 \pm 2.457,1$).

En relación a los patrones de subclases de IgG, 419 (41,4%) anticuerpos panIgG positivos estuvieron compuestos por subclases aisladas, mientras que los otros 593 (58,6%), por una combinación o mezcla de ellas. La combinación IgG1 + IgG2 fue la más frecuente, presente en el 37,2% de los anticuerpos, seguida de IgG1 aislada (36,9%). La

combinación de las 4 subclases de IgG (IgG1 + IgG2 + IgG3 + IgG4), así como de subclases incapaces o débilmente capaces de unir C1q (IgG4 y/o IgG2) fue un hallazgo poco común (1,3 y 1,1%, respectivamente). Todos los patrones identificados están descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Subclases IgG1-4 presentes en los anticuerpos anti-HLA panIgG identificadas por el ensayo SAB-subclass llevado a cabo en muestras de suero neto.

	Anticuerpos anti-HLA panIgG positivos (n=1.285)
Ninguna subclase detectada, n (%)	273 (21,2)
Alguna subclase detectada, n (%)^a	1.012 (78,8)
<i>IgG1, n (%)</i>	964 (95,3)
<i>IgG2, n (%)</i>	554 (54,7)
<i>IgG3, n (%)</i>	140 (13,8)
<i>IgG4, n (%)</i>	132 (13,0)
Patrones IgG1-4^a	
Subclases aisladas, n (%)	419 (41,4)
<i>IgG1 aislada, n (%)</i>	373 (36,9)
<i>IgG2 aislada, n (%)</i>	5 (0,5)
<i>IgG3 aislada, n (%)</i>	36 (3,6)
<i>IgG4 aislada, n (%)</i>	5 (0,5)
Mezcla de subclases, n (%)	593 (58,6)
<i>IgG1+IgG2, n (%)</i>	376 (37,2)
<i>IgG1+IgG3, n (%)</i>	22 (2,2)
<i>IgG1+IgG4, n (%)</i>	21 (2,1)
<i>IgG2+IgG3, n (%)</i>	1 (0,1)
<i>IgG2+IgG4, n (%)</i>	1 (0,1)
<i>IgG3+IgG4, n (%)</i>	0 (0)
<i>IgG1+IgG2+IgG3, n (%)</i>	67 (6,6)
<i>IgG1+IgG3+IgG4, n (%)</i>	1 (0,1)
<i>IgG2+IgG3+IgG4, n (%)</i>	0 (0)
<i>IgG1+IgG2+IgG4, n (%)</i>	91 (9,0)
<i>IgG1+IgG2+IgG3+IgG4, n (%)</i>	13 (1,3)

^a Porcentaje de anticuerpos calculado considerando únicamente aquellos con al menos una subclase detectable.

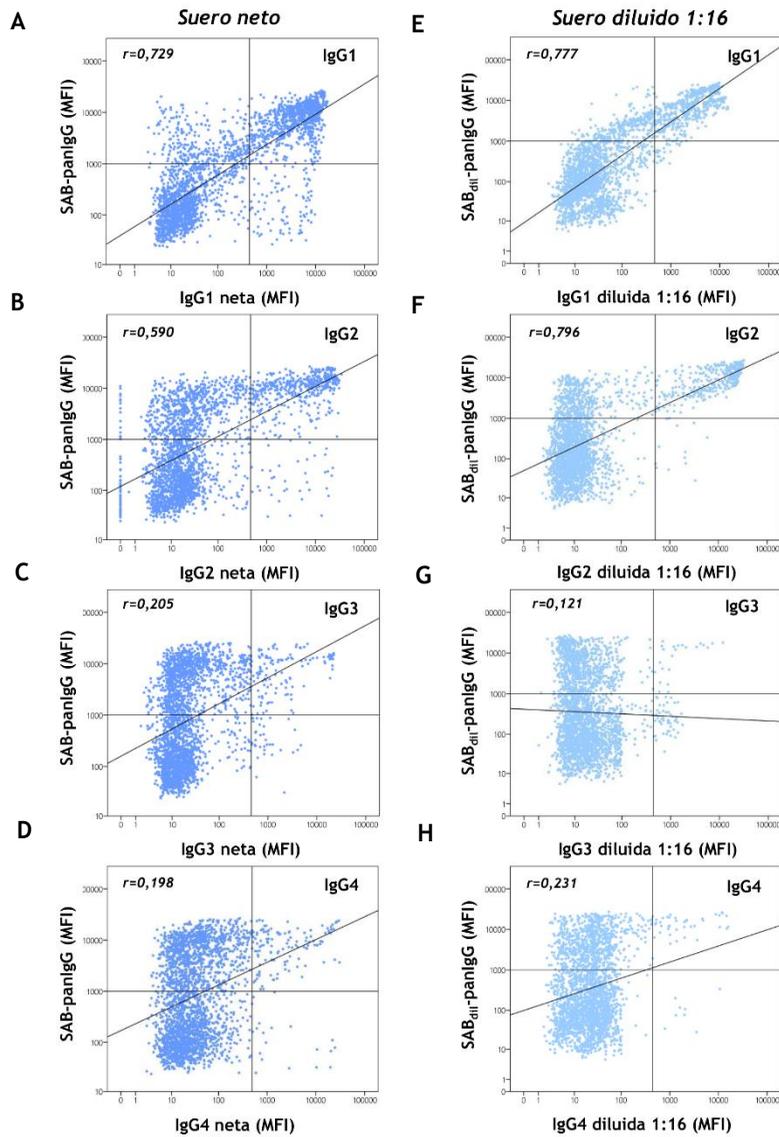


Figura 28. Gráfico de dispersión de puntos para la correlación entre el valor MFI de los anticuerpos panIgG en el ensayo SAB-panIgG y el valor MFI de las subclases IgG1-4 en el ensayo SAB-subclass realizados con muestras de suero neto (A-D) y con muestras de suero diluidas 1:16 (E-F). La correlación se calculó mediante el test de Correlación de Pearson.

Cuando se evaluó la correlación entre la fuerza, estimada como el valor MFI, de cada una de las subclases de IgG y la de los anticuerpos panIgG (Figura 28), se observó que la fuerza de la subclase IgG1 era la que mejor se correlacionaba con la fuerza de los anticuerpos anti-HLA panIgG tanto en las muestras de suero neto como en las de suero diluido 1:16 ($r = 0,729$ y $r = 0,777$, respectivamente). Estos resultados reafirman la idea de que la mayor parte de inmunoglobulina detectada y presente en los anticuerpos panIgG es IgG1. Además, la correlación obtenida entre la subclase IgG2 y el valor MFI de los anticuerpos panIgG en las muestras diluidas, también fue particularmente fuerte ($r = 0,796$), lo que, igualmente, pone de manifiesto que la IgG1 se acompaña principalmente de IgG2 y que la IgG2 también es una subclase prevalentemente presente en los anticuerpos panIgG.

Perfil de subclases de IgG, fuerza y reactividad C1q de los anticuerpos anti-HLA

A continuación, se estudió la relación entre el patrón de subclases de IgG, la capacidad de unión de C1q y la fuerza de los anticuerpos anti-HLA panIgG. Uno de los principales hallazgos obtenidos en este análisis fue que la presencia de subclases fuertemente capaces de unir complemento (IgG1 y/o IgG3) resultó ser particularmente elevada, estando presentes en 1.001 (98,9%) de 1.012 anticuerpos anti-HLA panIgG positivos con al menos una subclase detectable (Tabla 4). Sin embargo, únicamente 470 de ellos (46,9%) fueron capaces de unir C1q según el ensayo SAB-C1q, lo que pone de manifiesto que la potencial capacidad de unir complemento no implica que una especificidad de anticuerpo sea detectada como C1q-positiva.

Independientemente de las diferencias significativas en cuanto a la proporción de subclases IgG1-4 observadas según la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA

($p < 0,001$), la presencia de IgG1 y/o IgG3, principales subclases activadoras de la cascada del complemento, fue extremadamente alta en ambos grupos de anticuerpos, tanto los C1q-positivos como los C1q-negativos (Tabla 4). De hecho, no se encontraron diferencias en relación a la presencia de IgG1 y/o IgG3 entre los 473 anticuerpos fijadores de C1q y los 539 no fijadores de C1q (99,4 vs. 98,5%; $p = 0,193$).

Tabla 4. Perfil de subclases de IgG de los anticuerpos anti-HLA fijadores y no fijadores de C1q.

	C1q- (n=539) ^a	C1q+ (n=473) ^a	P
Perfil de subclases de IgG1-4			<0,001
IgG aislada, n (%)	322 (59,7)	97 (20,5)	<0,001
<i>IgG1 aislada, n (%)</i>	283 (52,5)	90 (19,0)	
<i>IgG2 aislada, n (%)</i>	2 (0,4)	3 (0,6)	
<i>IgG3 aislada, n (%)</i>	32 (5,9)	4 (0,8)	
<i>IgG4 aislada, n (%)</i>	5 (0,9)	0	
Mezcla de subclases de IgG, n (%)	217 (40,3)	376 (79,5)	<0,001
<i>IgG1+IgG2, n (%)</i>	129 (23,9)	247 (52,2)	
<i>IgG1+IgG3, n (%)</i>	16 (3,0)	6 (1,3)	
<i>IgG1+IgG4, n (%)</i>	16 (3,0)	5 (1,1)	
<i>IgG2+IgG3, n (%)</i>	1 (0,2)	0	
<i>IgG2+IgG4, n (%)</i>	1 (0,2)	0	
<i>IgG3+IgG4, n (%)</i>	0	0	
<i>IgG1+IgG2+IgG3, n (%)</i>	31 (5,8)	36 (7,6)	
<i>IgG1+IgG2+IgG4, n (%)</i>	22 (4,1)	69 (14,6)	
<i>IgG1+IgG3+IgG4, n (%)</i>	1 (0,2)	0	
<i>IgG2+IgG3+IgG4, n (%)</i>	0	0	
<i>IgG1+IgG2+IgG3+IgG4, n (%)</i>	0	13 (2,7)	
Presencia de IgG1 y/o IgG3, n (%)	531 (98,5)	470 (99,4)	0,193
Presencia de IgG2 y/o IgG4, n (%)	208 (38,6)	373 (78,9)	<0,001

^aÚnicamente se consideraron aquellas especificidades de anticuerpos con al menos una subclase IgG1-4 detectable. Por tanto, los 273 anticuerpos anti-HLA en los que no se identificó la presencia de subclases de IgG fueron excluidos de este análisis.

Curiosamente, las subclases IgG2 y/o IgG4 estuvieron presentes en el 78,9% de los anticuerpos fijadores de C1q y únicamente en el 38,6% de los anticuerpos no fijadores de C1q ($p < 0,001$). La combinación de las cuatro subclases de IgG (IgG1-4) fue también más

habitual en los anticuerpos fijadores que en los no fijadores de C1q. El valor MFI en el suero diluido de los anticuerpos que estaban compuestos por una combinación de las cuatro subclases de IgG resultó ser significativamente más elevado que el de los anticuerpos compuestos por subclases aisladas ($8.394,5 \pm 6.520,4$ vs. $2.527,2 \pm 3.107,2$; $p < 0,001$). Finalmente, se detectaron 3/473 (0,6%) anticuerpos anti-HLA capaces de unir C1q que estaban compuestos únicamente por IgG2 aislada. En los tres casos, dicha subclase IgG2 presentaba un valor MFI particularmente elevado en el análisis de muestras diluidas ($22.705,02 \pm 9.257,3$).

Más allá del perfil de subclases, se investigó la relación entre la fuerza (MFI) de las subclases de IgG y su capacidad de unir C1q. La Figura 29 muestra la correlación por especificidad entre los valores MFI de cada subclase de IgG1-4 en las muestras de suero neto y diluido 1:16 y el valor MFI de los anticuerpos panIgG en el ensayo SAB-C1q. El test de Pearson reveló una fuerte correlación entre los valores MFI de la subclase IgG1 tras la dilución y la capacidad de unir C1q de los anticuerpos ($r_{\text{IgG1dil}} = 0,796$), lo que pone de manifiesto la estrecha relación entre la presencia de IgG1 a alto título y la capacidad de unir complemento de una especificidad de anticuerpo determinada (Figura 29.E). Cabría esperar que la correlación con la fuerza de la subclase IgG3, la más potente activadora de la cascada del complemento, fuera también fuerte, sin embargo, dicha asociación no se encontró, probablemente como consecuencia de la baja prevalencia de la subclase IgG3 (13,8%). La Figura 29.F muestra también que la correlación entre la fuerza de la subclase IgG2 tras la dilución de las muestras y la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA fue fuerte ($r_{\text{IgG2dil}} = 0,758$). Esta inesperada fuerte correlación podría ser explicada por el hecho de que la subclase IgG2 se encuentra principalmente en combinación con la subclase IgG1 (Tabla 3). Es más, la correlación entre los valores MFI de las subclases IgG1 e IgG2 en las muestras de suero diluidas 1:16 resultó ser, igualmente, fuerte ($r_{\text{IgG1-IgG2}} = 0,817$; Figura 30).

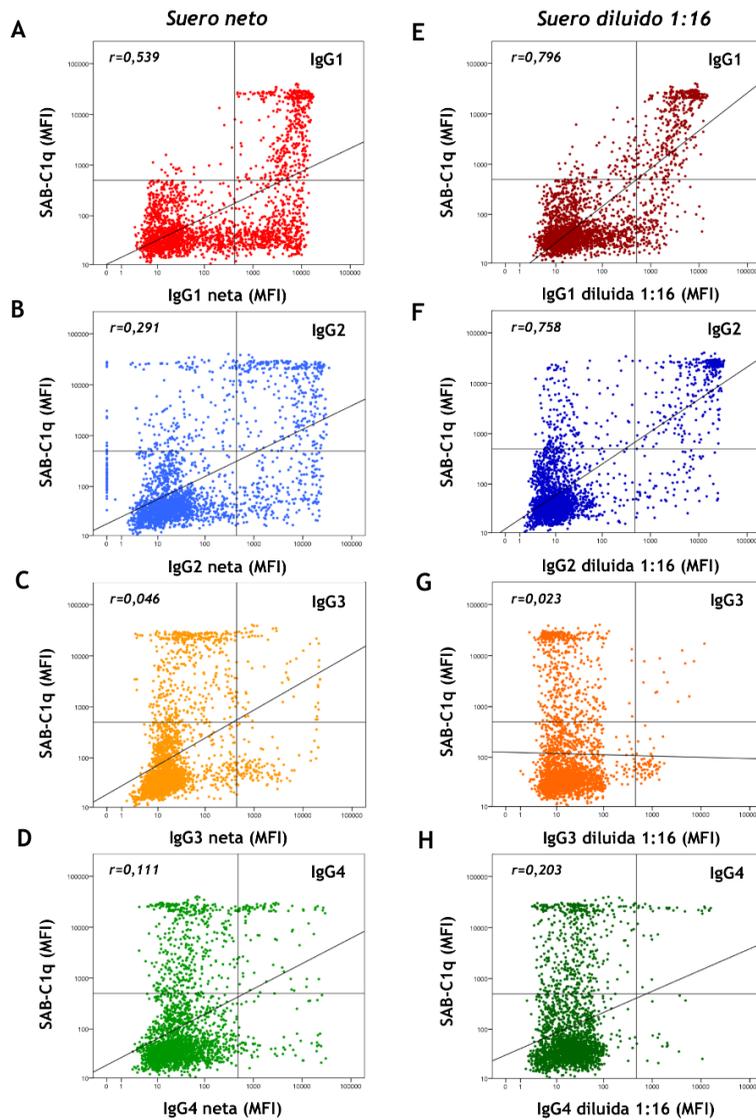
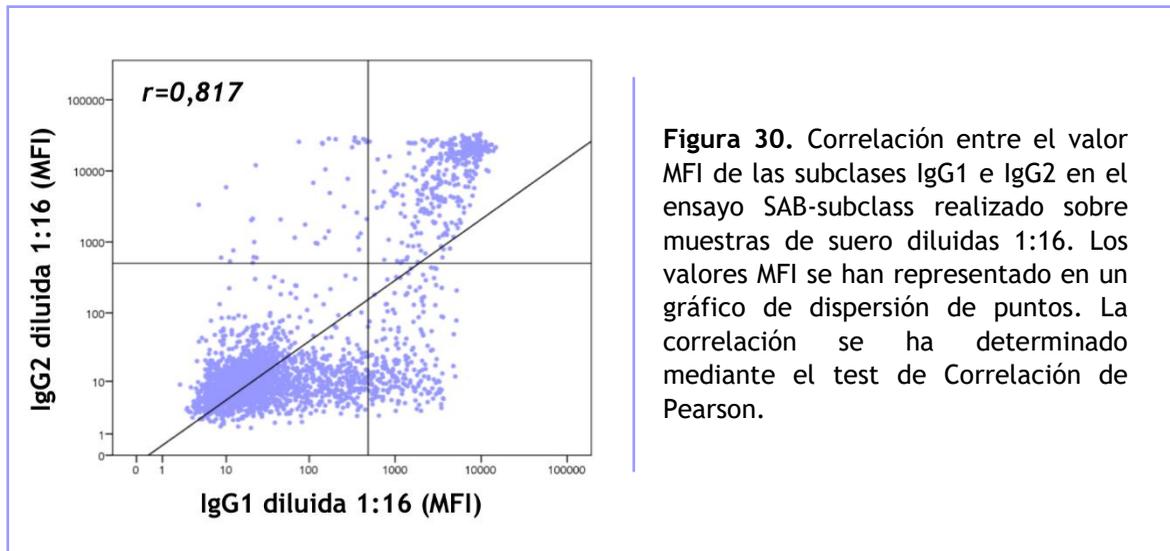


Figura 29. Gráfico de dispersión de puntos para la correlación entre el valor MFI de los anticuerpos panIgG en el ensayo SAB-C1q y el valor MFI de las subclases IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) e IgG4 (D) en el ensayo SAB-subclass realizado con muestras de suero neto y el valor MFI de las subclases IgG1 (E), IgG2 (F), IgG3 (G) e IgG4 (H) en el ensayo SAB-subclass realizado con muestras de suero diluidas 1:16. La correlación se determinó mediante el test de Correlación de Pearson.



Relación entre la fuerza de la IgG1 y la capacidad de unir C1q según locus HLA

Una vez se determinó que la fuerza de la subclase IgG1 era la que parecía determinar la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA panIgG, se examinó la correlación entre la fuerza de dicha subclase, medida como valor MFI sobre muestras de suero diluido 1:16 y la capacidad de unir C1q para cada uno de los grupos de antígenos analizados (HLA-A, -B, -Cw, -DR, -DP y -DQ; Figura 31). Para ello, se realizó un modelo de regresión lineal. El test ANOVA llevado a cabo sobre el modelo de regresión lineal reveló que la correlación era significativamente diferente entre locus ($p < 0,001$), siendo la correlación más fuerte aquella para las especificidades de antígenos HLA-DQ ($r_{DQ} = 0,887$).

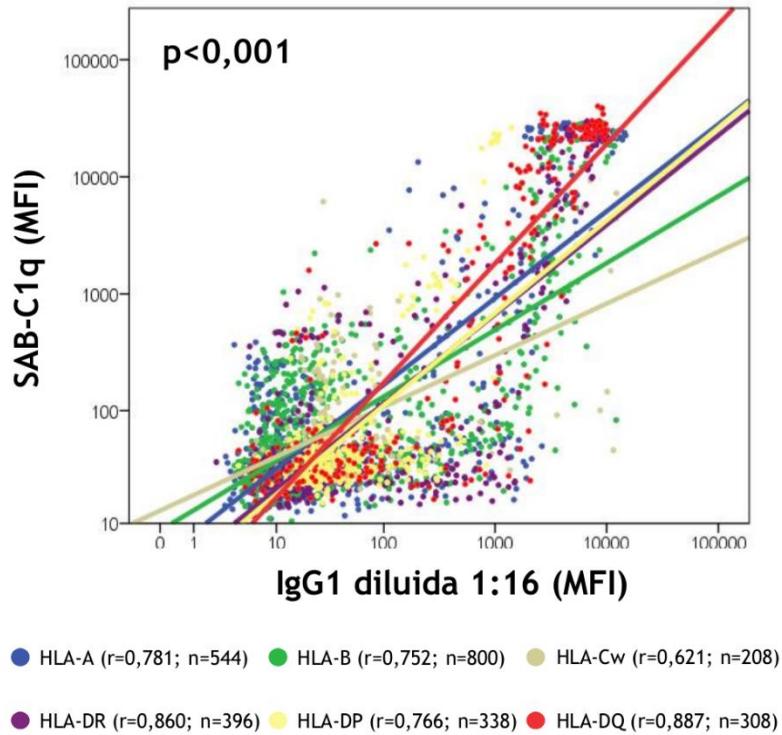


Figura 31. Gráfico de dispersión de puntos para la correlación entre el valor MFI de la IgG1 obtenido en el ensayo SAB-subclass con muestras de suero diluidas 1:16 y el valor MFI de los anticuerpos anti-HLA panIgG obtenido en el ensayo SAB-C1q, considerando los antígenos HLA-A, HLA-B, HLA-Cw, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. La correlación se determinó mediante el test de Correlación de Pearson.

Estudio de la evolución del aloinjerto renal trasplantado según las propiedades de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida

Características de los pacientes

La población analizada en el estudio de las propiedades de los anticuerpos anti-HLA y la evolución del aloinjerto renal trasplantado, incluía 72 pacientes trasplantados de riñón único con anticuerpos anti-HLA preformados, que fueron clasificados en dos grupos, según su estatus de DSA preformados. Los 14 (19,4%) pacientes que presentaron DSA preformados no fijadores de C1q formaban el grupo de estudio DSA+, mientras que los 58 (80,6%) pacientes sin DSA formaban el grupo control DSA-. Las características clínicas e inmunológicas de ambos grupos de pacientes se muestran en la Tabla 5.

Como se observa en la Tabla 5, la edad de los pacientes del grupo DSA+ fue significativamente inferior a la edad del grupo DSA- ($49,71 \pm 10,53$ vs. $54,72 \pm 11,22$; $p = 0,032$). Los pacientes del grupo DSA+ presentaron un valor de cPRA en el momento del trasplante significativamente superior con respecto al grupo DSA- ($93,64 \pm 10,62$ vs. $62,53 \pm 29,21$; $p < 0,001$). Aunque no de manera significativa, sí que se observó una tendencia en cuanto al porcentaje de pacientes re-trasplantados en el grupo DSA+ con respecto al grupo DSA- (57,1 vs. 29,3%; $p = 0,064$). Las características encontradas en el grupo DSA+ no reflejan sino la propia idiosincrasia de gran parte de los pacientes altamente sensibilizados, que suelen ser re-trasplantados, considerando el trasplante como su principal evento de sensibilización HLA-clásico, y habiéndose llevado a cabo en muchos casos en edad temprana, lo que implica que llegan a la madurez con un panel de anticuerpos anti-HLA considerablemente restrictivo. No se encontraron diferencias

significativas en relación al resto de las características estudiadas, incluyendo el tiempo en lista de espera, dado que se trata de dos grupos de pacientes con anticuerpos anti-HLA, cuya presencia dificulta encontrar donantes compatibles.

Tabla 5. Características clínicas e inmunológicas de la cohorte de estudio según su estatus de anticuerpos anti-HLA antes del trasplante.

	DSA- (n=58)	DSA+ (n=14)	P
Características del receptor			
Edad (años), media (SD)	54,72 (11,22)	49,71 (10,53)	0,032
Sexo femenino, n (%)			0,183
Si	30 (51,7)	10 (71,4)	
No	28 (48,3)	4 (28,6)	
Re-trasplante, n (%)			0,064
Si	17 (29,3)	8 (57,1)	
No	41 (70,7)	6 (42,9)	
Tiempo en diálisis (días), media (SD)	2.711,81 (3.165,48)	2.110,07 (1.500,35)	0,560
Grupo sanguíneo, n (%)			0,710
A	22 (37,9)	5 (35,7)	
B	4 (6,9)	0	
O	27 (46,6)	7 (50,0)	
AB	5 (8,6)	2 (14,3)	
Patología renal de base, n (%)			0,242
Glomerulopatía	7 (12,1)	3 (21,4)	
Poliquistosis renal (AD)	12 (20,7)	4 (28,6)	
Hipoplasia congénita	0	1 (7,1)	
Diabetes	10 (17,2)	1 (7,1)	
Etiología desconocida	16 (27,6)	2 (14,3)	
Otras causas	13 (22,4)	3 (21,4)	
Características del donante			
Edad (años), media (SD)	56,88 (13,09)	51,50 (12,50)	0,127
Tipo, n (%)			1,000
Muerte encefálica	47 (81,0)	12 (85,7)	
Asistolia	11 (19,0)	2 (14,3)	
Características del trasplante			
Isquemia fría (horas), media (SD)	11,76 (3,66)	11,64 (4,25)	0,966
cPRA, media (SD)	62,53 (29,21)	93,64 (10,62)	<0,001
Incompatibilidades HLA, media (SD)	4,05 (1,30)	4,00 (1,41)	0,936
A	1,24 (0,63)	1,43 (0,65)	0,301
B	1,50 (0,66)	1,43 (0,65)	0,633
DR	1,31 (0,65)	1,14 (0,66)	0,377

*AD, autosómica dominante

Estatus de DSA antes y después del trasplante

En el grupo de estudio DSA+, se analizaron prospectivamente qué cambios se habían producido con respecto al pre-trasplante en el DSA en relación a su valor MFI, su capacidad de unir C1q y el perfil de subclases de IgG presentes. La distribución de DSA del grupo de estudio en relación a los tipos de moléculas HLA frente a las que estaban dirigidos (Clase I/II y locus) se describe en la Tabla 6.

Tabla 6. Caracterización de los DSA según la molécula HLA frente a la que estaban dirigidos.

	DSA+ (n=14)
DSA frente a moléculas HLA-Clase I, n (%)	8 (57,1)
<i>Frente a HLA-A, n (%)</i>	3 (21,4)
<i>Frente a HLA-B, n (%)</i>	3 (21,4)
<i>Frente a HLA-Cw, n (%)</i>	2 (14,3)
DSA frente a moléculas HLA-Clase II, n (%)	6 (42,9)
<i>Frente a HLA-DR, n (%)</i>	4 (28,6)
<i>Frente a HLA-DP, n (%)</i>	0
<i>Frente a HLA-DQ, n (%)</i>	2 (14,3)

Cuando se evaluó el valor MFI del DSA obtenido en el ensayo SAB-panIgG (Figura 32.A), se observó que en 12 (85,7%) pacientes, éste disminuyó significativamente en el post-trasplante ($4.467,28 \pm 2.052,95$ vs. $2.030,25 \pm 1.979,36$; $p = 0,002$), mientras que en 2 (14,3%) el valor MFI del DSA aumentó. Es más, en 6 (42,86%) pacientes el DSA incluso se negativizó (MFI < 1.000). Por tanto, la tendencia general en el post-trasplante fue hacia una disminución del valor MFI del DSA con respecto al pre-trasplante. Por otra parte, al considerar la capacidad de unir C1q de los DSA (Figura 32.B), en ninguno de los casos analizados se detectó un cambio de estatus desde C1q-negativo en el pre-trasplante hasta C1q-positivo en el post-trasplante, siendo los valores MFI del DSA en el ensayo SAB-C1q

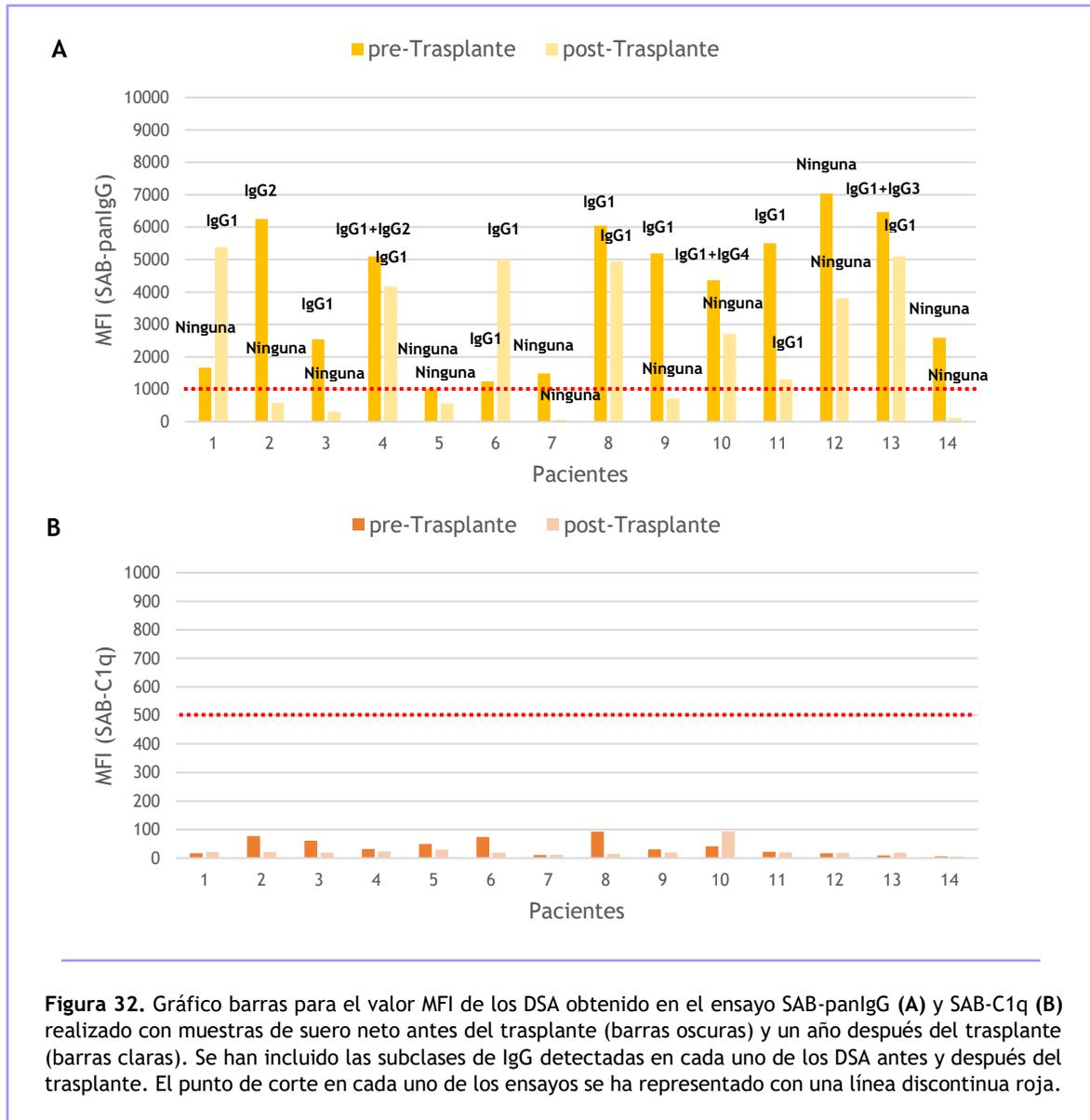
antes y después del trasplante similares ($38,71 \pm 28,19$ vs. $23,84 \pm 20,72$; $p = 0,109$). Es decir, la capacidad de unir complemento del DSA permaneció invariable.

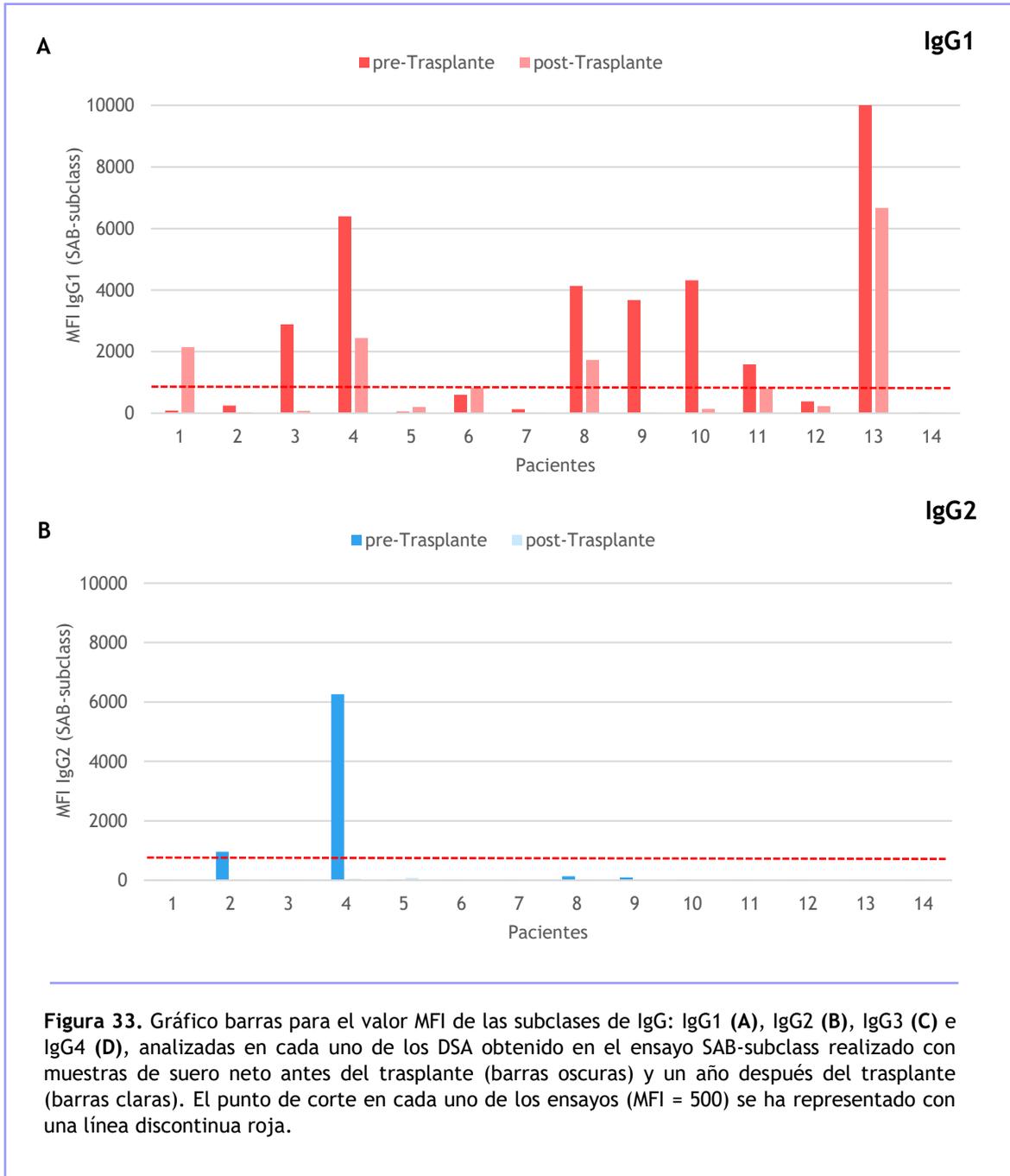
Al estudiar el perfil de subclases de IgG (Figura 32.A), se observó que en 4 (28,6%) pacientes ninguna subclase era capaz de ser detectada en el DSA tanto en el pre- como en el post-trasplante. En el resto de pacientes, el valor MFI de las subclases IgG1, IgG2 e IgG4 disminuyó significativamente en el post-trasplante, mientras que permaneció invariable en el caso de la IgG3 (IgG1: $5.443,36 \pm 9.033,25$ vs. $1.488,91 \pm 2.035,98$; $p = 0,028$; IgG2: $752,34 \pm 1.958,23$ vs. $17,24 \pm 15,04$; $p = 0,022$; IgG3: $88,50 \pm 215,23$ vs. $91,93 \pm 140,22$; $p = 0,386$ e IgG4: $257,89 \pm 612,41$ vs. $47,66 \pm 63,39$; $p = 0,037$; Figura 33). De hecho, la disminución en el valor MFI de los DSA panIgG fue acompañada de la desaparición de una o varias de las subclases detectadas o de la ausencia de cambio en el perfil de subclases (Figura 32.A). Sólo en 1 (7,14%) paciente el aumento del valor MFI del DSA panIgG en el post-trasplante coincidió con la detección de la subclase IgG1, que no era detectada en el pre-trasplante.

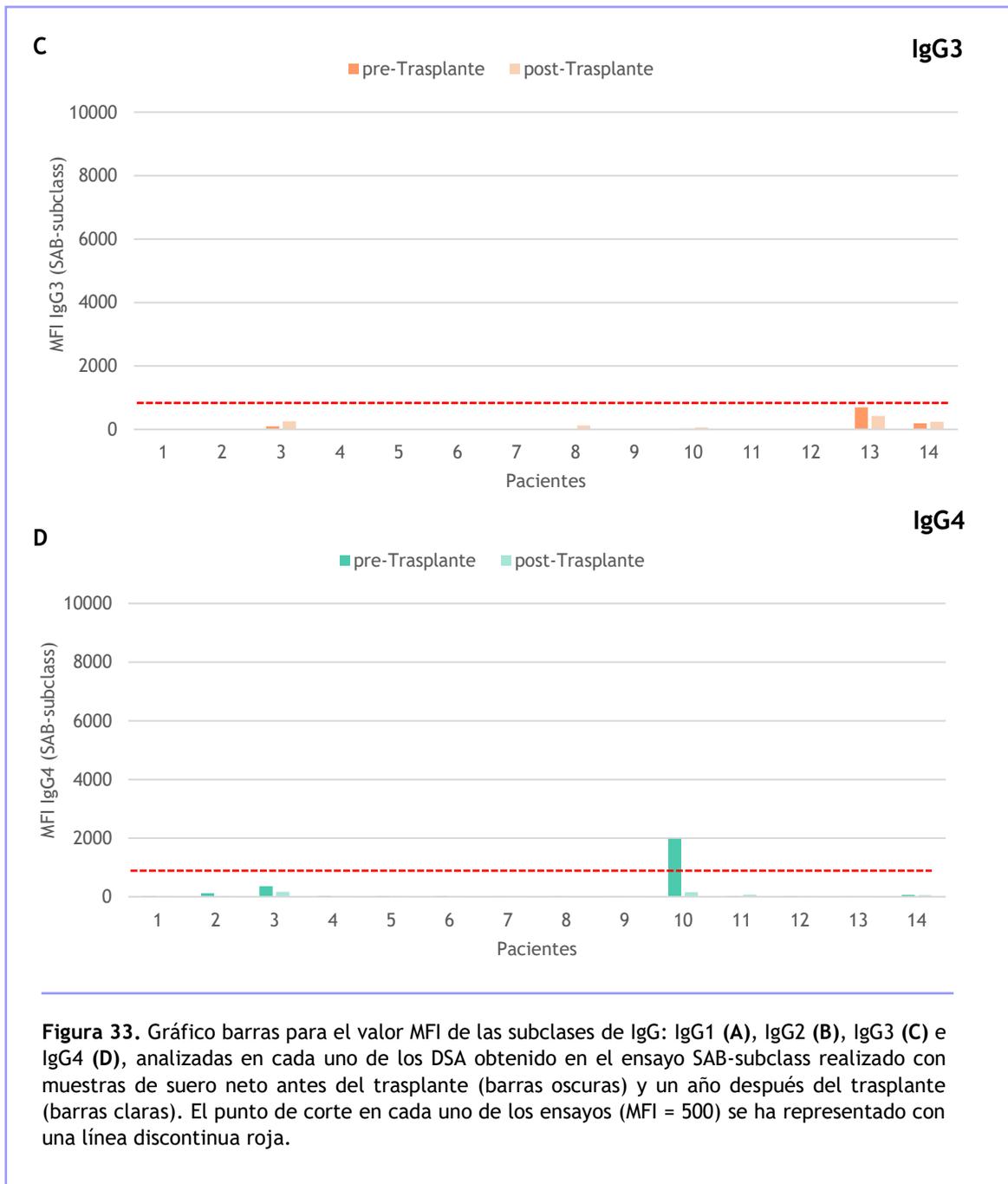
Aparición de DSA de novo

Al estudiar la proporción de pacientes que desarrollaron DSA *de novo*, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio DSA+ y control DSA- ($p = 1,000$). Así pues, en el grupo DSA+, un único paciente (7,1%) desarrolló DSA *de novo* a los dos meses tras el trasplante. Actualmente, dicho paciente presenta una buena función renal, permaneciendo el DSA *de novo* invariable (C1q-negativo) en la evolución post-trasplante. Por su parte, en el grupo DSA-, 3 (5,2%) pacientes desarrollaron DSA *de novo*. En uno de ellos la aparición del DSA *de novo* se produjo dentro de los 20 primeros días después del trasplante. Este paciente fue diagnosticado de ABMR y perdió el aloinjerto renal de forma prematura a los 8 meses post-trasplante. En los otros dos, la aparición de

DSA *de novo* se produjo a los 3 años después del trasplante. Actualmente, ambos presentan una buena función renal, permaneciendo el DSA *de novo* invariable en la evolución post-trasplante.



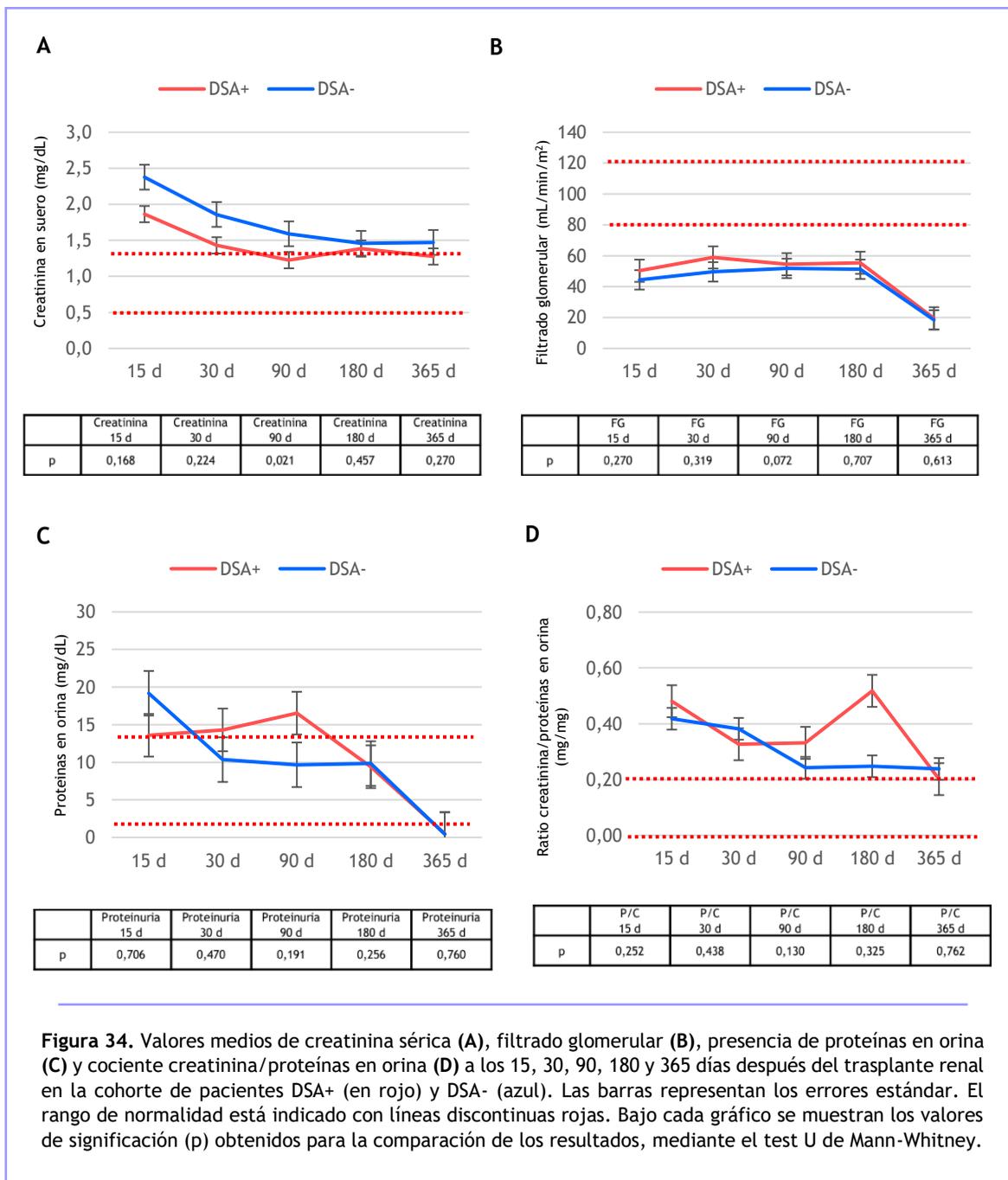




Función del aloinjerto renal

La función del aloinjerto renal fue evaluada según el nivel de creatinina sérica, el filtrado glomerular, la presencia de proteínas en orina y el cociente creatinina/proteínas en orina (Figura 34). Los resultados revelan que durante el primer año de seguimiento después del trasplante, el nivel medio de creatinina sérica de los 14 pacientes DSA+ no fue significativamente diferente con respecto al nivel medio de creatinina sérica de los 58 pacientes trasplantados sin DSA (DSA-), excepto a los 3 meses, en los que la creatinina sérica de los pacientes trasplantados con DSA no fijadores de C1q (DSA+) es incluso significativamente inferior a la de los pacientes trasplantados sin DSA ($1,23 \pm 0,32$ vs. $1,59 \pm 0,82$ mg/dL; $p = 0,021$; Figura 34.A). No se encontraron diferencias significativas al evaluar el filtrado glomerular, la presencia de proteínas en orina o la ratio creatinina/proteínas (Figura 34.B, C y D) en ninguno de los intervalos de tiempo analizados.

Además, se examinó el retraso en la función del aloinjerto renal en los dos grupos de pacientes, entendiendo como retraso de la función del aloinjerto la necesidad de diálisis durante la primera semana después del trasplante. Así, en 9/58 (15,5%) pacientes trasplantados sin DSA (DSA-) la función del aloinjerto renal se retrasó, mientras en el grupo de pacientes trasplantados con DSA no fijadores de C1q (DSA+), se retrasó en 2/14 (14,3%) pacientes, no encontrando diferencias significativas entre ambos grupos en relación a la proporción de pacientes cuya función del aloinjerto renal se retrasó ($p = 1,000$).

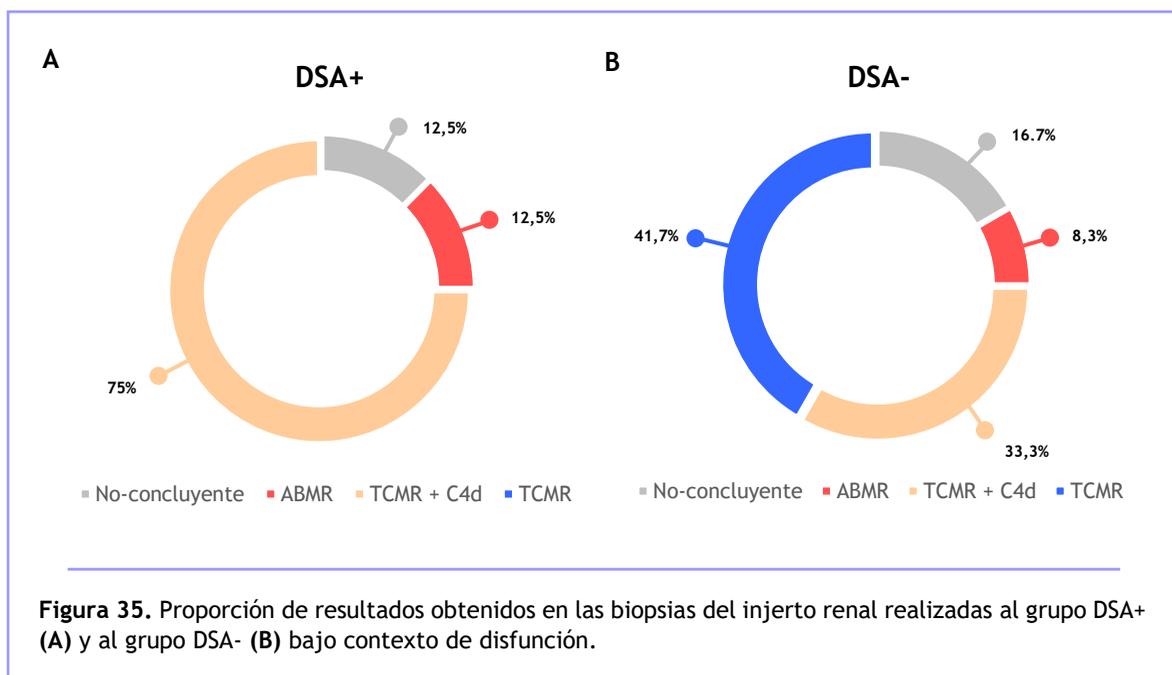


Eventos de rechazo del aloinjerto renal

Se evaluaron los eventos de rechazo a lo largo de todo el periodo de seguimiento tras el trasplante. La proporción de pacientes biopsiados en el grupo DSA+ bajo contexto de disfunción del aloinjerto renal no fue significativamente diferente ($p = 0,287$) a la proporción de pacientes biopsiados en el grupo control (DSA-), lo que indicaría que no se produjeron más eventos de disfunción clínica que propiciaran la realización de una biopsia en un grupo con respecto a otro. Así, en el grupo control DSA-, se biopsiaron 24/58 pacientes (41,37%), de los cuales, 21 (87,5%) biopsias se realizaron durante el primer año post-trasplante. En el grupo de estudio DSA+, 8 (53,3%) pacientes fueron biopsiados a lo largo del periodo de seguimiento, 6 (75%) de los cuales, durante el primer año post-trasplante. Los resultados en relación a la tipología de rechazo descrita en los informes emitidos por los anatomopatólogos se muestran en la Figura 35. En 5 (62,5%) pacientes del grupo DSA+ las biopsias identificaron cambios histológicos relacionados con TCMR y presencia de componente humoral con depósitos de C4d de intensidad débil (<10% o 10-20%). En 2 (25%) pacientes la biopsia no encontró hallazgos histológicos de rechazo, a pesar de que en una de ellas el componente C4d fue débilmente positivo (<10%). Un único paciente (12,5%) fue diagnosticado de ABMR sin componente celular y perdió el aloinjerto renal tras 442 días.

En relación al grupo control DSA-, de los 24 pacientes biopsiados, el informe anatomopatológico indicaba cambios sugestivos de TCMR en 10 (41,7%), TCMR y presencia de componente humoral en 8 (33,3%) y ABMR sin componente celular en 2 (8,3%). Los dos (100%) pacientes diagnosticados de ABMR y 6/10 (60%) de los diagnosticados de TCMR con componente humoral presentaron depósitos de C4d. En 4 (16,7%) pacientes el resultado de la biopsia no identificó hallazgos indicativos de rechazo. La proporción de ABMR entre los pacientes biopsiados del grupo DSA+ y los pacientes biopsiados del grupo DSA- no fue

significativamente diferente (12,5 vs. 8,3%; $p = 1,000$). Tampoco fue significativamente diferente la proporción de pacientes diagnosticados de TCMR con componente humoral entre ambos grupos (62,5 vs. 33,3%; $p = 0,219$). Aunque no de manera significativa, parece que la proporción de biopsias con presencia de depósitos C4d tendía a ser superior en el grupo de pacientes DSA+ (75,0 vs. 33,3; $p = 0,096$). Sin embargo, la proporción de TCMR sí fue significativamente inferior en este grupo (0 vs. 41,7%; $p = 0,035$).



Supervivencia del aloinjerto renal

Finalmente, la supervivencia del aloinjerto renal se representó mediante curvas Kaplan-Meier según el estatus de anticuerpos anti-HLA antes del trasplante (Figura 36). Como se observa en las curvas, al final del periodo de seguimiento, 2 (14,3%) pacientes del grupo DSA+ pierden el aloinjerto renal, uno en el segundo año después del trasplante

y el otro en el tercero. Es decir, al final del periodo de seguimiento el 86,7% de los pacientes trasplantados con DSA sin la habilidad de unir el componente C1q del complemento mantenían su aloinjerto renal funcional. Por su parte, de los pacientes trasplantados sin DSA (DSA-), 4 (6,9%) pacientes perdieron el aloinjerto renal, es decir, el 93,1% de los pacientes trasplantados con estas características mantenían la función del aloinjerto renal al final del periodo de seguimiento. Al comparar las curvas, los resultados revelan que la supervivencia temprana del aloinjerto renal no fue significativamente diferente ($p = 0,329$) entre los dos grupos de pacientes estudiados.

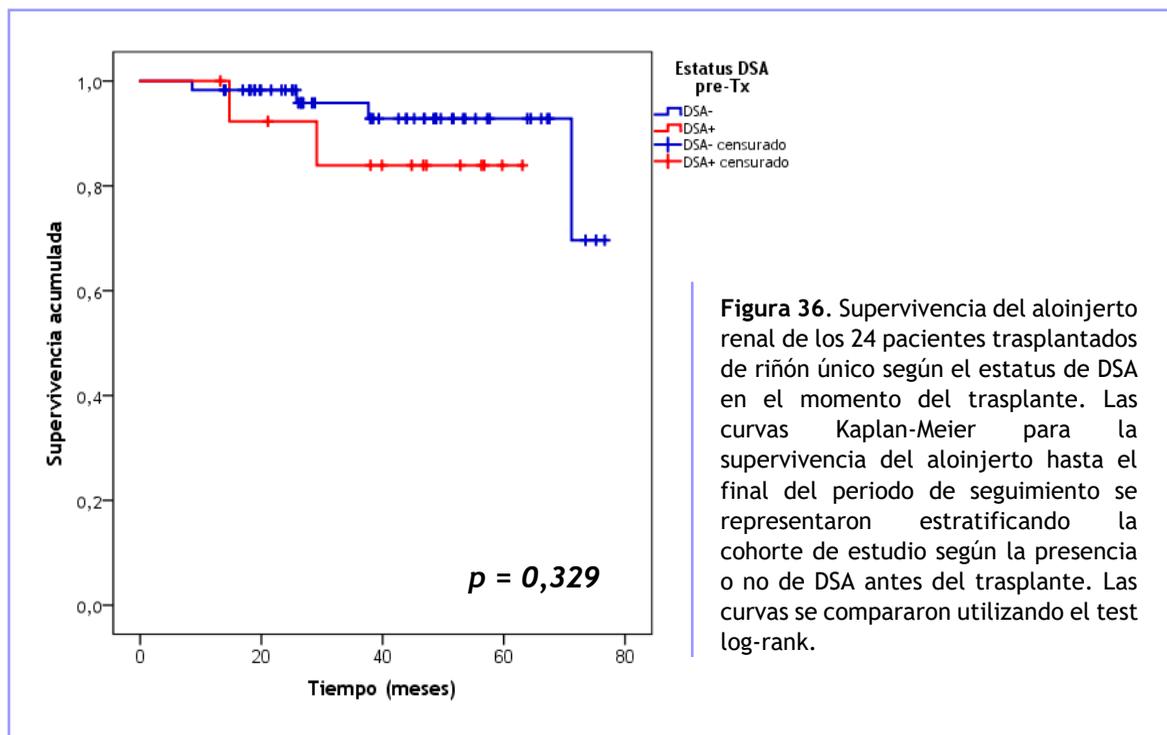


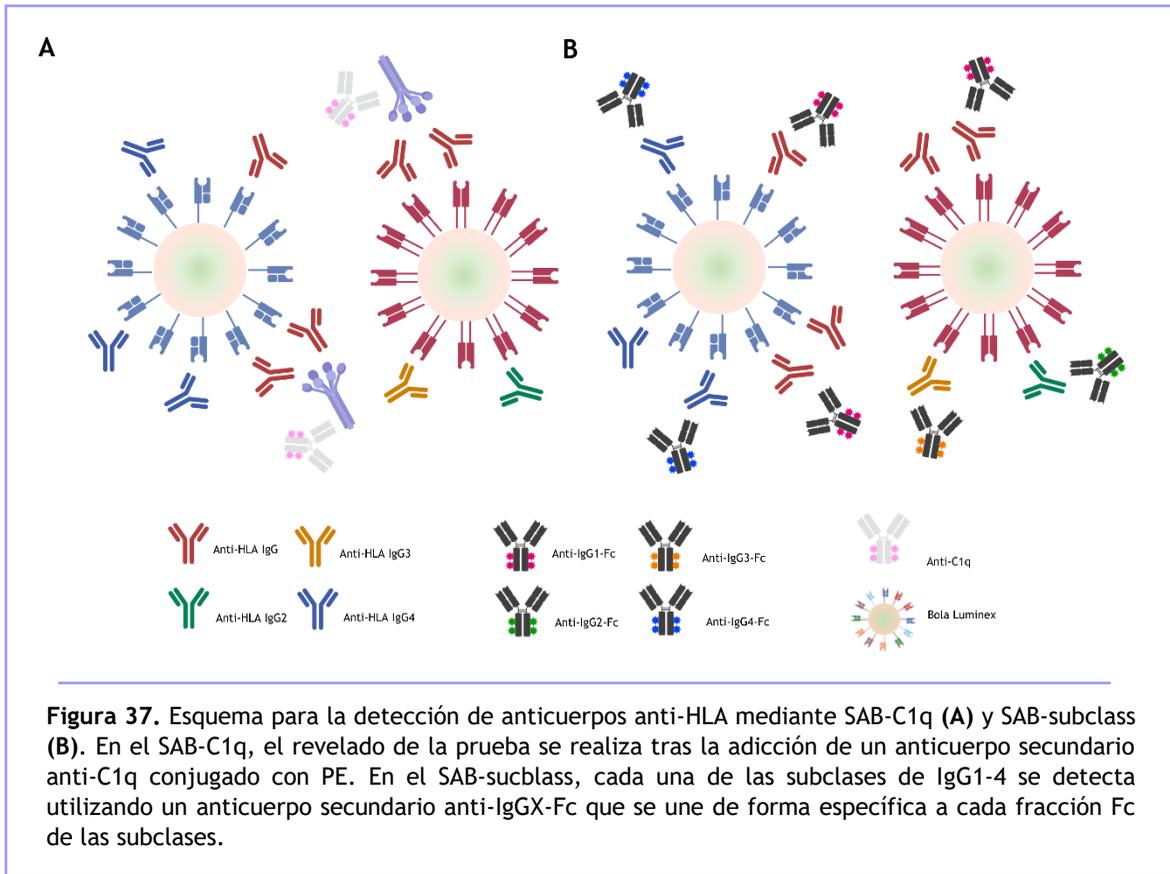
Figura 36. Supervivencia del aloinjerto renal de los 24 pacientes trasplantados de riñón único según el estatus de DSA en el momento del trasplante. Las curvas Kaplan-Meier para la supervivencia del aloinjerto hasta el final del periodo de seguimiento se representaron estratificando la cohorte de estudio según la presencia o no de DSA antes del trasplante. Las curvas se compararon utilizando el test log-rank.



Discusión

Desde hace varias décadas, la relevancia clínica de los anticuerpos anti-HLA como biomarcadores inmunológicos de la evolución del aloinjerto renal trasplantado es un hecho y así lo ponen de manifiesto multitud de publicaciones. Numerosos avances se han hecho desde entonces, tanto en la evolución de las técnicas de detección y caracterización de los anticuerpos y sus propiedades, como en la búsqueda de terapias alternativas que permitan la prevención del ABMR, principal entidad patológica asociada a su presencia, y que posibiliten un tratamiento efectivo. Sin embargo, la optimización de los algoritmos para la asignación de órganos compatibles, especialmente a receptores altamente sensibilizados, supone todavía un reto por conseguir, dado que aún existe un profundo debate acerca de la estratificación del riesgo inmunológico de los anticuerpos anti-HLA con las herramientas que disponemos.

Uno de los objetivos de este proyecto de tesis doctoral consistía, precisamente, en conocer la relación entre las diferentes propiedades de los anticuerpos anti-HLA detectadas por los diferentes ensayos de fase sólida disponibles y clarificar aquellas reacciones que aún no habían sido descritas. Hasta la fecha, los datos que se obtienen de los ensayos en fase sólida para caracterizar el potencial patogénico de los anticuerpos anti-HLA se han considerado demasiado complejos, lo que a veces ha originado cierta confusión a la hora de adoptar decisiones clínicas (72). A este respecto, aunque, el incremento en la sensibilidad para la detección de anticuerpos de estos ensayos indudablemente ha supuesto una drástica reducción de la incidencia de rechazo temprano y una mejora en el tiempo de supervivencia del injerto, paralelamente y como consecuencia del aumento en el número de incompatibilidades HLA inaceptables definidas, los tiempos de espera de los pacientes altamente sensibilizados se han prolongado (107), hecho que se asocia a un aumento en la mortalidad del paciente trasplantado (108, 109).

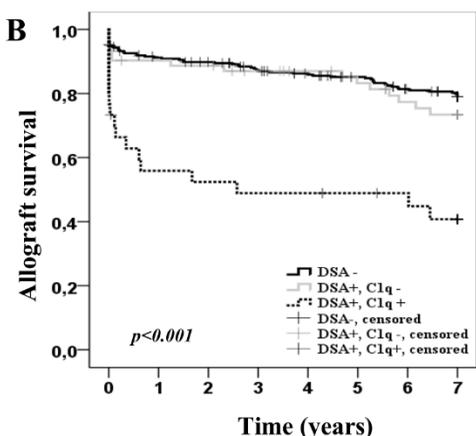


Entre los cinco isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), la IgG se considera el principal efector del rechazo humoral a través de la activación de la cascada del complemento por la vía clásica (46). No obstante, las cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) difieren en sus propiedades (44, 49, 99). Así, la IgG3 es la subclase que presenta la capacidad activadora del complemento más potente, seguida de la IgG1 y en mucha menor medida, de la IgG2. La subclase IgG4 no tiene actividad detectable del complemento y habitualmente es considerada como subclase no fijadora de

complemento. Las subclases IgG3 e IgG1 tienen mayor afinidad por los FcγRs, mientras que las subclases IgG2 e IgG4 se unen a un repertorio más restringido de FcγRs, pero, todas pueden inducir ADCC, mecanismo de daño humoral independiente de complemento. Asumiendo que la activación del complemento es la principal vía de daño mediado por anticuerpos, Chen y cols. (92) introdujeron el ensayo SAB-C1q (Figura 37), como una modificación del ya estandarizado SAB-panIgG, para distinguir aquellas subclases hipotéticamente más peligrosas para la evolución del aloinjerto trasplantado, por ser potentes activadoras de la cascada del complemento (IgG1/IgG3), de aquellas que *a priori* podrían conllevar un riesgo asumible para el trasplante a corto plazo (IgG2/IgG4), ya que su potencial patológico podría estar más relacionado con fenómenos crónicos.

Varios artículos publicados hasta la fecha han explorado el riesgo de fallo del aloinjerto según la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA presentes antes o después del trasplante (93-96). Entre ellos, Molina y cols. (96), analizando retrospectivamente una cohorte de 389 pacientes trasplantados de riñón único, encontraron que la supervivencia a 7 años del aloinjerto renal en los pacientes trasplantados con DSA preformados capaces de fijar C1q (DSA+,C1q+) era significativamente inferior con respecto a la de los pacientes trasplantados con DSA preformados no fijadores de C1q (DSA+,C1q-; $p = 0,001$) y con respecto a la de los pacientes sin DSA (DSA-; Figura 38; $p < 0,001$). Es más, en el modelo multivariante propuesto para determinar el riesgo de pérdida del aloinjerto, la presencia de DSA fijadores de C1q (HR 4,012; CI 95% 2,326 - 6,919; $p < 0,001$) y no así de DSA no fijadores de C1q (HR 1,389; CI 95% 0,784-2,461; $p = 0,260$) se mostró como un factor predictivo independiente tras estratificar la población de pacientes trasplantados con DSA según su capacidad para unir C1q y ajustar el modelo con otros factores predictivos, incluyendo: la edad del donante, el tiempo de isquemia fría y las incompatibilidades en el locus HLA-DR. En su trabajo, Molina y cols. (96) cuestionan si todos los DSA preformados deben

suponer una contraindicación absoluta para el trasplante o si, por el contrario, en determinados contextos, tales como pacientes altamente sensibilizados con un marcado deterioro clínico derivado del prolongado tiempo en diálisis, el beneficio que supondría el trasplante, aún en presencia de DSA (C1q-negativos), superaría al riesgo inmunológico implícito, siempre y cuando la estratificación del riesgo se realizara según la capacidad del DSA para activar la cascada del complemento, probablemente su principal propiedad fisiopatológica.



No. of remaining cases and no. of cumulative events

	0	1	2	3	4	5	6	7
DSA- n=297	288; 9	265; 26	257; 30	245; 37	235; 41	226; 43	212; 53	203; 59
DSA+, C1q- n=62	60; 2	55; 6	54; 7	50; 8	47; 8	44; 10	39; 13	37; 15
DSA+, C1q+ n=30	24; 6	16; 13	15; 14	14; 15	14; 15	13; 15	12; 15	10; 17

Figura 38. Supervivencia del aloinjerto renal de los 389 pacientes trasplantados de riñón único según el estatus de DSA en el momento del trasplante y su capacidad para fijar C1q. Las curvas Kaplan-Meier para la supervivencia del aloinjerto se compararon utilizando el test log-rank. Tomado de Molina y cols. (96).

Más allá de las evidencias que ponen de manifiesto la mayor patogenicidad de los anticuerpos activadores de complemento, algunos autores sugieren que la determinación *in vitro* de la capacidad de unir C1q para predecir la pérdida del aloinjerto en la práctica

clínica es poco útil (110, 111), y muchos otros cuestionan si el ensayo SAB-C1q realmente discrimina entre las subclases de IgG fijadoras (IgG1/IgG3) y no fijadoras (IgG2/IgG4) de complemento, dada la estrecha asociación observada entre el título de los anticuerpos y su capacidad de unir C1q (90, 91, 97, 98). Así por ejemplo, en el trabajo de Molina y cols. y anteriormente citado (96), se encontró cierta correlación ($r = 0,666$; Figura 39) entre el valor MFI obtenido en el ensayo SAB-panIgG y el valor MFI obtenido en el ensayo SAB-C1q, siendo el valor medio de MFI de los anticuerpos capaces de unir C1q significativamente superior al de los anticuerpos incapaces de unir C1q (18.816 vs. 6.495; $p < 0,001$). Dicho de otro modo, únicamente aquellos anticuerpos que superaban un determinado umbral de MFI parecían ser los capaces de unir de manera eficiente la molécula C1q del complemento.

En el presente trabajo de tesis doctoral se ha querido profundizar en la relación entre ambas propiedades: fuerza/título y capacidad de unir C1q; y en cómo esa relación, a veces del todo imperfecta, afecta a la práctica clínica. Así pues, al estudiar las 2,594 especificidades de anticuerpos encontradas en los 20 pacientes altamente sensibilizados en lista de espera de trasplante renal, se observó, en primer lugar, una débil relación entre la fuerza de los anticuerpos anti-HLA panIgG, medida como valor MFI obtenido en el ensayo SAB-panIgG sobre muestras de suero neto, y su capacidad de unir C1q ($r_{\text{neto}} = 0,248$). De hecho, el 29,2% (138/473) de los anticuerpos, que habitualmente se consideran de bajo riesgo inmunológico en la práctica clínica habitual por tener valores de MFI por debajo de 5.000, resultaron ser fijadores de complemento. Es más, el 10,4% (49/473) incluso fueron caracterizados como negativos ($\text{MFI} < 1.000$). Por el contrario, el 53,9% de los anticuerpos con valores de MFI fuertes (> 5.000), que habitualmente se prohíben en la práctica clínica, resultaron ser incapaces de unir C1q. El análisis de anticuerpos anti-HLA panIgG sobre muestras de suero neto es el estándar de la técnica, siendo, de hecho, la única determinación que se lleva a cabo en muchos centros como norma general. En

tales casos, si se aceptaran como válidos los valores netos de MFI obtenidos y las decisiones clínicas se tomaran en base a dichos valores, podrían cometerse importantes errores al implantar órganos a pacientes en presencia de DSA con bajo valor MFI (y teórico bajo riesgo), pero que podrían ser C1q-positivos. Si dicho órgano implantado fuera además un corazón, las implicaciones clínicas y éticas serían aún más graves. En cualquier caso, esta débil relación fue la que probablemente condujo a Chen y cols. (92) a considerar que el ensayo SAB-C1q sería capaz de discriminar entre anticuerpos fijadores y no fijadores de complemento con independencia de su valor MFI, lo que generó gran expectación, pues planteaba la posibilidad de modificar los algoritmos de estratificación del riesgo inmunológico pre-trasplante establecidos hasta el momento, basados únicamente en el valor MFI.

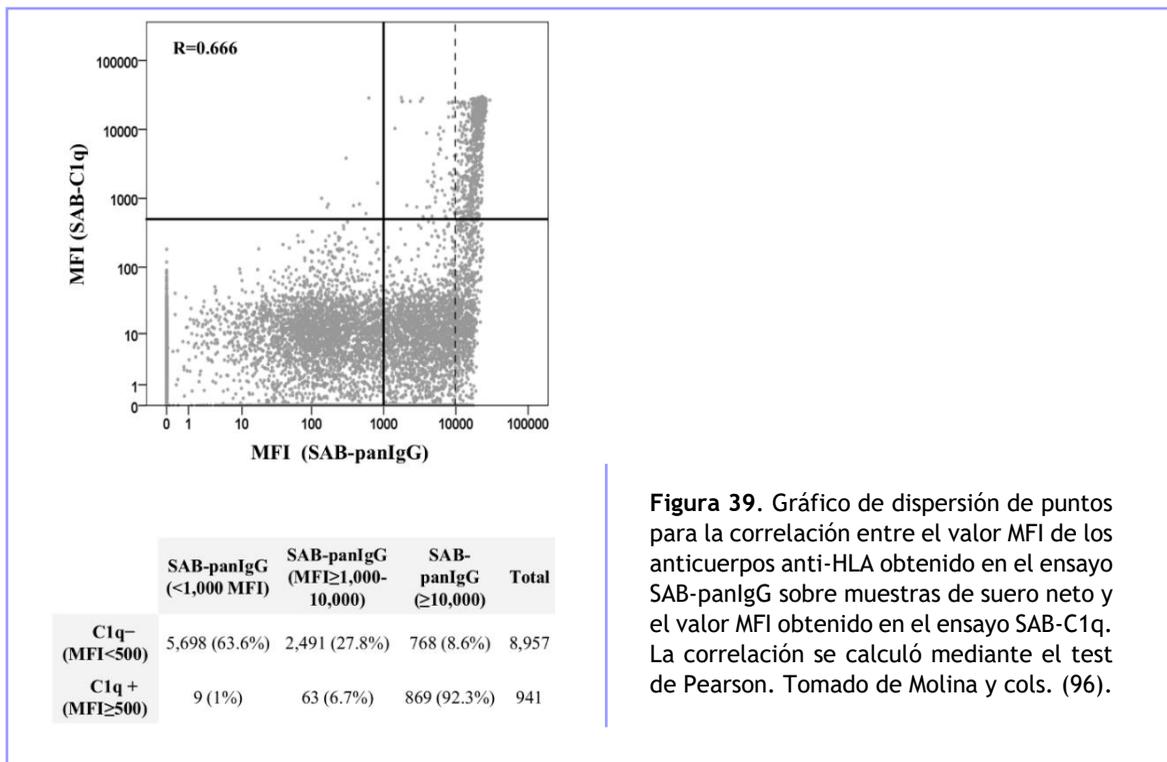


Figura 39. Gráfico de dispersión de puntos para la correlación entre el valor MFI de los anticuerpos anti-HLA obtenido en el ensayo SAB-panIgG sobre muestras de suero neto y el valor MFI obtenido en el ensayo SAB-C1q. La correlación se calculó mediante el test de Pearson. Tomado de Molina y cols. (96).

Desde que en 2011 se describiera el ensayo SAB-C1q por primera vez, varias publicaciones han demostrado la existencia de una asociación directa entre el título del anticuerpo y su capacidad de fijar complemento (90, 91, 98), más que con la existencia de un perfil particular de subclases de IgG (97). Sin embargo, una alta concentración de anticuerpos, escenario común en el suero de pacientes altamente sensibilizados, podría enmascarar su verdadero título y proporcionar valores de MFI muy alejados de la realidad. La dilución del suero se propuso, entonces, como una medida para revelar el verdadero valor MFI de los anticuerpos anti-HLA, lo que además mejoraba la relación con su capacidad de unir C1q. Así pues, Zeevi y cols. (98) obtuvieron una correlación de $r = 0,262$ entre la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA panIgG y su valor MFI en muestras sin diluir, mientras que dicha correlación fue de $r = 0,853$ cuando diluyeron las muestras 1:16. Tambur y cols. (91), por su parte, encontraron una correlación entre el valor MFI y la capacidad de unir C1q de $r = 0,461$ para moléculas HLA de Clase I y $r = 0,486$ para moléculas HLA de Clase II al analizar las muestras de suero neto, mientras que tras realizar estudios de diluciones seriadas o titulaciones, las correlaciones con el valor máximo de MFI obtenido para cada especificidad y su capacidad para unir C1q ascendió a $r = 0,786$ para moléculas HLA de Clase I y $r = 0,869$ para moléculas HLA de Clase II. Estos trabajos sugieren que la fuerza real del anticuerpo no puede determinarse correctamente al analizar muestras de suero neto, sino que es necesario recurrir a otras estrategias, como la pre-dilución. El impacto que los anticuerpos C1q-positivos ejercen sobre el aloinjerto es innegable y ha quedado demostrado en numerosas publicaciones (93-96). Sin embargo, parece que el poder deletéreo de estos anticuerpos podría estar más relacionado con su concentración que con un perfil particular de subclases de IgG.

Efectivamente, en este trabajo de tesis doctoral, la dilución de las muestras de suero permitió desenmascarar la fuerza real de una considerable proporción de anticuerpos. De esta manera, 121 anticuerpos cambiaron su estatus de especificidades de

bajo riesgo con valores negativos o débiles de MFI a especificidades de alto riesgo con valores de MFI elevados. Además, la dilución 1:16 aclaró la presencia de 114 especificidades que presentaban valores de MFI netos ≥ 5.000 . Por tanto, la dilución, sin duda, proporcionó una mejor estimación de la fuerza real de los anticuerpos, hecho que debería tenerse en cuenta en aquellos estudios pre-trasplante en los que el valor de MFI es el único criterio para establecer el riesgo inmunológico. De igual modo, y, a pesar de que la correlación obtenida todavía no fue completamente perfecta ($r_{\text{diluido}} = 0,817$), los datos apoyan la idea de que la capacidad de unir C1q está estrechamente relacionada con la fuerza (real) de los anticuerpos.

Para desenmascarar la fuerza (real) de los anticuerpos, también se han propuesto otros métodos, más allá de la dilución. El pre-tratamiento con calor suave a 56°C durante 30 minutos, que actúa desnaturalizando la fracción termolábil del suero, principalmente las proteínas del complemento, o el pre-tratamiento con EDTA, un quelante de calcio, parecen ser dos métodos efectivos para eliminar el efecto inhibitorio que causarían determinados componentes presentes en el suero. En este trabajo de tesis doctoral se analizó, asimismo, la variación en el valor MFI de los anticuerpos anti-HLA detectados sobre muestras de suero neto tras la aplicación de tales procedimientos y la correlación de dicha variación con la capacidad de unir C1q. Como se representa en la Figura 26, la correlación entre la capacidad de unir C1q de los anticuerpos y su fuerza obtenida tras aplicar los pre-tratamientos con calor o EDTA, aunque más alta con respecto a la obtenida con las muestras de suero neto ($r_{\text{calor}} = 0,699$ y $r_{\text{EDTA}} = 0,656$, respectivamente), no resultó ser tan fuerte como la obtenida al diluir ($r_{\text{diluido}} = 0,817$). Estos hallazgos podrían indicar que el calor y el EDTA como pre-tratamientos previos al análisis de los sueros, aunque útiles para prevenir el efecto prozona, al no detectarse anticuerpos débiles capaces de unir complemento, no serían tan eficientes a la hora de discriminar de forma efectiva niveles de anticuerpos que sobrepasan cierto umbral de MFI. A este respecto, la dilución

parece clarificar mucho más las diferencias existentes entre anticuerpos que están a diferente concentración, pero que en el suero no tratado e incluso en el suero pre-tratado con EDTA o calor, muestran valores de MFI similares. Cabe señalar que Tambur y cols. (91), en su análisis de 7.078 especificidades de anticuerpos, igualmente concluyen que el tratamiento con EDTA no siempre es suficiente para eliminar todos los factores inhibidores, dejando algunas especificidades de anticuerpos presentes con valores de MFI bajos en relación a su fuerza real, que sí podía ser desenmascarada con la dilución de los sueros. Schinstock y cols. (72) también afirman que el método más fiable para eliminar el efecto prozona es la dilución de los sueros y, de hecho, ellos de forma rutinaria siempre aplican una dilución 1:16 en las muestras de suero de todos los pacientes con un cPRA superior al 80%. Por otra parte, Jain y cols. (112) sostienen que el efecto prozona y el efecto inhibitorio deben ser considerados como fenómenos independientes dado que el tratamiento con calor y EDTA es efectivo con el segundo pero no con el primero, de manera que recomiendan la dilución del suero como primera opción para prevenir el efecto prozona causado por un exceso de anticuerpos.

Independientemente de la fuerza, la composición de subclases de IgG de una determinada especificidad de anticuerpo debe influir en su potencial capacidad de activar complemento, ya que las distintas subclases de IgG presentan diferentes propiedades y funciones, como anteriormente se ha mencionado. Desde una lógica teórica, se tiende a pensar en anticuerpos C1q-positivos y C1q-negativos como anticuerpos conformados principalmente por IgG1 e IgG3 y por IgG2 e IgG4, respectivamente. Incluso algunos artículos argumentan sobre el supuesto diferente riesgo inmunológico de dichos perfiles de subclases (46, 100). Sin embargo, a diferencia de los mencionados antes, en los que no se determina, en este trabajo, al analizar la composición de subclases de IgG de los anticuerpos anti-HLA panIgG se vio que las subclases fuertemente fijadoras de complemento (IgG1/IgG3) estaban presentes en el 98,9% de las especificidades de

anticuerpos detectadas, siendo únicamente 470 de ellas (46,9%) capaces de unir C1q. De hecho, el 98,5% de los anticuerpos no fijadores de presentaban IgG1 y/o IgG3 en su composición. Es decir, la reactividad *in vitro* C1q no puede explicarse bajo ningún concepto en base únicamente a diferencias en la composición de subclases de IgG. Estos resultados son similares a los previamente publicados por Schaub y cols. (97), quienes ya describen que una reacción C1q-negativa no necesariamente implica que el anticuerpo en cuestión esté únicamente formado por subclases sin la capacidad biológica de activar la cascada del complemento, es decir, IgG2/IgG4. Pero quizás, aún un hallazgo más sorprendente si cabe del análisis realizado en este trabajo de tesis doctoral fue que, precisamente las subclases IgG2 y/o IgG4 resultaron estar más frecuentemente presentes en los anticuerpos fijadores de C1q que en los no fijadores de C1q (78,9 vs. 38,6%; $p < 0,001$). Es decir, la probabilidad de encontrar subclases no fijadoras (IgG4) o débilmente fijadoras de complemento (IgG2) es mucho más elevada, paradójicamente, en aquellas especificidades de anticuerpos C1q-positivas.

La presencia de un perfil formado, no por una única subclase, sino por una combinación de varias subclases de IgG1-4 fue igualmente una propiedad más común en las especificidades de anticuerpos que fijaban complemento (79,5 vs. 40,3%; $p < 0,001$). Así pues, los anticuerpos C1q-positivos muestran siempre un valor de MFI (real) más elevado que se asocia con un mayor título de anticuerpo y están conformados principalmente por una combinación de subclases de IgG, siendo su presencia una señal inequívoca de una respuesta inmune más avanzada, estimulada por una exposición al antígeno más larga e intensa (49). Además de por su mayor concentración, la combinación de diferentes subclases de IgG podría hacer teóricamente a estos anticuerpos mucho más eficientes a la hora de ejecutar una respuesta, la cual, no sólo dependería de la activación de la cascada del complemento, principal vía de daño mediado por anticuerpos (59), sino que estaría orquestada por todo un conjunto de mecanismos efectores que actuarían de

forma sinérgica. Tales propiedades explicarían de forma más clara el diferente impacto fisiopatológico ejercido por estos anticuerpos C1q-positivos, manifestado por fenotipos de daño más severo sobre el aloinjerto y que diversos trabajos han evidenciado (93-96). Al igual que otros antes habían descrito (97, 100, 104, 113, 114), la presencia de las subclases IgG2 y/o IgG4 aisladas fue particularmente baja (1,1%). También se confirmaron estudios previos (100, 104) que describían que los anticuerpos anti-HLA panIgG positivos sin subclases detectables presentaban valores bajos de MFI, hecho que podría reflejar una diferente sensibilidad para la detección de los ensayos utilizados.

Ya que todos estos hallazgos sugerían que la capacidad de activar el complemento no podía ser simplemente explicada por la existencia de diferencias en la composición o perfil de subclases de IgG, habiendo demostrado que tanto los anticuerpos fijadores de C1q como los no fijadores de C1q están compuestos por una proporción parecida de subclases fijadoras de complemento (IgG1/IgG3), se decidió estudiar la fuerza de las subclases de forma individual, como propiedad implicada (Figura 29). Los resultados obtenidos demuestran que la fuerza de la IgG1, estimada como el valor MFI, es la que presenta una correlación más fuerte con la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA panIgG, particularmente tras la dilución de las muestras ($r_{\text{IgG1}} = 0,539$ y $r_{\text{IgG1dil}} = 0,796$). A pesar de la ampliamente demostrada fuerte capacidad de unir C1q de la subclase IgG3, su presencia no puede explicar la capacidad de fijar complemento de una especificidad particular, probablemente debido a su baja prevalencia (13,8%) y el bajo valor MFI que presenta (Figura 29.C). Dado que el cambio de subclases de IgG o switching se realiza en el siguiente orden: IgG3 \rightarrow IgG1 \rightarrow IgG2 \rightarrow IgG4 (49), que la IgG3 se infra-detecte podría ser debido a que es la primera subclase de IgG en la secuencia de switching y además, la que tiene la vida media más corta en circulación (99).

Está ampliamente demostrado que la activación de la cascada del complemento por la vía clásica depende tanto de la densidad de antígeno o epítomos, como de la concentración de anticuerpos (45). Recientemente, Wang y cols. (115) revelaron que la formación de los complejos C1q:IgG se produce de forma mayoritaria cuando la estequiometría es 1:6, es decir, cuando 6 moléculas de IgG están unidas al antígeno (Figura 40). En el contexto de las bolas-Luminex, la unión a C1q debe, por tanto, depender principalmente de la densidad de anticuerpos unidos a sus antígenos diana sobre la superficie de las bolas. Por consiguiente, altos títulos de subclases fuertemente fijadoras de C1q, fundamentalmente IgG1, de forma aislada o combinada con otras subclases de IgG, principalmente IgG2, serían capaces de formar el hexámero necesario para reclutar de manera eficiente la proteína C1q, primer componente que se recluta en la cascada del complemento activada por la vía clásica. Estos resultados están en la línea de aquellos recientemente publicados por Ponsirenas y cols. (116), quienes, a pesar de no revelar la verdadera fuerza de las subclases de IgG llevando a cabo la dilución de las muestras de suero, encontraron que la unión a C1q se detectaba en anticuerpos con alto valor MFI compuestos por IgG1 o múltiples subclases de IgG. Solo bajo ciertas condiciones, como una alta concentración de inmunoglobulina, incluso la IgG2 podría de forma eficiente activar el complemento (45). La positividad C1q observada en 3 anticuerpos compuestos únicamente por la subclase IgG2 podría ser debida a este hecho. Sin embargo, se trata de casos verdaderamente poco comunes (0,6%).

Más allá del título de anticuerpos, los resultados de este trabajo de tesis doctoral demostraron que la correlación entre la fuerza (real) de la IgG1 y el estatus C1q de los anticuerpos fue significativamente diferente entre los grupos de antígenos HLA ($p < 0,001$) que recubren las bolas Luminex, siendo la más fuerte, aquella obtenida con las bolas de antígenos HLA-DQ, tal y como se muestra en la Figura 31. Una de las limitaciones de los ensayos de fase sólida es el efecto de la variabilidad en la cantidad y calidad de los

antígenos. De hecho, Tait y cols. (117), en su guía consenso, manifiestan que las bolas cubiertas de HLA-DQ del fabricante One Lambda se caracterizan por estar enriquecidas en estos antígenos. Ésta probablemente sea la razón por la que se obtuvo una correlación más fuerte para las bolas de antígenos HLA-DQ, hallazgos que refuerzan la premisa de que la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA, definida por el ensayo SAB-C1q, deba también verse afectada por la diferente densidad relativa de los antígenos HLA que recubren la superficie de las bolas Luminex.

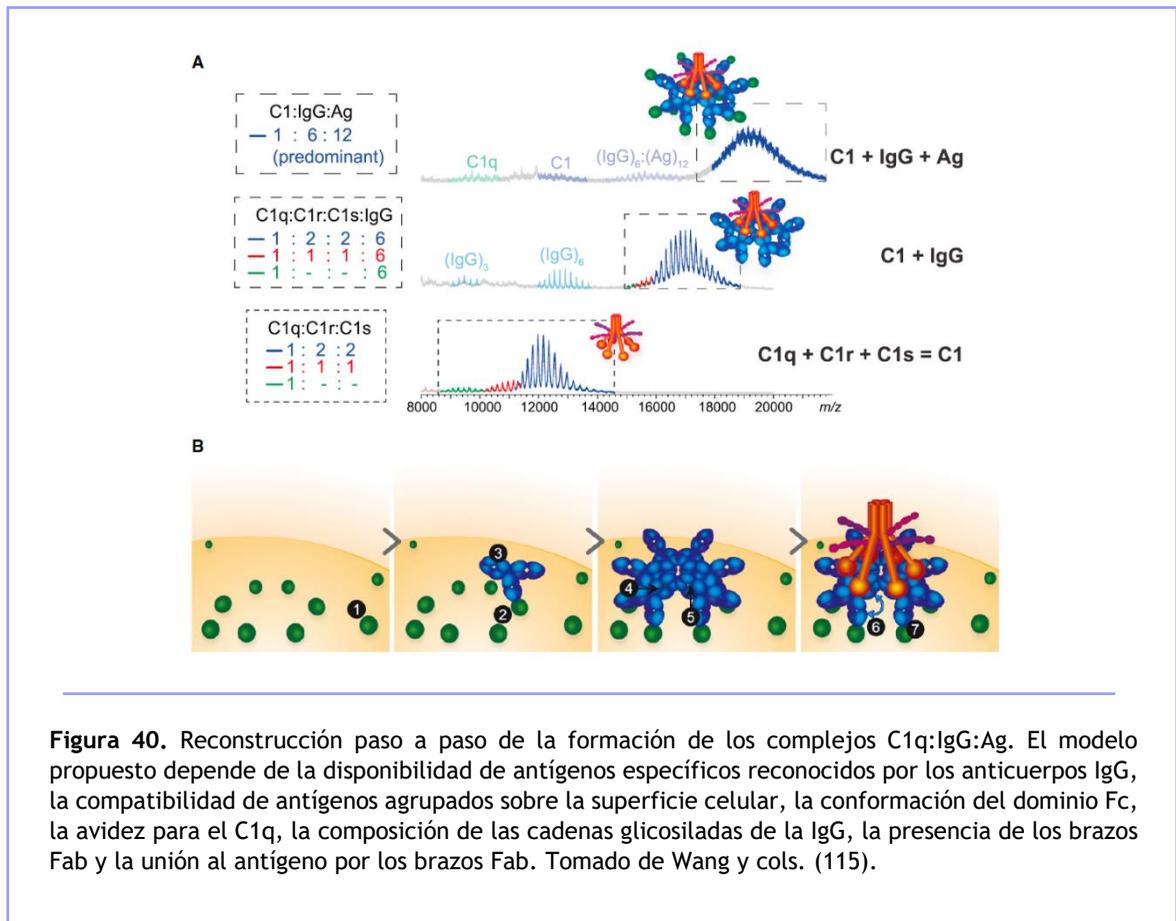


Figura 40. Reconstrucción paso a paso de la formación de los complejos C1q:IgG:Ag. El modelo propuesto depende de la disponibilidad de antígenos específicos reconocidos por los anticuerpos IgG, la compatibilidad de antígenos agrupados sobre la superficie celular, la conformación del dominio Fc, la avidez para el C1q, la composición de las cadenas glicosiladas de la IgG, la presencia de los brazos Fab y la unión al antígeno por los brazos Fab. Tomado de Wang y cols. (115).

La principal limitación de esta primera parte de la tesis doctoral fue que no se pudieron llevar a cabo análisis de diluciones seriadas o titulaciones. La literatura describe que la mayoría de los anticuerpos alcanzan su valor más elevado de MFI a una dilución 1:16 (91, 98), pero algunas especificidades podrían incluso estar más afectadas por el efecto prozona, alcanzando su máximo de MFI a diluciones mayores. Otra de las limitaciones fue que el tamaño de la cohorte y el número de anticuerpos analizados fueron limitados. A pesar de ello, los datos obtenidos fueron suficientes para mejorar y afianzar el conocimiento sobre las relaciones entre las diferentes propiedades de los anticuerpos.

Como resumen de este primer bloque de resultados, se ha profundizado en la relación existente entre las diferentes propiedades (valor MFI, capacidad de unir C1q y composición de subclases de IgG) con demostrado valor para la estratificación del riesgo inmunológico de los anticuerpos anti-HLA, principales biomarcadores pronóstico de la evolución del aloinjerto trasplantado. Los resultados obtenidos indican, pues, que casi todos los anticuerpos anti-HLA están compuestos por subclases fuertemente fijadoras de complemento, fundamentalmente IgG1, independientemente de su estatus C1q determinado en el ensayo SAB-C1q. Por el contrario, la presencia de subclases incapaces o débilmente capaces de unir C1q, como son IgG4/IgG2, respectivamente, es más común en los anticuerpos fijadores de C1q. La fuerza real de la IgG1, sola o, más habitualmente combinada con IgG2, y no el perfil de subclases de IgG1-4 en sí mismo, es la propiedad que mejor se correlaciona con la capacidad de unir C1q de una especificidad de anticuerpo determinada. No existen anticuerpos fijadores de C1q que presenten valores reales de MFI bajos. Las diferentes propiedades de anticuerpos caracterizadas por los métodos de detección disponibles habían sido evaluadas en un intento de mejorar la determinación del riesgo inmunológico bajo la presunción de que no están relacionadas. En este trabajo se demuestra que existe una estrecha relación entre la fuerza del anticuerpo circulante, que, por su parte, podría ser mejor estimada midiendo el valor MFI

obtenido tras la dilución de las muestras de suero, la presencia de una combinación de subclases de IgG, más allá de la *cuasi* omnipresente IgG1 y la capacidad de unir C1q.

Una vez esclarecida la relación entre las diferentes propiedades de los anticuerpos anti-HLA, en la segunda parte de este proyecto de tesis doctoral, se evaluó prospectivamente el impacto de la presencia de DSA preformados no fijadores de C1q sobre la función, ocurrencia de eventos de rechazo y supervivencia del aloinjerto renal, así como los posibles cambios producidos en las propiedades del DSA en el post-trasplante, incluyendo su valor MFI, su capacidad para fijar C1q y el perfil de subclases de IgG. Para ello, la cohorte de estudio de pacientes trasplantados de riñón único se clasificó según su perfil de anticuerpos anti-HLA antes del trasplante. Un total de 14 (19,4%) pacientes trasplantados con DSA no fijadores de C1q constituyeron el grupo de estudio DSA+, mientras que 58 (80,6%) pacientes trasplantados con anticuerpos anti-HLA no DSA constituyeron el grupo control DSA-. Los resultados obtenidos demuestran que: i) el valor MFI del DSA en el post-trasplante disminuye significativamente con respecto al pre-trasplante, estando dicha disminución asociada al aclaramiento de una o varias de las subclases del DSA; ii) no se registran cambios en el estatus C1q del DSA en el post-trasplante; iii) a pesar de ser la detección de depósitos de C4d más frecuente en los pacientes del grupo DSA+, no se observa una proporción significativamente diferente de eventos de ABMR y iiiii) al comparar la evolución del aloinjerto renal trasplantado, los resultados demuestran que su funcionalidad y supervivencia temprana no es significativamente diferente en los individuos del grupo DSA+ con respecto a los pacientes del grupo DSA-.

La evidencia de que los pacientes con DSA preformados tienden a evolucionar peor que aquellos sin DSA parece ampliamente aceptada (85). Sin embargo, hasta la mitad (entre el 20 y el 50%) de los pacientes con HLA-DSA no presentan peores evoluciones del

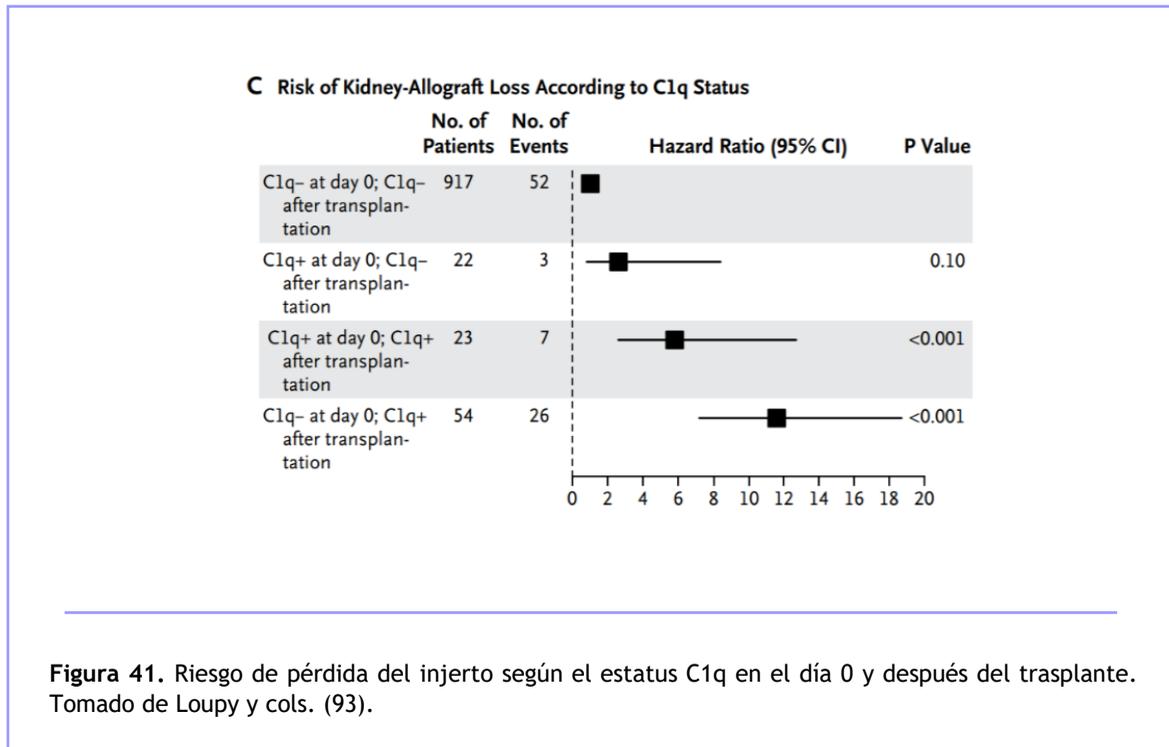
injerto, en términos de rechazo y supervivencia (118, 119). Entre los pacientes con DSA, los fenómenos de ABMR se presentan con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Así, existen desde DSA causantes de rechazo hiperagudo con fallo primario del injerto a DSA responsables de fenómenos de ABMR agudos y/o crónicos e incluso DSA asociados a episodios de ABMR subclínico, donde el daño subyacente al anticuerpo no se manifiesta clínicamente (54, 106). Esta extraordinaria variabilidad apoya la idea de que no todos los DSA son iguales en términos de patogenicidad y ejercen una influencia heterogénea sobre la evolución de los aloinjertos. Un reciente meta-análisis (120), en el que se incluyeron un total de 37 estudios de trasplante de diferentes órganos sólidos (riñón, hígado, corazón y pulmón) demuestra que los DSA fijadores de C1q circulantes son más deletéreos para la función del aloinjerto, incrementando el riesgo de rechazo y reduciendo la supervivencia. Varios grupos, entre ellos, el nuestro, concurren en que los anticuerpos capaces de unir C1q son más patogénicos (93-96). No obstante, algunos estudios muestran que las propiedades del DSA podrían cambiar durante el curso del trasplante. Es decir, un anticuerpo C1q-negativo en el pre-trasplante podría cambiar su estatus durante el post-trasplante, estando dicho cambio de estatus asociado a un incremento del riesgo inmunológico. Loupy y cols. (93), evaluando un total de 1.016 pacientes trasplantados de riñón, observaron que aquellos DSA que cambiaban de estatus desde C1q-negativo antes del trasplante hasta C1q-positivo después del trasplante eran los que presentaban el riesgo más elevado de pérdida del aloinjerto (Figura 41).

En este trabajo de tesis doctoral, no se observó ningún cambio en la capacidad de unir C1q de los DSA desde el pre- al post-trasplante (Figura 32) en la cohorte de pacientes DSA+, esto es, todos los DSA permanecieron invariables en cuanto a su capacidad de unir C1q, independientemente del perfil de subclases que los compusieran. Como se ha demostrado en la primera parte de este trabajo de tesis doctoral, el ensayo SAB-C1q no discrimina realmente entre subclases de IgG, sino que la capacidad de unir

C1q de una especificidad de anticuerpo particular es dependiente de su título o fuerza real. Así, es lógico que en el 85,7% de los DSA, cuyo valor MFI disminuyó significativamente ($p < 0,001$) en el post-trasplante, no cambiaran su estatus de C1q-negativos a C1q-positivos. Además, esta disminución en el valor MFI del DSA generalmente se acompañó del aclaramiento en el suero de la subclase o alguna de las subclases detectadas en el pre-trasplante o de la invariabilidad en el cambio de perfil (Figura 32). Lo que Loupy y cols. (93) describen en su publicación como cambio de estatus C1q, probablemente sea en realidad un cambio en el título o valor MFI del DSA, más que un cambio de subclase. De hecho, algunos estudios han demostrado la existencia de una asociación entre el ABMR agudo y un incremento en los niveles del DSA-panIgG (121-123). Los DSA, por tanto, cuyo título aumentara por encima de determinado umbral tras el trasplante, con cambio de estatus desde C1q-negativos a C1q-positivos, serían los de mayor riesgo inmunológico para el injerto y estrategias como la plasmaféresis o la inmunoglobulina intravenosa, efectivas para reducir el nivel de anticuerpos circulantes en sangre (124), podrían ser implementadas como tratamientos profilácticos en pacientes altamente sensibilizados trasplantados con DSA preformados desde el momento del trasplante.

En efecto, los anticuerpos anti-HLA pueden estar sometidos a fluctuaciones en su valor MFI, hecho ampliamente demostrado en los procedimientos de desensibilización que se aplican en determinados centros, donde el trasplante renal se programa cuando el valor MFI del DSA cae por debajo de cierto umbral (125). Así, la disminución significativa en el valor MFI del DSA observada en el grupo DSA+ probablemente sea consecuencia del efecto de la terapia inmunosupresora implementada. El estatus C1q de los dos DSA cuya MFI aumentó en el post-trasplante (14,3%), tampoco cambió, quizá porque dicho incremento no alcanzó un umbral suficiente como para reclutar o unir C1q de forma eficiente. Los valores MFI que predicen la positividad a C1q varían según los estudios con un amplio rango de sensibilidades y especificidades (110, 126, 127). Schaub y cols. (97)

por ejemplo, establecieron en 14.154 el umbral de MFI en el SAB-panIgG para detectar una especificidad como C1q-positiva con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 96% y en ninguno de los casos de la cohorte de pacientes de este trabajo de tesis doctoral, el incremento en el valor MFI del DSA en el post-trasplante alcanzó dicho valor.



La función del aloinjerto renal temprana de los pacientes trasplantados con DSA, evaluada según el valor de creatinina sérica, el filtrado glomerular, la presencia de proteínas en orina y el cociente creatinina/proteínas en orina, fue similar en ambos grupos de pacientes. De igual modo, la incidencia de AMBR sin componente celular fue similar en los pacientes del grupo DSA+ con respecto a los pacientes del grupo DSA- (p = 1,000). Esta ausencia de diferencias podría ser explicada por el estatus C1q-negativo pre-

trasplante del DSA. Varios estudios demuestran que la incidencia de ABMR en pacientes con DSA preformados es superior respecto a pacientes sin DSA (85, 89, 128). Malheiro y cols. (129), estudiando la evolución del aloinjerto en 462 trasplantados renales describió un incremento significativo en el riesgo de ABMR al año del trasplante ($p < 0,001$) en pacientes con DSA preformados (35,0%) con respecto a los pacientes sin DSA (0,9%). Sin embargo, De Sousa y cols. (130) no encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a la incidencia de ABMR entre grupos de pacientes con y sin DSA preformados. En esta línea, Aubert y cols. (131) estudiando 113 receptores de trasplante renal, de los cuales el 9,7% tenían DSA preformados tampoco encontraron una asociación entre la presencia de DSA antes del trasplante y el desarrollo de ABMR. La heterogeneidad en los resultados obtenidos entre estudios podría ser debida, en primera instancia, a la variabilidad de los puntos de corte establecidos para definir la positividad del DSA. Así, Malheiro y cols. (129) establecen, tal como en este estudio, el punto de corte en 1.000, mientras que Aubert y cols. (131) en 500 y de Sousa y cols. (130) ni siquiera lo definen. Estos estudios tampoco tienen en cuenta las propiedades de los DSA en lo que se refiere a capacidad de fijar C1q y composición de subclases de IgG, ni aplican procedimientos que puedan eliminar el efecto prozona. Ya se ha demostrado en la primera parte de este trabajo de tesis doctoral que la relación entre fuerza neta y la habilidad para unir C1q no es para nada perfecta, debido a que el valor MFI de los anticuerpos, como estimación de su fuerza, puede estar afectado por diferentes artefactos, especialmente en pacientes altamente sensibilizados. La no caracterización de propiedades importantes como el estatus C1q o la composición de subclases de IgG o, en su defecto, la no utilización de pre-tratamientos séricos que permitan eliminar el efecto prozona, podrían igualmente contribuir a la heterogeneidad de los resultados proporcionados por estos estudios.

Por otra parte, que la ocurrencia de eventos de rechazo humoral no fuera diferente en presencia de DSA no fijadores de C1q podría ser consecuencia de la ausencia

de cambios en el perfil y propiedades de dicho DSA a lo largo del periodo de seguimiento. En relación a los estudios antes mencionados, ni Malheiro y cols. (129) ni Aubert y cols. (131) estudiaron los cambios en el perfil de los DSA en el post-trasplante. Por su parte, de Sousa y cols. (130) describieron que únicamente en el 33,3% de pacientes con DSA preformados, el DSA persistía detectable al final del primer año después del trasplante, pero con un valor MFI significativamente inferior ($p < 0,05$). Como ya se ha expuesto anteriormente, parece que no todos los DSA son igual de patogénicos y que el cambio en sus propiedades, fundamentalmente en el valor MFI y el estatus C1q, podría estar estrechamente relacionado con la evolución del trasplante y el desarrollo de eventos de ABMR. Esta puede ser la razón por la que tanto estos autores, como en este trabajo de tesis doctoral, no se encontraran diferencias en la funcionalidad temprana del injerto ni en la incidencia de ABMR entre pacientes trasplantados con DSA preformados C1q-negativos y sin DSA preformados.

Sin embargo, la detección de depósitos de C4d en capilares tubulares y glomerulares, aunque de intensidad débil, sí fue más frecuente en los pacientes trasplantados con DSA preformados no fijadores de C1q (75,0 vs. 33,3; $p = 0,096$). No obstante, dicha interacción no fue suficiente para afectar de forma sustancial a la evolución temprana del aloinjerto renal trasplantado y, es por ello que, la supervivencia del aloinjerto renal hasta el final del periodo de seguimiento no fue significativamente peor ($p = 0,329$), lo que apoya, en cierta medida, la idea de que el trasplante de pacientes con este tipo de anticuerpos podría ser realizado con un riesgo inmunológico asumible en determinados contextos, ya que el débil daño humoral ejercido podría ser controlado. A pesar de la innegable huella de la interacción endotelio-DSA, el fenómeno más comúnmente descrito en los grupos de pacientes analizados (tanto DSA+, como DSA-) fue TCMR asociado a ABMR. Los ejemplos más comunes en los que el ABMR es diagnosticado y la deposición de complemento es identificada es aquella en la que se combinan ABMR y

TCMR (132). Desde un punto de vista clínico, a veces es difícil, en estos pacientes, determinar qué brazo del sistema inmune es el principal responsable del daño, lo que dificulta la elección del tratamiento. Bajos niveles de DSA (MFI < 1.000) con mínima deposición de C4d sugiere que el ABMR no es la principal causa de daño celular endotelial (59). Además, si asumimos la asociación MFI-C1q descrita, parece probable que estos anticuerpos sean no fijadores de C1q, lo que, sin duda, apoya este hallazgo. En la mayoría de los pacientes de la cohorte de estudio se produjo un aclaramiento del DSA circulante en términos de MFI, con invariabilidad en su estatus C1q, compatible con una débil deposición de C4d glomerular/peritubular. Este hecho, unido a una buena respuesta al tratamiento inmunosupresor del rechazo, sugieren que, fue la respuesta celular, probablemente asociada a mecanismos de alorreconocimiento HLA-directo, en el que los linfocitos del receptor reconocen el HLA intacto sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos del donante (133, 134), la principal causa del daño agudo en estos pacientes, quedando el componente humoral como un fenómeno secundario, aunque no por ello irrelevante. Desde un punto de vista teórico, el daño vascular asociado a fenómenos isquémicos o a rechazo celular provoca la liberación de DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) en el endotelio, induciendo inflamación por mecanismos innatos dependientes de la interacción de los DAMPs con receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que activarían la transcripción de genes de respuesta inflamatoria, induciendo maduración celular, expresión de moléculas co-estimuladoras y secreción de citoquinas proinflamatorias (135). La activación del endotelio, induciría además un aumento en la expresión de las moléculas HLA de clase II y de otros antígenos menores de histocompatibilidad (30). De igual modo, el daño vascular también podría promover la exposición de autoantígenos crípticos (30). En este contexto, los anticuerpos anti-HLA preformados presentes, incluso los anticuerpos dirigidos frente a dianas no-HLA, no

estudiados en el presente estudio, podrían interaccionar con el endotelio renal y agudizar el daño subyacente a fenómenos isquémicos o celulares inductores del proceso.

Finalmente, se ha descrito que los DSA *de novo* pueden aparecer en cualquier momento tras el trasplante y normalmente su aparición se ha asociado con un mayor riesgo de disfunción y pérdida del injerto (118, 136). Varios estudios que utilizan ensayos de fase sólida para la detección de anticuerpos (118, 137-140) estiman que la mediana de aparición de los DSA *de novo* varía de 3,8 (141) a 68 meses (142). La prevalencia acumulada a los 3 años después del trasplante también es muy variable, del 6% (118) al 38% (142). De Sousa y cols. (130) encontraron, dentro de su población de estudio, que en el grupo de pacientes sin DSA preformados, el 6,97% desarrolló DSA *de novo* y que éstos aparecieron dentro de los primeros 3 meses post-trasplante. Por su parte, Wiebe y cols. (136) establecieron que los pacientes trasplantados de riñón con bajo riesgo desarrollaban DSA *de novo* en una ratio de aproximadamente 2% por año, apareciendo habitualmente entre los dos años después del trasplante. En nuestra cohorte, las proporciones y el momento de aparición están en la línea de estos autores. Así, en el grupo DSA+ solo un paciente (7,14%) desarrolló DSA *de novo* y dicho DSA apareció dentro de los dos meses siguientes al trasplante. En el grupo DSA-, 3 (5,2%) pacientes desarrollaron DSA *de novo*, uno de ellos dentro de los 20 primeros días después del trasplante y los otros dos, a los 3 años después del trasplante. Se podría especular que el desarrollo de DSA *de novo* en una fase temprana (3 primeras semanas) fuera consecuencia de la reactivación de un clon de linfocito B de memoria alorreactivo frente al donante presente antes del trasplante. Desde esta perspectiva, el DSA no debería ser considerado realmente *de novo*, aunque sus niveles en circulación en el pre-trasplante fueran lo suficientemente bajos como para no ser detectables, teniendo en cuenta que el establecimiento del umbral de positividad se realiza respecto a un punto de corte predeterminado (MFI = 1,000) y que esta medida, además de ser semicuantitativa, no siempre tiene por qué ser exacta. Por otra parte,

aquellos DSA que aparecieran de forma tardía (a partir de un año después del trasplante), podrían ser verdaderos DSA *de novo*, surgidos tras un proceso de alorreconocimiento indirecto, en el que los alo-antígenos HLA, tras ser procesados, fueran presentados a los linfocitos del receptor por las células presentadoras de antígenos del receptor (133, 134). Entre los factores que predisponen a la aparición de DSA *de novo* se encuentra la no adherencia al tratamiento inmunosupresor, las incompatibilidades en HLA de Clase II o la presencia de anticuerpos anti-HLA antes del trasplante (143). Probablemente debido a que todos los pacientes de estudio tenían anticuerpos anti-HLA preformados, la proporción de pacientes que desarrollaron DSA *de novo* en el grupo DSA+ no fue significativamente diferente a la del grupo DSA- ($p = 1,000$), es decir, la presencia de DSA preformados, característica distintiva entre los dos grupos de pacientes con anticuerpos anti-HLA, no parecía afectar a la probabilidad de desarrollar DSA *de novo* tras el trasplante.

La principal limitación de esta segunda parte del estudio fue el tamaño limitado de la cohorte de pacientes, de manera que no se pudieron realizar análisis paramétricos ni multivariantes para la predicción del riesgo ni establecer asociaciones entre el perfil pre- y post-trasplante de subclases de IgG con la ocurrencia de eventos de rechazo, su fenotipo y la evolución del aloinjerto en términos de supervivencia. Otra de las limitaciones fue la ausencia de biopsias de protocolo, de forma que los eventos de rechazo subclínico no pudieron ser detectados en ninguno de los dos grupos de pacientes incluidos. Finalmente, el corto tiempo de seguimiento posiblemente fue insuficiente para detectar cambios a largo plazo en la función del aloinjerto y el perfil de anticuerpos. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron suficientes para demostrar la factibilidad del trasplante con DSA preformados no fijadores de C1q.

En resumen, la presencia de DSA no fijadores de C1q no ejerce un impacto significativamente deletéreo sobre la funcionalidad, ocurrencia de eventos rechazos y supervivencia a corto plazo del aloinjerto renal trasplantado. Además, bajo condiciones controladas de inmunosupresión, las propiedades de los anticuerpos, incluyendo su valor MFI, su estatus C1q y el perfil de subclases IgG1-4, no se ven afectadas. El trasplante renal como terapia sustitutiva se ha asociado a una reducción considerable del riesgo de mortalidad y eventos cardiovasculares, así como mejoras clínicamente relevantes en la calidad de vida (144). De esta manera, la posibilidad de trasplantar pacientes con DSA preformados que presenten ciertas características y bajo condiciones de estrecha monitorización inmunológica sería una opción plausible para aquellos pacientes en los que su perfil de anticuerpos anti-HLA los ha condenado a permanecer en lista de espera por tiempo indefinido.



Conclusiones

Estudio de las características de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida

Conclusiones

- ✓ La fuerza o valor real MFI de los anticuerpos anti-HLA panIgG está estrechamente relacionada con su capacidad para activar la cascada del complemento por la vía clásica mediante su unión a C1q.
- ✓ La dilución del suero es el método que mejor estima la fuerza o valor real MFI de los anticuerpos anti-HLA, más allá de la eliminación del efecto inhibitorio que otros pre-tratamientos, como el calor o el EDTA, puedan conseguir.
- ✓ Los anticuerpos fijadores de C1q nunca presentan valores de MFI bajos.
- ✓ El perfil de subclases IgG1-4 en sí mismo, no se relaciona con la capacidad de unir C1q de una especificidad de anticuerpos determinada, dado que la gran mayoría de los anticuerpos están compuestos por subclases fuertemente fijadoras de complemento (IgG1/IgG3).
- ✓ La presencia tanto de subclases incapaces o débilmente capaces de unir C1q (IgG4/IgG2), como de una mezcla de subclases de IgG es más común en los anticuerpos C1q-positivos.
- ✓ De entre todas las subclases, la fuerza o valor real MFI de la subclase IgG1 es la que mejor se correlaciona con la fuerza o valor real MFI de los anticuerpos anti-HLA panIgG y su capacidad de unir C1q.
- ✓ El ensayo SAB-C1q no discrimina, por tanto, entre subclases de IgG, sino entre títulos de anticuerpos anti-HLA (y títulos de subclases).

- ✓ Existe una estrecha relación entre la fuerza del anticuerpo circulante, la presencia de una mezcla de subclases de IgG, más allá de la *cuasi* omnipresente IgG1 y la capacidad de unir C1q de los anticuerpos anti-HLA panIgG.
- ✓ Todas las propiedades de los anticuerpos anti-HLA que pueden ser detectadas por los ensayos en fase sólida disponibles no son propiedades aisladas, sino que muestran una estrecha relación.

Estudio de la evolución del aloinjerto renal trasplantado según las propiedades de los anticuerpos anti-HLA detectadas por ensayos de fase sólida

Conclusiones

- ✓ En el post-trasplante y bajo un contexto inmunosupresor, se produce una disminución significativa del valor MFI del DSA, que se acompaña de un aclaramiento de las subclases de IgG que lo componen.
- ✓ El estatus C1q del DSA que depende, principalmente de su fuerza, permanece invariable en el post-trasplante con respecto al pre-trasplante.
- ✓ La función temprana del aloinjerto renal en pacientes trasplantados con DSA no fijadores de C1q no es diferente con respecto al trasplante sin DSA pero en presencia de anticuerpos anti-HLA.
- ✓ La presencia de DSA preformados no fijadores de C1q no aumenta la proporción de eventos de rechazo humoral diagnosticados por biopsia en un contexto de disfunción del aloinjerto en relación a la ausencia de DSA.
- ✓ La entidad patológica característica de los pacientes trasplantados con DSA no fijadores de C1q es el TCMR en presencia de componente humoral y depósitos de C4d de intensidad débil.
- ✓ La detección de depósitos de C4d es más habitual en el trasplante con DSA preformados C1q-negativos, lo que evidencia la interacción del DSA, probablemente de tipo IgG1, con el endotelio del aloinjerto renal.
- ✓ A pesar de la ocurrencia de rechazos y la detección más frecuente de depósitos de C4d, la supervivencia temprana del aloinjerto renal no es peor en pacientes

trasplantados con DSA preformados no fijadores de C1q con respecto a pacientes trasplantados sin DSA, pero con anticuerpos anti-HLA.

- ✓ La disminución en el valor MFI del DSA y sus subclases y la invariabilidad en su estatus C1q podrían ser los motivos por los que el aloinjerto renal trasplantado en un contexto de DSA preformados no fijadores de C1q mantuviera una buena función y supervivencia.
- ✓ El trasplante renal en presencia de DSA no fijadores de C1q podría ser una opción plausible en pacientes hiperinmunizados, ya que no se ven afectadas de forma significativa la funcionalidad y supervivencia tempranas del aloinjerto.

Conclusión final

El rechazo, a pesar de los cada vez más sofisticados fármacos inmunosupresores, sigue siendo la principal limitación para la supervivencia de los órganos trasplantados, constituyendo los anticuerpos anti-HLA, uno de los principales biomarcadores de su evolución. A partir de este trabajo de tesis doctoral, se han podido esclarecer ciertas cuestiones acerca de las propiedades intrínsecas del anticuerpo relacionadas con su potencial valor patológico, como que un perfil particular de subclases de IgG (IgG1/IgG3) en sí mismo no determina por completo la capacidad de unir complemento de los anticuerpos anti-HLA establecida por el ensayo SAB-C1q, sino que es la fuerza de las subclases de IgG, principalmente de la IgG1, que habitualmente aparece en combinación con IgG2, la que mejor se correlaciona con la capacidad de unir C1q. También, se ha podido comprobar que el trasplante renal con DSA preformados detectados por SAB-panIgG no fijadores de C1q podría ser factible en aquellos pacientes altamente sensibilizados sin otra opción, dado que, bajo un contexto inmunosupresor, la función y supervivencia tempranas del aloinjerto renal no son diferentes en relación al trasplante en ausencia de DSA. Estos hallazgos, junto con los publicados anteriormente por Molina y cols. (96), han permitido elaborar, en conjunción con el equipo de trasplante de la UGC de Nefrología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, un nuevo algoritmo para la definición de incompatibilidades HLA inaceptables y la asignación de órganos para pacientes altamente sensibilizados en lista de espera de trasplante renal (Figura 42), con el objetivo de ampliar sus posibilidades de trasplante, que ya está siendo aplicado. Sin embargo, todavía es necesario aunar esfuerzos y continuar profundizando en la fisiopatología del ambiente inflamatorio que supone la simple práctica del trasplante o las señales que propiciarían una activación del sistema inmune frente a aquellas que favorecieran la tolerancia del aloinjerto. El sistema inmune es el gran desconocido de los

sistemas orgánicos humanos. Por todo ello, este trabajo de tesis doctoral no debe ser sino el preámbulo de otros trabajos en la biomedicina traslacional que permitan mejorar la calidad de vida de las personas, objetivo principal y último de todo trabajo de investigación.

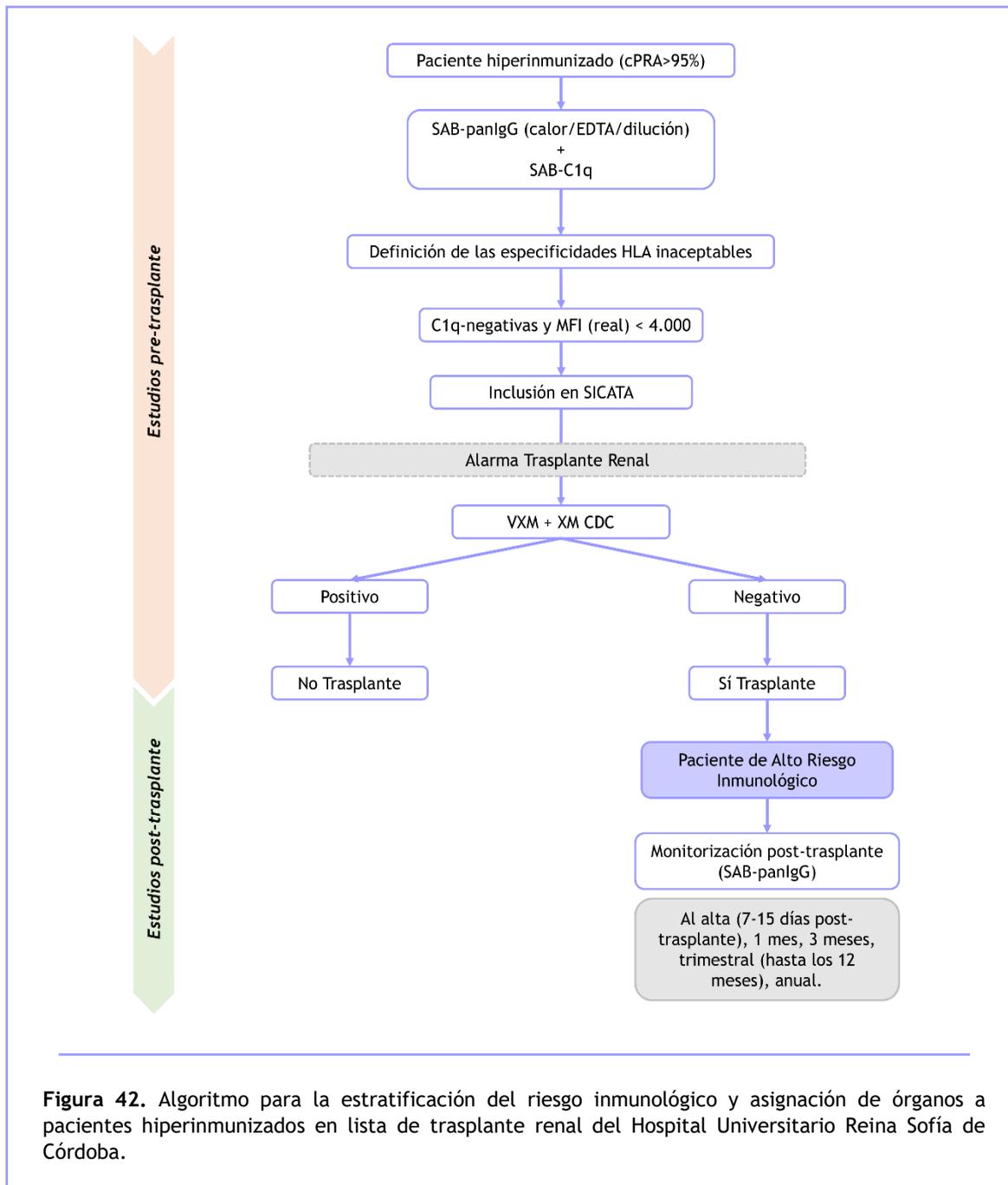


Figura 42. Algoritmo para la estratificación del riesgo inmunológico y asignación de órganos a pacientes hiperinmunizados en lista de trasplante renal del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

Glosario de abreviaturas

ABMR	Rechazo mediado por anticuerpos (<i>antibody-mediated rejection</i>)
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
AD	Autosómica dominante
CDC	Citotoxicidad dependiente de complemento
CDRs	Regiones determinantes de la complementariedad (<i>complementary determinant regions</i>)
CH	Dominio constante de la cadena pesada (<i>constant heavy</i>)
CL	Dominio constante de la cadena ligera (<i>constant light</i>)
cPRA	Panel calculado de reactividad de anticuerpos (<i>calculated panel reactive antibody</i>)
DAF	Factor acelerador del decaimiento (<i>decay accelerating factor</i>)
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño (<i>damage associated molecular patterns</i>)
DSA	Anticuerpo(s) anti-HLA específico(s) de donante (<i>donor-specific antibody/ies</i>)
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmuno-enzimático (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Fab	Fragmento de unión al antígeno (<i>fragment antigen-binding</i>)
Fc	Fragmento cristalizable (<i>fragment crystalline</i>)
FcγRs	Receptores Fc de la IgG
HLA	Antígeno(s) leucocitario(s) humano(s) (<i>human leukocyte antigen(s)</i>)
iDSA	DSA inmunodominante (<i>immunodominant DSA</i>)
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
MAC	Complejo de ataque a la membrana (<i>membrane attack complex</i>)
MFI	Intensidad de fluorescencia media (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>major histocompatibility complex</i>)
MPC	Proteína cofactor de membrana (<i>membrane protein cofactor</i>)
NK	Célula(s) asesina(s) natural(es) (<i>natural killer</i>)
PE	R-ficoeritrina

PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica (<i>periferal blood mononuclear cells</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate buffer saline</i>)
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones (<i>pattern recognition receptors</i>)
SAB	Bola(s) de antígeno único (<i>single antigen bead(s)</i>)
SD	Desviación estándar (<i>standard deviation</i>)
TCMR	Rechazo celular (<i>T-cell mediated rejection</i>)
VH	Dominio variable de la cadena pesada (<i>variable heavy</i>)
VL	Dominio variable de la cadena ligera (<i>variable light</i>)
VXM	Prueba cruzada virtual (<i>virtual cross-match</i>)
WB	Tampón de lavado (<i>wash buffer</i>)
XM	Prueba cruzada (<i>cross-match</i>)

Glosario de figuras

Figura 1. *Milagros de los santos médicos Cosme y Damián*. Atribuida a Fernando del Rincón. Hacia 1510. Óleo sobre tabla, 188 x 155 cm. Se representan dos milagros de estos gemelos que difundieron la medicina y el cristianismo: la reposición de una pierna gangrenada tomando una sana de un difunto, y la extracción de una serpiente de la boca de un segador. Museo Nacional del Prado.

Figura 2. Historia del Trasplante. Línea temporal que recoge los hitos históricos más relevantes del trasplante desde el sIII hasta el primer trasplante renal realizado en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba en 1979.

Figura 3. Ilustración original incluida en el *De curtorum chirurgia per insitionem* de Gaspare Tagliacozzi (1597), mostrando el “Método Italiano” para la reconstrucción nasal total.

Figura 4. El método de “triangulación” de Alexis Carrel (en la fotografía izquierda) para la anastomosis vascular término-terminal. Tomado de Carrel A. La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. *Lyon Med.* 1902; 98 : 859-864.

Figura 5. Publicación que narra el primer trasplante renal humano en la revista española *El Siglo Médico* (título del artículo, 1936). Equipo de cirugía que realizó el primer trasplante renal humano junto con el Dr. Voronoy (fotografía derecha). Tomados de Matevossian y cols. (8).

Figura 6. Joseph Murray y su equipo llevando a cabo el primer trasplante renal con éxito a largo plazo en 1954 entre gemelos idénticos. Tomado de Barker y cols. (2).

Figura 7. Sir Peter Medawar (fotografía izquierda) llevando a cabo un injerto de piel en una vaca (fotografía derecha). La inesperada aceptación de los injertos intercambiados entre bovinos gemelos fue la clave para entender la tolerancia. Tomada de Barker y cols. (2).

Figura 8. Rupert Billingham y Leslie Brent en su laboratorio (fotografía izquierda), donde inoculaban ratones neonatales con esplenocitos (imagen superior derecha). Los ratones adultos aceptaban los homoinjertos de piel de la cepa donante (imagen inferior derecha). Tomada de Barker y cols. (2).

Figura 9. Publicación en la que Jean Dausset (fotografía izquierda) describe por primera vez la existencia de grupos de antígenos leucocitarios (22). Por este trabajo recibiría el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1980.

Figura 10. Imagen tomada de Kissmeyer-Nielsen y cols. (24) en la que se observa la presencia de microtrombos en el glomérulo de uno de los riñones que había sufrido rechazo hiperagudo (imagen superior) y en el glomérulo del riñón de un conejo con la reacción experimental generalizada de Shwartzman (imagen inferior).

Figura 11. La biología del HLA. Diagrama simplificado del locus MHC humano (A), estructura esquematizada de las moléculas HLA de Clase I y II (B), estructura tridimensional del sitio de unión del péptido en las moléculas HLA de Clase I y II (C) y sistema de nomenclatura HLA (D), tomada de Robson et. al (28).

Figura 12. Vías de presentación antigénica según la procedencia del péptido presentado. Los péptidos procedentes del interior celular (A) son procesados en el proteasoma y presentados sobre moléculas HLA de Clase I, mientras que los péptidos procedentes del exterior celular (B) son procesados en el endosoma y presentados sobre moléculas HLA de Clase II. Tomado de Kobayashi y van den Elsen (32).

Figura 13. Estructura esquematizada de una molécula de anticuerpo tipo IgG secretada (A) e IgM de membrana (B). Tomada de Abbas y cols. (38).

Figura 14. Propiedades estructurales y glicosilación de los isotipos de inmunoglobulinas humanas IgM, IgG, IgE, IgA1 e IgA2. Tomado de Schroeder y cols. (39).

Figura 15. El papel de la cascada del complemento en el rechazo agudo mediado por anticuerpos del aloinjerto renal en presencia de DSA. Tomado de Stegall y cols. (59).

Figura 16. Esquema procedimental de la prueba cruzada por CDC. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) son aisladas mediante centrifugación en gradiente y se depositan en una placa Terasaki junto con el suero a testar. Tras una primera incubación se adiciona complemento de conejo, que lisa las células, en caso de que el suero contenga DSA. Finalmente, la prueba es revelada en el microscopio con la utilización de un colorante vital.

Figura 17. Esquema procedimental de la prueba cruzada por citometría de flujo. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) son aisladas mediante centrifugación en gradiente y se depositan sobre un tubo junto con el suero a testar. Tras una primera incubación se adiciona

un anticuerpo secundario anti-IgG-X-Fc para detectar la presencia de DSA sobre células T y/o B. Finalmente, la prueba es revelada en un citómetro de flujo.

Figura 18. Esquema procedimental para la detección de anticuerpos anti-HLA mediante ELISA. El suero a testar se deposita sobre los pocillos de la placa, donde previamente se encuentran inmovilizadas las moléculas HLA. El revelado de la prueba se realiza tras la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG-Fc conjugado con una enzima y un sustrato que vira de color.

Figura 19. Esquema procedimental para la detección de anticuerpos anti-HLA mediante tecnología Luminex. Las bolas recubiertas de varios antígenos (A) permiten la detección cualitativa de anticuerpos frente a moléculas de Clase I/II, mientras que las bolas recubiertas de un único antígeno (B) identifican la especificidad concreta. El revelado de la prueba se realiza tras la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG-Fc conjugado con PE.

Figura 20. Evolución de las técnicas de detección de anticuerpos anti-HLA en el tiempo. cPRA, calculated panel reactive antibody (panel de reactividad de anticuerpos calculado); LE, lista de espera.

Figura 21. Esquema procedimental para la detección de anticuerpos anti-HLA fijadores de C1q mediante tecnología Luminex, en el que el anticuerpo secundario anti-IgG-Fc conjugado con PE se ha sustituido por un anticuerpo secundario que reconoce de forma específica el componente C1q añadido de forma exógena.

Figura 22. Eventos de sensibilización HLA clásicos registrados en la cohorte de estudio (A) y clase de antígenos HLA frente a los que la cohorte de estudio presentaba anticuerpos (B).

Figura 23. Esquema procedimental para la detección de las subclases de anticuerpos anti-HLA IgG1-4 mediante el ensayo SAB-subclass, en el que el anticuerpo secundario anti-IgG-Fc conjugado con PE se ha sustituido por un anticuerpo secundario que reconoce de forma específica cada uno de los fragmentos Fc de las subclases de IgG1-4.

Figura 24. Algoritmo de clasificación de la población de estudio según su estatus de DSA pre-trasplante. XM, prueba cruzada.

Figura 25. Algoritmo de clasificación de los anticuerpos anti-HLA panIgG analizados por el ensayo estandarizado SAB-panIgG en muestras de suero neto y diluido 1:16 según los diferentes umbrales de positividad y fuerza establecidos. Se han incluido los valores MFI de cada grupo de anticuerpos. Tras la dilución 1:16, los anticuerpos anti-HLA han sido categorizados en C1q+ o C1q- (cuadros grises) según los resultados obtenidos en el ensayo SAB-C1q sobre muestras de suero neto.

Figura 26. Correlación entre el valor MFI obtenido en el ensayo SAB-panIgG de las 2.594 bolas analizadas en muestras de suero neto (A), diluidas 1:16 (B), pre-tratadas con calor (C) y pre-tratadas con EDTA (D) y el valor MFI obtenido en el ensayo SAB-C1q. Los valores MFI se han representado en un gráfico de dispersión de puntos. La correlación se ha calculado utilizando el test de Correlación de Pearson.

Figura 27. Correlación entre el valor MFI de los anticuerpos anti-HLA panIgG obtenidos por el ensayo estandarizado SAB-panIgG en muestras de suero pre-calentadas (eje X) y pre-tratadas con EDTA (eje Y). Los valores de MFI se han representado en un gráfico de dispersión de puntos. La correlación se ha determinado mediante el test de Correlación de Pearson.

Figura 28. Gráfico de dispersión de puntos para la correlación entre el valor MFI de los anticuerpos panIgG en el ensayo SAB-panIgG y el valor MFI de las subclases IgG1-4 en el ensayo SAB-subclass realizados con muestras de suero neto (A-D) y con muestras de suero diluidas 1:16 (E-F). La correlación se calculó mediante el test de Correlación de Pearson.

Figura 29. Gráfico de dispersión de puntos para la correlación entre el valor MFI de los anticuerpos panIgG en el ensayo SAB-C1q y el valor MFI de las subclases IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) e IgG4 (D) en el ensayo SAB-subclass realizado con muestras de suero neto y el valor MFI de las subclases IgG1 (E), IgG2 (F), IgG3 (G) e IgG4 (H) en el ensayo SAB-subclass realizado con muestras de suero diluidas 1:16. La correlación se determinó mediante el test de Correlación de Pearson.

Figura 30. Correlación entre el valor MFI de las subclases IgG1 e IgG2 en el ensayo SAB-subclass realizado sobre muestras de suero diluidas 1:16. Los valores MFI se han representado en un gráfico de dispersión de puntos. La correlación se ha determinado mediante el test de Correlación de Pearson.

Figura 31. Gráfico de dispersión de puntos para la correlación entre el valor MFI de la IgG1 obtenido en el ensayo SAB-subclass con muestras de suero diluidas 1:16 y el valor MFI de los anticuerpos anti-HLA panIgG obtenido en el ensayo SAB-C1q, considerando los antígenos HLA-A, HLA-B, HLA-Cw, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. La correlación se determinó mediante el test de Correlación de Pearson.

Figura 32. Gráfico barras para el valor MFI de los DSA obtenido en el ensayo SAB-panIgG (A) y SAB-C1q (B) realizado con muestras de suero neto antes del trasplante (barras oscuras) y un año después del trasplante (barras claras). Se han incluido las subclases de IgG detectadas en cada uno de los DSA antes y después del trasplante. El punto de corte en cada uno de los ensayos se ha representado con una línea discontinua roja.

Figura 33. Gráfico barras para el valor MFI de las subclases de IgG: IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) e IgG4 (D), analizadas en cada uno de los DSA obtenido en el ensayo SAB-subclass realizado con muestras de suero neto antes del trasplante (barras oscuras) y un año después del trasplante (barras claras). El punto de corte en cada uno de los ensayos (MFI = 500) se ha representado con una línea discontinua roja.

Figura 34. Valores medios de creatinina sérica (A), filtrado glomerular (B), presencia de proteínas en orina (C) y cociente creatinina/proteínas en orina (D) a los 15, 30, 90, 180 y 365 días después del trasplante renal en la cohorte de pacientes DSA+ (en rojo) y DSA- (azul). Las barras representan los errores estándar. El rango de normalidad está indicado con líneas discontinuas rojas. Bajo cada gráfico se muestran los valores de significación (p) obtenidos para la comparación de los resultados, mediante el test U de Mann-Whitney.

Figura 35. Proporción de resultados obtenidos en las biopsias del injerto renal realizadas al grupo DSA+ (A) y al grupo DSA- (B) bajo contexto de disfunción.

Figura 36. Supervivencia del aloinjerto renal de los 24 pacientes trasplantados de riñón único según el estatus de DSA en el momento del trasplante. Las curvas Kaplan-Meier para la supervivencia del aloinjerto hasta el final del periodo de seguimiento se representaron estratificando la cohorte de estudio según la presencia o no de DSA antes del trasplante. Las curvas se compararon utilizando el test log-rank.

Figura 37. Esquema para la detección de anticuerpos anti-HLA mediante SAB-C1q (A) y SAB-subclass (B). En el SAB-C1q, el revelado de la prueba se realiza tras la adicción de un anticuerpo secundario anti-C1q conjugado con PE. En el SAB-sucblass, cada una de las subclases de IgG1-4 se detecta utilizando un anticuerpo secundario anti-IgGX-Fc que se une de forma específica a cada fracción Fc de las subclases.

Figura 38. Supervivencia del aloinjerto renal de los 389 pacientes trasplantados de riñón único según el estatus de DSA en el momento del trasplante y su capacidad para fijar C1q. Las curvas Kaplan-Meier para la supervivencia del aloinjerto se compararon utilizando el test log-rank. Tomado de Molina y cols. (96).

Figura 39. Gráfico de dispersión de puntos para la correlación entre el valor MFI de los anticuerpos anti-HLA obtenido en el ensayo SAB-panIgG sobre muestras de suero neto y el valor MFI obtenido en el ensayo SAB-C1q. La correlación se calculó mediante el test de Pearson. Tomado de Molina y cols. (96).

Figura 40. Reconstrucción paso a paso de la formación de los complejos C1q:IgG:Ag. El modelo propuesto depende de la disponibilidad de antígenos específicos reconocidos por los anticuerpos IgG, la compatibilidad de antígenos agrupados sobre la superficie celular, la conformación del dominio Fc, la avidéz para el C1q, la composición de las cadenas glicosiladas de la IgG, la presencia de los brazos Fab y la unión al antígeno por los brazos Fab. Tomado de Wang y cols. (115).

Figura 41. Riesgo de pérdida del injerto según el estatus C1q en el día 0 y después del trasplante. Tomado de Loupy y cols. (93).

Figura 42. Algoritmo para la estratificación del riesgo inmunológico y asignación de órganos a pacientes hiperinmunizados en lista de trasplante renal del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

Glosario de tablas

Tabla 1. Propiedades de las subclases de IgG humanas. Modificada de Vidarsson y cols. (48).

Tabla 2. Caracterización de los anticuerpos anti-HLA panIgG positivos según la molécula HLA frente a la que estaban dirigidos.

Tabla 3. Subclases IgG1-4 presentes en los anticuerpos anti-HLA panIgG identificadas por el ensayo SAB-subclass llevado a cabo en muestras de suero neto.

Tabla 4. Perfil de subclases de IgG de los anticuerpos anti-HLA fijadores y no fijadores de C1q.

Tabla 5. Características clínicas e inmunológicas de la cohorte de estudio según su estatus de anticuerpos anti-HLA antes del trasplante.

Tabla 6. Caracterización de los DSA según la molécula HLA frente a la que estaban dirigidos.



Referencias

1. Ang GC. History of skin transplantation. *Clin Dermatol* (2005) 23 (4): 320-324. doi: 10.1016/j.clindermatol.2004.07.013.
2. Barker CF, Markmann JF. Historical overview of transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2013) 3 (4): a014977. doi: 10.1101/cshperspect.a014977.
3. Lee KC, Joory K, Moiemien NS. History of burns: The past, present and the future. *Burns Trauma* (2014) 2 (4): 169-180. doi: 10.4103/2321-3868.143620.
4. González-Martín M. G-BJM. Trasplante Renal. *Grupo Aula Médica, SA* (2000).
5. A. C. La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. *Lyon Med* (1902) 98: 859-864.
6. Sade RM. A Surprising Alliance: Two Giants of the 20th Century. *Ann Thorac Surg* (2017) 103 (6): 2015-2019. doi: 10.1016/j.athoracsur.2016.12.056.
7. Silverstein AM. The lymphocyte in immunology: from James B. Murphy to James L. Gowans. *Nat Immunol* (2001) 2 (7): 569-571. doi: 10.1038/89706.
8. Matevossian E, Kern H, Huser N, Doll D, Snopok Y, Nahrig J, et al. Surgeon Yurii Voronoy (1895-1961) - a pioneer in the history of clinical transplantation: in memoriam at the 75th anniversary of the first human kidney transplantation. *Transpl Int* (2009) 22 (12): 1132-1139. doi: 10.1111/j.1432-2277.2009.00986.x.
9. Dempster WJ. Kidney homotransplantation. *Br J Surg* (1953) 40 (163): 447-465. doi: 10.1002/bjs.18004016309.
10. Dempster WJ. The effects of cortisone on the homotransplanted kidney. *Arch Int Pharmacodyn Ther* (1953) 95 (3-4): 253-282.

11. Billingham RE, Krohn PL, Medawar PB. Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. *Br Med J* (1951) 1 (4716): 1157-1163. doi: 10.1136/bmj.1.4716.1157.
12. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc* (1956) 160 (4): 277-282. doi: 10.1001/jama.1956.02960390027008.
13. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat* (1943) 77 (Pt 4): 299-310.
14. Ribatti D. Peter Brian Medawar and the discovery of acquired immunological tolerance. *Immunol Lett* (2015) 167 (2): 63-66. doi: 10.1016/j.imlet.2015.07.004.
15. Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat* (1944) 78 (Pt 5): 176-199.
16. Medawar PB. A second study of the behaviour and fate of skin homografts in rabbits: A Report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat* (1945) 79 (Pt 4): 157-176.
17. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* (1953) 172 (4379): 603-606. doi: 10.1038/172603a0.
18. R. C. Essay: History of Transplantation. *Lancet* (2006) 368: s51-s2. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69928-5.
19. Schwartz R, Dameshek W. Drug-induced immunological tolerance. *Nature* (1959) 183 (4676): 1682-1683. doi: 10.1038/1831682a0.

20. Calne RY. The initial study of the immunosuppressive effects of 6-mercaptopurine and azathioprine in organ transplantation and a few words on cyclosporin A. *World J Surg* (1982) 6 (5): 637-640. doi: 10.1007/bf01657885.
21. H.T. T. The discovery and development of cyclosporin. *Mycologist* (1998) 12 (1): 20-22. doi: 10.1016/S0269-915X(98)80100-6.
22. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol* (1958) 20 (1-4): 156-166.
23. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* (1958) 181 (4625): 1735-1736. doi: 10.1038/1811735a0.
24. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* (1966) 2 (7465): 662-665.
25. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* (2004) 5 (12): 889-899. doi: 10.1038/nrg1489.
26. Williams TM. Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *J Mol Diagn* (2001) 3 (3): 98-104. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60658-7.
27. Picascia A, Grimaldi V, Napoli C. From HLA typing to anti-HLA antibody detection and beyond: The road ahead. *Transplant Rev (Orlando)* (2016) 30 (4): 187-194. doi: 10.1016/j.trre.2016.07.007.
28. Robson KJ, Ooi JD, Holdsworth SR, Rossjohn J, Kitching AR. HLA and kidney disease: from associations to mechanisms. *Nat Rev Nephrol* (2018) 14 (10): 636-655. doi: 10.1038/s41581-018-0057-8.

29. Howell WM, Carter V, Clark B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *J Clin Pathol* (2010) 63 (5): 387-390. doi: 10.1136/jcp.2009.072371.
30. Piotti G, Palmisano A, Maggiore U, Buzio C. Vascular endothelium as a target of immune response in renal transplant rejection. *Front Immunol* (2014) 5: 505. doi: 10.3389/fimmu.2014.00505.
31. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* (2000) 343 (10): 702-709. doi: 10.1056/NEJM200009073431006.
32. Kobayashi KS, van den Elsen PJ. NLR5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol* (2012) 12 (12): 813-820. doi: 10.1038/nri3339.
33. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SG. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res* (2015) 43 (Database issue): D423-431. doi: 10.1093/nar/gku1161.
34. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* (1969) 280 (14): 735-739. doi: 10.1056/NEJM196904032801401.
35. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* (2003) 3 (6): 665-673.
36. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* (2012) 12 (2): 388-399. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03840.x.
37. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen JP, Suberbielle C, Anglicheau D, et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet* (2013) 381 (9863): 313-319. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61265-3.
38. Abbas AK, Lichtman, A. H. and Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. (2018).

39. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* (2010) 125 (2 Suppl 2): S41-52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
40. Malisan F, Briere F, Bridon JM, Harindranath N, Mills FC, Max EE, et al. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med* (1996) 183 (3): 937-947. doi: 10.1084/jem.183.3.937.
41. Fear DJ, McCloskey N, O'Connor B, Felsenfeld G, Gould HJ. Transcription of Ig germline genes in single human B cells and the role of cytokines in isotype determination. *J Immunol* (2004) 173 (7): 4529-4538. doi: 10.4049/jimmunol.173.7.4529.
42. Pene J, Gauchat JF, Lecart S, Drouet E, Guglielmi P, Boulay V, et al. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J Immunol* (2004) 172 (9): 5154-5157. doi: 10.4049/jimmunol.172.9.5154.
43. Avery DT, Bryant VL, Ma CS, de Waal Malefyt R, Tangye SG. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J Immunol* (2008) 181 (3): 1767-1779. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.1767.
44. Valenzuela NM, Hickey MJ, Reed EF. Antibody Subclass Repertoire and Graft Outcome Following Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* (2016) 7: 433. doi: 10.3389/fimmu.2016.00433.
45. Thomas KA, Valenzuela NM, Reed EF. The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcγR3s, and endothelium in transplant rejection. *Trends Mol Med* (2015) 21 (5): 319-329. doi: 10.1016/j.molmed.2015.02.004.
46. Khovanova N, Daga S, Shaikhina T, Krishnan N, Jones J, Zehnder D, et al. Subclass analysis of donor HLA-specific IgG in antibody-incompatible renal transplantation reveals a significant association of IgG4 with rejection and graft failure. *Transpl Int* (2015) 28 (12): 1405-1415. doi: 10.1111/tri.12648.

47. Roux KH, Strelets L, Michaelsen TE. Flexibility of human IgG subclasses. *J Immunol* (1997) 159 (7): 3372-3382.
48. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* (2014) 5: 520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
49. Valenzuela NM, Schaub S. The Biology of IgG Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation. *Transplantation* (2018) 102 (15 Suppl 1): S7-S13. doi: 10.1097/TP.0000000000001816.
50. Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant* (2010) 15 (1): 42-48. doi: 10.1097/MOT.0b013e3283352a50.
51. Resch T, Fabritius C, Ebner S, Ritschl P, Kotsch K. The Role of Natural Killer Cells in Humoral Rejection. *Transplantation* (2015) 99 (7): 1335-1340. doi: 10.1097/TP.0000000000000757.
52. Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, et al. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* (2011) 118 (8): 2150-2158. doi: 10.1182/blood-2011-04-345579.
53. Valenzuela NM, Reed EF. Antibodies to HLA Molecules Mimic Agonistic Stimulation to Trigger Vascular Cell Changes and Induce Allograft Injury. *Curr Transplant Rep* (2015) 2 (3): 222-232. doi: 10.1007/s40472-015-0065-6.
54. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* (2014) 14 (2): 272-283. doi: 10.1111/ajt.12590.
55. Ferguson R. Acute rejection episodes--best predictor of long-term primary cadaveric renal transplant survival. *Clin Transplant* (1994) 8 (3 Pt 2): 328-331.

56. Cosio FG, Lager DJ, Lorenz EC, Amer H, Gloor JM, Stegall MD. Significance and implications of capillaritis during acute rejection of kidney allografts. *Transplantation* (2010) 89 (9): 1088-1094. doi: 10.1097/TP.0b013e3181d368f1.
57. Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* (1991) 86 (3): 464-470. doi: 10.1111/j.1365-2249.1991.tb02954.x.
58. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol* (2015) 6: 257. doi: 10.3389/fimmu.2015.00257.
59. Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nat Rev Nephrol* (2012) 8 (11): 670-678. doi: 10.1038/nrneph.2012.212.
60. Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med* (2011) 17 (3-4): 317-329. doi: 10.2119/molmed.2010.00149.
61. Deuel TF, Senior RM, Huang JS, Griffin GL. Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* (1982) 69 (4): 1046-1049. doi: 10.1172/jci110509.
62. Murata K, Baldwin WM, 3rd. Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplant Rev (Orlando)* (2009) 23 (3): 139-150. doi: 10.1016/j.trre.2009.02.005.
63. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins. *Nature* (1964) 204: 998-1000. doi: 10.1038/204998b0.
64. Fuller TC, Cosimi AB, Russell PS. Use of an antiglobulin-ATG reagent for detection of low levels of alloantibody-improvement of allograft survival in presensitized recipients. *Transplant Proc* (1978) 10 (2): 463-466.

65. Barger B, Shroyer TW, Hudson SL, Deierhoi MH, Barber WH, Curtis JJ, et al. Successful renal allografts in recipients with crossmatch-positive, dithioerythritol-treated negative sera. Race, transplant history, and HLA-DR1 phenotype. *Transplantation* (1989) 47 (2): 240-245. doi: 10.1097/00007890-198902000-00008.
66. Vartdal F, Gaudernack G, Funderud S, Bratlie A, Lea T, Ugelstad J, et al. HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation--a fast and reliable technique. *Tissue Antigens* (1986) 28 (5): 301-312.
67. Vaidya S, Partlow D, Susskind B, Noor M, Barnes T, Gugliuzza K. Prediction of crossmatch outcome of highly sensitized patients by single and/or multiple antigen bead luminex assay. *Transplantation* (2006) 82 (11): 1524-1528. doi: 10.1097/01.tp.0000246311.43634.0a.
68. Buelow R, Mercier I, Glanville L, Regan J, Ellingson L, Janda G, et al. Detection of panel-reactive anti-HLA class I antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay or lymphocytotoxicity. Results of a blinded, controlled multicenter study. *Hum Immunol* (1995) 44 (1): 1-11.
69. Lucas DP, Paparounis ML, Myers L, Hart JM, Zachary AA. Detection of HLA class I-specific antibodies by the QuikScreen enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* (1997) 4 (3): 252-257.
70. Tait BD. Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients - Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. *Front Immunol* (2016) 7: 570. doi: 10.3389/fimmu.2016.00570.
71. Haarberg KM, Tambur AR. Detection of donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Br Med Bull* (2014) 110 (1): 23-34. doi: 10.1093/bmb/ldu005.
72. Schinstock CA, Gandhi MJ, Stegall MD. Interpreting Anti-HLA Antibody Testing Data: A Practical Guide for Physicians. *Transplantation* (2016) 100 (8): 1619-1628. doi: 10.1097/TP.0000000000001203.

73. Bostock IC, Alberu J, Arvizu A, Hernandez-Mendez EA, De-Santiago A, Gonzalez-Tableros N, et al. Probability of deceased donor kidney transplantation based on % PRA. *Transpl Immunol* (2013) 28 (4): 154-158. doi: 10.1016/j.trim.2013.05.002.
74. Amico P, Honger G, Steiger J, Schaub S. Utility of the virtual crossmatch in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* (2009) 14 (6): 656-661. doi: 10.1097/MOT.0b013e328331c169.
75. Amico P, Hirt-Minkowski P, Honger G, Gurke L, Mihatsch MJ, Steiger J, et al. Risk stratification by the virtual crossmatch: a prospective study in 233 renal transplantations. *Transpl Int* (2011) 24 (6): 560-569. doi: 10.1111/j.1432-2277.2011.01235.x.
76. Susal C, Ovens J, Mahmoud K, Dohler B, Scherer S, Ruhstroth A, et al. No association of kidney graft loss with human leukocyte antigen antibodies detected exclusively by sensitive Luminex single-antigen testing: a Collaborative Transplant Study report. *Transplantation* (2011) 91 (8): 883-887. doi: 10.1097/TP.0b013e3182100f77.
77. Orandi BJ, Garonzik-Wang JM, Massie AB, Zachary AA, Montgomery JR, Van Arendonk KJ, et al. Quantifying the risk of incompatible kidney transplantation: a multicenter study. *Am J Transplant* (2014) 14 (7): 1573-1580. doi: 10.1111/ajt.12786.
78. Sicard A, Amrouche L, Suberbielle C, Carmagnat M, Candon S, Thervet E, et al. Outcome of kidney transplantations performed with preformed donor-specific antibodies of unknown etiology. *Am J Transplant* (2014) 14 (1): 193-201. doi: 10.1111/ajt.12512.
79. Viglietti D, Lefaucheur C, Glotz D. Evidence for an important role of both complement-binding and noncomplement-binding donor-specific antibodies in renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* (2016) 21 (4): 433-440. doi: 10.1097/MOT.0000000000000324.
80. Gebel HM, Bray RA. HLA antibody detection with solid phase assays: great expectations or expectations too great? *Am J Transplant* (2014) 14 (9): 1964-1975. doi: 10.1111/ajt.12807.

81. Caro-Oleas JL, Gonzalez-Escribano MF, Gonzalez-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chaves V, Gentil-Govantes MA, et al. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* (2012) 27 (3): 1231-1238. doi: 10.1093/ndt/gfr429.
82. Kannabhiran D, Lee J, Schwartz JE, Friedlander R, Aull M, Muthukumar T, et al. Characteristics of Circulating Donor Human Leukocyte Antigen-specific Immunoglobulin G Antibodies Predictive of Acute Antibody-mediated Rejection and Kidney Allograft Failure. *Transplantation* (2015) 99 (6): 1156-1164. doi: 10.1097/TP.0000000000000511.
83. Salvade I, Aubert V, Venetz JP, Golshayan D, Saouli AC, Matter M, et al. Clinically-relevant threshold of preformed donor-specific anti-HLA antibodies in kidney transplantation. *Hum Immunol* (2016) 77 (6): 483-489. doi: 10.1016/j.humimm.2016.04.010.
84. Susal C, Roelen DL, Fischer G, Campos EF, Gerbase-DeLima M, Honger G, et al. Algorithms for the determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients. *Tissue Antigens* (2013) 82 (2): 83-92. doi: 10.1111/tan.12137.
85. Marfo K, Ajaimy M, Colovai A, Kayler L, Greenstein S, Lubetzky M, et al. Pretransplant Immunologic Risk Assessment of Kidney Transplant Recipients With Donor-Specific Anti-Human Leukocyte Antigen Antibodies. *Transplantation* (2014) 98 (10): 1082-1088. doi: 10.1097/TP.0000000000000191.
86. Susal C, Seidl C, Schonemann C, Heinemann FM, Kauke T, Gombos P, et al. Determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients: recommendations of the German Society for Immunogenetics. *Tissue Antigens* (2015) 86 (5): 317-323. doi: 10.1111/tan.12682.
87. Zecher D, Bach C, Preiss A, Staudner C, Utpatel K, Evert M, 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.

88. Mizutani K, Terasaki P, Hamdani E, Esquenazi V, Rosen A, Miller J, et al. The importance of anti-HLA-specific antibody strength in monitoring kidney transplant patients. *Am J Transplant* (2007) 7 (4): 1027-1031. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01721.x.

89. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* (2010) 21 (8): 1398-1406. doi: 10.1681/ASN.2009101065.

90. 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.

91. Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KM, Cusick MF, Gordon RA, Leventhal JR, et al. Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. *Am J Transplant* (2015) 15 (9): 2421-2430. doi: 10.1111/ajt.13295.

92. Chen G, Sequeira F, Tyan DB. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol* (2011) 72 (10): 849-858. doi: 10.1016/j.humimm.2011.07.001.

93. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* (2013) 369 (13): 1215-1226. doi: 10.1056/NEJMoa1302506.

94. Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, Savchik C, Masiakos P, Colovai A, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. *Kidney Int* (2016) 89 (1): 209-216. doi: 10.1038/ki.2015.275.

95. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins S, Fonseca I, Beirao I, et al. Determining donor-specific antibody C1q-binding ability improves the prediction of antibody-mediated rejection in human leucocyte antigen-incompatible kidney transplantation. *Transpl Int* (2017) 30 (4): 347-359. doi: 10.1111/tri.12873.
96. Molina J, Navas A, Aguera ML, Rodelo-Haad C, Alonso C, Rodriguez-Benot A, et al. Impact of Preformed Donor-Specific Anti-Human Leukocyte Antigen Antibody C1q-Binding Ability on Kidney Allograft Outcome. *Front Immunol* (2017) 8: 1310. doi: 10.3389/fimmu.2017.01310.
97. Schaub S, Honger G, Koller MT, Liwski R, Amico P. Determinants of C1q binding in the single antigen bead assay. *Transplantation* (2014) 98 (4): 387-393. doi: 10.1097/TP.000000000000203.
98. Zeevi A, Lunz J, Feingold B, Shullo M, Bermudez C, Teuteberg J, et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* (2013) 32 (1): 98-105. doi: 10.1016/j.healun.2012.09.021.
99. Hickey MJ, Valenzuela NM, Reed EF. Alloantibody Generation and Effector Function Following Sensitization to Human Leukocyte Antigen. *Front Immunol* (2016) 7: 30. doi: 10.3389/fimmu.2016.00030.
100. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen JP, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *J Am Soc Nephrol* (2016) 27 (1): 293-304. doi: 10.1681/ASN.2014111120.
101. Hamdani G, Goebel JW, Brailey P, Portwood EA, Hooper DK, Girnita AL. IGG3 anti-HLA donor-specific antibodies and graft function in pediatric kidney transplant recipients. *Pediatr Transplant* (2018) 22 (5): e13219. doi: 10.1111/petr.13219.

102. Berth M. Complement Interference Is Not the Same as a Prozone Phenomenon. *Am J Transplant* (2016) 16 (5): 1638. doi: 10.1111/ajt.13650.
103. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads--a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* (2011) 92 (5): 510-515. doi: 10.1097/TP.0b013e31822872dd.
104. Honger G, Hopfer H, Arnold ML, Spriewald BM, Schaub S, Amico P. Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection. *Transplantation* (2011) 92 (1): 41-47. doi: 10.1097/TP.0b013e31821cdf0d.
105. Haas M. The Revised (2013) Banff Classification for Antibody-Mediated Rejection of Renal Allografts: Update, Difficulties, and Future Considerations. *Am J Transplant* (2016) 16 (5): 1352-1357. doi: 10.1111/ajt.13661.
106. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant* (2018) 18 (2): 293-307. doi: 10.1111/ajt.14625.
107. Cecka JM. Calculated PRA (CPRA): the new measure of sensitization for transplant candidates. *Am J Transplant* (2010) 10 (1): 26-29. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02927.x.
108. West JC, Bisordi JE, Squiers EC, Latsha R, Miller J, Kelley SE. Length of time on dialysis prior to renal transplantation is a critical factor affecting patient survival after allografting. *Transpl Int* (1992) 5 Suppl 1: S148-150. doi: 10.1007/978-3-642-77423-2_47.
109. Cosio FG, Alamir A, Yim S, Pesavento TE, Falkenhain ME, Henry ML, et al. Patient survival after renal transplantation: I. The impact of dialysis pre-transplant. *Kidney Int* (1998) 53 (3): 767-772. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00787.x.

110. Crespo M, Torio A, Mas V, Redondo D, Perez-Saez MJ, Mir M, et al. Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: does C1q-fixation matter? *Transpl Immunol* (2013) 29 (1-4): 28-33. doi: 10.1016/j.trim.2013.07.002.
111. Courant M, Visentin J, Linares G, Dubois V, Lepreux S, Guidicelli G, et al. The disappointing contribution of anti-human leukocyte antigen donor-specific antibodies characteristics for predicting allograft loss. *Nephrol Dial Transplant* (2018) 33 (10): 1853-1863. doi: 10.1093/ndt/gfy088.
112. Jain D, Choudhuri J, Chauhan R, Dorwal P, Sharma D, Tiwari AK, et al. False negative single antigen bead assay: Is it always an effect of prozone? *J Clin Lab Anal* (2018) 32 (2). doi: 10.1002/jcla.22237.
113. Lowe D, Higgins R, Zehnder D, Briggs DC. Significant IgG subclass heterogeneity in HLA-specific antibodies: Implications for pathogenicity, prognosis, and the rejection response. *Hum Immunol* (2013) 74 (5): 666-672. doi: 10.1016/j.humimm.2013.01.008.
114. Arnold ML, Ntokou IS, Doxiadis, II, Spriewald BM, Boletis JN, Iniotaki AG. Donor-specific HLA antibodies: evaluating the risk for graft loss in renal transplant recipients with isotype switch from complement fixing IgG1/IgG3 to noncomplement fixing IgG2/IgG4 anti-HLA alloantibodies. *Transpl Int* (2014) 27 (3): 253-261. doi: 10.1111/tri.12206.
115. Wang G, de Jong RN, van den Bremer ET, Beurskens FJ, Labrijn AF, Ugurlar D, et al. Molecular Basis of Assembly and Activation of Complement Component C1 in Complex with Immunoglobulin G1 and Antigen. *Mol Cell* (2016) 63 (1): 135-145. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.016.
116. Ponsirenas RVG, Cazarote HB, Araujo SA, Wanderley DC, Shimakura S, Valdameri JS, et al. Anti-HLA Donor-Specific IgG Subclasses and C1q-binding Evolution in Posttransplant Monitoring. *Transplant Direct* (2018) 4 (9): e385. doi: 10.1097/TXD.0000000000000823.

117. Tait BD, Susal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* (2013) 95 (1): 19-47. doi: 10.1097/TP.0b013e31827a19cc.
118. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* (2012) 12 (5): 1157-1167. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04013.x.
119. Irving CA, Carter V, Gennery AR, Parry G, Griselli M, Hasan A, et al. Effect of persistent versus transient donor-specific HLA antibodies on graft outcomes in pediatric cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* (2015) 34 (10): 1310-1317. doi: 10.1016/j.healun.2015.05.001.
120. Bouquegneau A, Loheac C, Aubert O, Bouatou Y, Viglietti D, Empana JP, et al. Complement-activating donor-specific anti-HLA antibodies and solid organ transplant survival: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* (2018) 15 (5): e1002572. doi: 10.1371/journal.pmed.1002572.
121. Higgins R, Lowe D, Hathaway M, Lam F, Kashi H, Tan LC, et al. Rises and falls in donor-specific and third-party HLA antibody levels after antibody incompatible transplantation. *Transplantation* (2009) 87 (6): 882-888. doi: 10.1097/TP.0b013e31819a6788.
122. Mohamed MA, Muth B, Vidyasagar V, Foley D, Fernandez L, Hofmann RM, et al. Post-transplant DSA monitoring may predict antibody-mediated rejection in sensitized kidney transplant recipients. *Clin Transpl* (2011): 389-394.
123. de Castro MCR, Barbosa EA, Souza RP, Agena F, de Souza PS, Maciel G, et al. The Kinetics of Anti-HLA Antibodies in the First Year after Kidney Transplantation: In Whom and When Should They Be Monitored? *J Transplant* (2018) 2018: 8316860. doi: 10.1155/2018/8316860.

124. Pinelli DF, Zachary AA, Friedewald JJ, Gjertson DW, Evans MA, Chatroop EN, et al. Prognostic tools to assess candidacy for and efficacy of antibody-removal therapy. *Am J Transplant* (2019) 19 (2): 381-390. doi: 10.1111/ajt.15007.
125. Sethi S, Choi J, Toyoda M, Vo A, Peng A, Jordan SC. Desensitization: Overcoming the Immunologic Barriers to Transplantation. *J Immunol Res* (2017) 2017: 6804678. doi: 10.1155/2017/6804678.
126. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schonemann C. Systematic comparison of four cell- and Luminex-based methods for assessment of complement-activating HLA antibodies. *Transplantation* (2013) 95 (5): 694-700. doi: 10.1097/TP.0b013e31827b3dc3.
127. Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, Wiebe C, Thauat O, Dubois V, et al. Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival. *J Am Soc Nephrol* (2016) 27 (2): 615-625. doi: 10.1681/ASN.2014040326.
128. Loupy A, Jordan SC. Transplantation: Donor-specific HLA antibodies and renal allograft failure. *Nat Rev Nephrol* (2013) 9 (3): 130-131. doi: 10.1038/nrneph.2013.18.
129. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins LS, Fonseca I, Beirao I, et al. Analysis of preformed donor-specific anti-HLA antibodies characteristics for prediction of antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transpl Immunol* (2015) 32 (2): 66-71. doi: 10.1016/j.trim.2015.01.002.
130. de Sousa MV, Gonzalez AC, Zollner RL, Mazzali M. Effect of Preformed or De Novo Anti-HLA Antibodies on Function and Graft Survival in Kidney Transplant Recipients. *Ann Transplant* (2018) 23: 457-466. doi: 10.12659/AOT.908491.
131. Aubert V, Venetz JP, Pantaleo G, Pascual M. Low levels of human leukocyte antigen donor-specific antibodies detected by solid phase assay before transplantation are frequently clinically irrelevant. *Hum Immunol* (2009) 70 (8): 580-583. doi: 10.1016/j.humimm.2009.04.011.

132. Everly MJ, Everly JJ, Susskind B, Brailey P, Arend LJ, Alloway RR, et al. Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection. *Transplantation* (2008) 86 (12): 1754-1761. doi: 10.1097/TP.0b013e318190af83.
133. Zakrzewski JL, van den Brink MR, Hubbell JA. Overcoming immunological barriers in regenerative medicine. *Nat Biotechnol* (2014) 32 (8): 786-794. doi: 10.1038/nbt.2960.
134. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. *Front Immunol* (2016) 7: 582. doi: 10.3389/fimmu.2016.00582.
135. LaRosa DF, Rahman AH, Turka LA. The innate immune system in allograft rejection and tolerance. *J Immunol* (2007) 178 (12): 7503-7509. doi: 10.4049/jimmunol.178.12.7503.
136. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Pochinco D, Birk PE, Ho J, et al. Rates and determinants of progression to graft failure in kidney allograft recipients with de novo donor-specific antibody. *Am J Transplant* (2015) 15 (11): 2921-2930. doi: 10.1111/ajt.13347.
137. Piazza A, Poggi E, Ozzella G, Borrelli L, Scornajenghi A, Iaria G, et al. Post-transplant donor-specific antibody production and graft outcome in kidney transplantation: results of sixteen-year monitoring by flow cytometry. *Clin Transpl* (2006): 323-336.
138. Yabu JM, Higgins JP, Chen G, Sequeira F, Busque S, Tyan DB. C1q-fixing human leukocyte antigen antibodies are specific for predicting transplant glomerulopathy and late graft failure after kidney transplantation. *Transplantation* (2011) 91 (3): 342-347. doi: 10.1097/TP.0b013e318203fd26.
139. Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB. Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant* (2012) 16 (1): 12-17. doi: 10.1111/j.1399-3046.2011.01599.x.

140. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation* (2013) 95 (3): 410-417. doi: 10.1097/TP.0b013e31827d62e3.
141. de Kort H, Willicombe M, Brookes P, Dominy KM, Santos-Nunez E, Galliford JW, et al. Microcirculation inflammation associates with outcome in renal transplant patients with de novo donor-specific antibodies. *Am J Transplant* (2013) 13 (2): 485-492. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04325.x.
142. Fotheringham J, Angel C, Goodwin J, Harmer AW, McKane WS. Natural history of proteinuria in renal transplant recipients developing de novo human leukocyte antigen antibodies. *Transplantation* (2011) 91 (9): 991-996. doi: 10.1097/TP.0b013e3182126ed0.
143. Morath C, Opelz G, Zeier M, Susal C. Clinical relevance of HLA antibody monitoring after kidney transplantation. *J Immunol Res* (2014) 2014: 845040. doi: 10.1155/2014/845040.
144. Pascual J, Zamora J, Pirsch JD. A systematic review of kidney transplantation from expanded criteria donors. *Am J Kidney Dis* (2008) 52 (3): 553-586. doi: 10.1053/j.ajkd.2008.06.005.



Anexos

ANEXO 1: PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA: CRIBADO (MIXED I/II) Y ESPECIFICIDADES (SAB)

Preparación de las muestras de suero

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

Incubación de las muestras de suero con las bolas Luminex

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

Preparación del tampón de lavado o wash buffer (WB)

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

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

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

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

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

Lavado de las muestras

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

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

Preparación del anti-panIgG PE

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

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

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

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

Incubación con IgG anti-panIgG-PE

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

Lavado de las muestras y preparación para adquisición en plataforma Luminex

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

ANEXO 2: PROCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA FIJADORES DE C1q EN SUERO (SAB-C1q ASSAY)

Preparación del suero a analizar

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

Preparación de C1q humano

1. Calcular el volumen de C1q necesario.

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

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

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

3. Vortexar la dilución y mantener en hielo.

Incubación de las muestras

1. Enriquecer el suero con C1q:

- a. Añadir 0,5 μL de control positivo a cada uno de los pocillos de la placa, previamente diseñada según el número de muestras que se van a testar.
 - b. Añadir 5 μL de C1q humano previamente diluido en tampón HEPES en cada uno de los pocillos de la placa.
 - c. Añadir 5 μL de cada suero descomplementado a testar al pocillo correspondiente de la placa.
 - d. Mezclar.
2. Añadir 2,5 μL de bolas magnéticas Luminex recubiertas de Ag-HLA único (SAB) a cada pocillo según corresponda (Clase I o Clase II). Vortexar para mezclar.
 3. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente en un agitador y en oscuridad.
 4. Añadir 5 μL de IgG anti-C1q conjugada con PE (lista para usar). Incubar durante 20 minutos en agitación y oscuridad a temperatura ambiente.
 5. Realizar un lavado, añadiendo 80 μL de PBS a cada pocillo. Centrifugar 5 minutos a 1.300 g. Eliminar sobrenadante (inversión de la placa).
 6. Añadir 80 μL de líquido de sistema. Vortexar. Proceder a la lectura de la placa en plataforma Luminex.

ANEXO 3: PRE-TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS: DILUCIÓN, CALOR Y EDTA

Dilución de las muestras 1:16

La dilución de las muestras para llevar a cabo el ensayo SAB (SAB-panIgG o SAB-subclass) se realizará tras el paso de “Preparación de las muestras de suero”

Para ello, se realizará una dilución 1:16 utilizando tampón fosfato salino (PBS).

La dilución se ajustará según el volumen final de muestra necesario.

Ej: Si vamos a necesitar 20 μ L de muestra:

Se tomarán 1,25 μ L de suero neto que se diluirán en 18,75 μ L de PBS.

Pre-calentamiento de las muestras

El pre-tratamiento con calor para realizar el ensayo SAB-panIgG se realizará tras el paso de “Preparación de las muestras de suero”. Tras la centrifugación de las muestras, se traspasará 30 μ L de sobrenadante a un eppendorf nuevo, previamente rotulado.

Se pre-calentará el termo-bloque a 56 °C. Una vez que alcance la temperatura, se introducirán los eppendorf con las muestras de suero durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las muestras se traspasarán a una caja con hielo.

Pre-tratamiento con EDTA

El pre-tratamiento con EDTA para realizar el ensayo SAB-panIgG se realizará tras el paso de “Preparación de las muestras de suero”.

Para ello, se preparará una dilución de EDTA (liofilizado, ref. E9884 -500G, Sigma-Aldrich) a una molaridad final de 25 mM.

Como una vez preparado el EDTA, se añadirá 1 μL por cada 20 μL de suero neto, la dilución stock se preparará concentrada 20x, es decir a 500 mM. La masa molecular del EDTA es 292,24.

$$500 \text{ mM} = \frac{\frac{\text{g}}{292,24 \text{ g/mol}}}{1 \text{ L}}$$

Necesitaríamos 146.120 g de EDTA por cada 1 L de H₂O destilada. Para preparar 1 mL, necesitaríamos 146,12 mg, que pesáramos en balanza de precisión.

Una vez preparado el EDTA a 500 mM, se procederá a la realización del ensayo SAB-panIgG.

ANEXO 4: PREPARACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-IgG1-4

IgG1

Ab-anti IgG1 a [] de 0,1 mg / 0,2 ml

$$[]_{\text{final}} = 5 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

Para $X_1(\mu\text{L})$ de V_{final} , tomar $0,01 \times X_1(\mu\text{L})$ de IgG1 a [] de 0,1 mg/ 0,2 mL y diluir en $X_1 - 0,01X_1$ (μL) de Wash Buffer;

Para un V_{final} de 100 μL tomar 1 μL de IgG1 a [] de 0,1 mg/ 0,2 mL y diluir en 99 μL [] de Wash Buffer;

IgG2

Ab-anti IgG2 a [] de 0,1 mg / 1 ml

$$[]_{\text{final}} = 5 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

Para X_2 (μL) de V_{final} , tomar $0,05 \times X_2(\mu\text{L})$ de IgG2 a [] de 0,1 mg/ 1 mL y diluir en $X_2 - 0,05 \mu\text{L} \times X_2$ de Wash Buffer;

Así para un $X_2 = 100 \mu\text{L}$ en el pocillo, tomar $0,05 \mu\text{L} \times 100(\mu\text{L}) = 5 \mu\text{L}$ y diluir en $100 \mu\text{L} - 5 \mu\text{L} = 95 \mu\text{L}$ de Wash Buffer.

IgG3

Ab-anti IgG3 a [] de 0,1 mg / 1 ml

$$[]_{\text{final}} = 20 \times 10^{-3} \text{ mg/ml};$$

Para $X_1(\mu\text{L})$ de V_{final} , tomar $0,2X_3 (\mu\text{L})$ de IgG3 a [] de 0,1 mg/ 1 mL y diluir en $X_1 - 0,2X_3(\mu\text{L})$ de Wash Buffer;

Así para un $X_3 = 100 \mu\text{L}$ en el pocillo, tomar $0,2 \mu\text{L} \times 100(\mu\text{L}) = 20 \mu\text{L}$ y diluir en $100 \mu\text{L} - 20 \mu\text{L} = 80 \mu\text{L}$ de Wash Buffer.

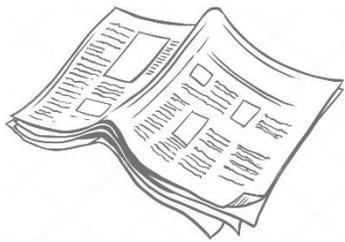
IgG4

Ab-anti IgG4 a [] de 0,1 mg / 1 ml

[]_{final} = 20×10^{-3} mg/ml;

Para $X_1(\mu\text{L})$ de V_{final} , tomar $0,2X_3 (\mu\text{L})$ de IgG3 a [] de 0,1 mg/ 1 mL y diluir en $X_1 - 0,2X_3(\mu\text{L})$ de Wash Buffer;

Así para un $X_3 = 100 \mu\text{L}$ en el pocillo, tomar $0,2 \mu\text{L} \times 100(\mu\text{L}) = 20 \mu\text{L}$ y diluir en $100 \mu\text{L} - 20 \mu\text{L} = 80 \mu\text{L}$ de Wash Buffer.



Producción científica derivada de la tesis



Characterization of the C1q-Binding Ability and the IgG1-4 Subclass Profile of Preformed Anti-HLA Antibodies by Solid-Phase Assays

Ana Navas^{1,2}, Juan Molina^{1,2*}, María-Luisa Agüera^{1,3}, Ipek Guler¹, Aurora Jurado^{1,2}, Alberto Rodríguez-Benot^{1,3}, Corona Alonso^{1,2} and Rafael Solana^{1,2}

¹ Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Cordoba, Spain, ² Department of Immunology and Allergy, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain, ³ Department of Nephrology, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Jean Harb,
INSERM U1064 Centre de Recherche
en Transplantation et
Immunologie, France

Reviewed by:

Valerie Dubois,
Etablissement Français du Sang
Auvergne Rhône-Alpes, France
Jakob Nilsson,
University Hospital Zürich, Switzerland

*Correspondence:

Juan Molina
juan.e.molina.alcaide@gmail.com

Specialty section:

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

Received: 20 April 2019

Accepted: 08 July 2019

Published: 02 August 2019

Citation:

Navas A, Molina J, Agüera M-L,
Guler I, Jurado A, Rodríguez-Benot A,
Alonso C and Solana R (2019)
Characterization of the C1q-Binding
Ability and the IgG1-4 Subclass Profile
of Preformed Anti-HLA Antibodies by
Solid-Phase Assays.
Front. Immunol. 10:1712.
doi: 10.3389/fimmu.2019.01712

Humoral alloimmunity, particularly that triggered by preformed antibodies against human leukocyte antigens (HLA), is associated with an increased prevalence of rejection and reduced transplant survival. The high sensitivity of solid phase assays, based on microbeads coated with single antigens (SAB), consolidated them as the gold-standard method to characterize anti-HLA antibodies, ensuring a successful allograft allocation. Mean fluorescence intensity (MFI) provided by SAB is regularly used to stratify the immunological risk, assuming it as a reliable estimation of the antibody-level, but it is often limited by artifacts. Beyond MFI, other properties, such as the complement-binding ability or the IgG1-4 subclass profile have been examined to more accurately define the clinical relevance of antibodies and clarify their functional properties. However, there are still unresolved issues. Neat serum-samples from 20 highly-sensitized patients were analyzed by SAB-panIgG, SAB-IgG1-4 subclass and SAB-C1q assays. All 1:16 diluted serum-samples were additionally analyzed by SAB-panIgG and SAB-IgG1-4 subclass assays. A total of 1,285 anti-HLA antibodies were identified as positive, 473 (36.8%) of which were C1q-binding. As expected, serum-dilution enhanced the correlation between the C1q-binding ability and the antibody-strength, measured as the MFI ($r_{neat} = 0.248$ vs. $r_{diluted} = 0.817$). SAB-subclass assay revealed at least one IgG1-4 subclass in 1,012 (78.8%) positive antibody-specificities. Among them, strong complement-binding subclasses, mainly IgG1, were particularly frequent (98.9%) and no differences were found between C1q- and non-C1q-binding antibodies regarding their presence (99.4 vs. 98.5%; $p = 0.193$). In contrast, weak or non-C1q-binding subclasses (IgG2/IgG4) were more commonly detected in C1q-binding antibodies (78.9 vs. 38.6%; $p < 0.001$). Interestingly, a strong association was found between the C1q-binding ability and the IgG1 strength ($r_{IgG1dil} = 0.796$). Though lower, the correlation between the IgG2 strength and the C1q-binding ability was also strong ($r_{IgG2dil} = 0.758$), being both subclasses closely related ($r_{IgG1-IgG2} = 0.817$).

We did not find any correlation with the C1q-binding ability considering the remaining subclasses. In conclusion, we demonstrate that a particular profile of IgG subclasses (IgG1/IgG3) itself does not determine at all the ability to bind complement of anti-HLA antibodies assessed by SAB-C1q assay. It is the IgG subclass strength, mainly of IgG1, which usually appears in combination with IgG2, that best correlates with it.

Keywords: anti-HLA antibodies, C1q-binding ability, humoral alloimmunity, IgG1-4 subclass profile, kidney transplantation, single antigen bead assay

INTRODUCTION

In the last few years, single antigen bead (SAB)-assay has revolutionized the allograft allocation algorithm of patients awaiting solid-organ transplantation through a non-invasive virtual cross-matching procedure (1), with the purpose of avoiding the allograft damage caused by antibodies directed against human leukocyte antigens (HLA) undetected by other less sensitive tests such as the complement-dependent cytotoxicity (2, 3). However, the high sensitivity of SAB-assay linked to the premise that the presence of any antibody supposes an unacceptable risk regardless of its properties, has limited the access to transplantation of sensitized patients, excessively prolonging their waiting time (4). Even though the standardization of solid-phase assays has maintained low rates of rejection (5, 6), the impact of anti-HLA antibodies only detected by these tests is still under discussion and indeed, a proportion of transplanted patients with circulating donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) under a negative complement-dependent cytotoxicity result, have acceptable allograft outcomes (7–9).

Technical issues of SAB-assay seem to prevent the discrimination of clinically relevant from harmless anti-HLA antibodies (10). In the absence of additional information regarding functional properties and with the aim of improving the consolidated restrictive algorithm for allograft allocation, the immunological risk of anti-HLA antibodies has been stratified according to their mean fluorescence intensity (MFI) value (11–14), assuming that this is a reliable estimation of the antibody level. Although SAB-assay is not approved as a quantitative method and there is no consensus on the threshold which defines an antibody as harmful, many transplantation centers consider all those donor mismatches for which antibodies show MFI values above 5,000 as unacceptable (15–18).

Several studies have demonstrated a direct correlation between high-MFI levels of DSA and increased incidences of antibody-mediated rejection and premature allograft failure (19–21). However, some methodological aspects may lead to MFI measures far from the real level of alloantibodies (22), suggesting that this is not always an entirely precise method to assess their risk. The prozone effect is the most common phenomenon whereby high-titers of antibodies are detected as low-MFI antibodies (<5,000). This effect, particularly frequent

in highly-sensitized patients, masks potentially dangerous specificities. Similarly, forbidden antibodies considered as harmful due to their MFI value (>5,000) might not be highly concentrated (22).

Beyond the MFI value, the SAB-C1q assay has been proposed as a tool to discriminate the sub-set of antibodies capable of binding C1q and assess their pathogenic potential, considering that the complement cascade is the major pathway of antibody-mediated damage (23). Until now, some authors have reported strong correlations between the presence of pre- and post-transplantation C1q-binding DSA and the risk of allograft failure (24–27), despite the fact that it is not fully ascertained whether this increased risk is due to the high-level of DSA or to their own ability to bind C1q (21, 28). Certainly, there seems to be a direct relationship between the complement-binding ability of anti-HLA antibodies and their strength (22, 27, 29).

The main effector mechanisms through which alloantibodies can induce damage on transplanted allografts include the activation of cells to promote proliferation and inflammation, the development of Fc-receptor-mediated functions and mainly, the activation of the complement system (30, 31). Since the four subclasses of IgG exhibit different structural and functional properties (32), triggering different pathological mechanisms of allograft damage, they must produce different phenotypes of injury. Indeed, Lefaucheur et al. (33) reported that the presence of IgG3 as immunodominant DSA led to acute antibody-mediated rejection with increased microvascular injury and C4d deposition, whereas IgG4-immunodominant DSA led to subclinical antibody-mediated rejection with increased chronic lesions. Additionally, they showed that patients with IgG3-immunodominant DSA had a significantly lower allograft survival rate regarding the presence of other IgG subclasses. More recently, Hamdani et al. (34) in a small cohort of pediatric kidney-transplanted patients showed that IgG3-DSA were independently associated with graft dysfunction. These findings suggest the added value of the IgG subclass detection to predict allograft outcome.

Thus, under all these premises, the present study aimed to investigate the characteristics of circulating anti-HLA antibodies in a cohort of highly-sensitized patients awaiting single-kidney transplantation, including the MFI value (neat and 1:16 diluted-serum), the ability to bind C1q and the IgG1-4 subclass profile in order to improve our understanding of the relationship between the different properties of antibodies.

Abbreviations: DSA, donor-specific anti-HLA antibodies; HLA, human leukocyte antigens; MFI, mean fluorescence intensity; SAB, single antigen bead.

MATERIALS AND METHODS

Serum Samples of the Study Cohort

In this study, analyzed serum samples were obtained from 20 highly-sensitized patients (calculated panel reactive antibody $\geq 75\%$) awaiting single-kidney transplantation at Reina Sofia University Hospital (Cordoba, Spain). The study cohort included 11 (55%) males and 9 (45%) females and the mean age was 47.35 ± 11.5 . At the time of the analysis the mean calculated panel reactive antibody of all patients was 97.15 ± 4.69 by the Organ Procurement and Transplantation Network database. The recorded classical HLA sensitization events were previous transplant in 15 (75%) patients, two of whom had also been poly-transfused, pregnancy in 4 (20%) patients and multiple blood-transfusions in 1 (5%) patient. Among all, 9 (45%) had antibodies against Class I, 4 (20%) against Class II, and 7 (35%) against Class I + II molecules. Serum samples of each patient were tested to detect all circulating anti-HLA antibody-specificities using the standardized SAB-panIgG and a modified SAB-assay to detect their IgG1-4 subclass composition (SAB-subclass assay). The C1q-binding ability was assessed by the SAB-C1q assay. All the analyses were performed using a single batch of reagents. This study was conducted according to the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Reina Sofia University Hospital (ref. 2465). All participants in the study provided written informed consent.

Detection and Characterization of Anti-HLA Antibodies by the Standardized SAB-panIgG Assay: Neat and Diluted Sera

Neat-serum samples were tested to detect the presence of circulating anti-HLA-A, -B, -Cw, -DR, -DQ, and -DP antibodies. The standardized SAB-panIgG assay (LABScreen, One Lambda, Inc.) on a Luminex platform was used to determine anti-HLA antibody-specificities according to the manufacturer instructions. Luminex 100 IS version 2.3 was used as data acquisition software and Fusion 3.3 (One Lambda, Inc.) as analysis software.

Additionally, since Tambur et al. (22) and Zeevi et al. (29) reported that the majority of antibody-specificities reaches the highest MFI value at a 1:16 dilution, we analyzed the 1:16 dilution of all samples by the standardized SAB-panIgG assay to assess their true MFI value and avoid the prozone effect. The dilution of the samples was performed with phosphate buffer saline.

Mean fluorescence intensity (MFI) value $\geq 1,000$ was the threshold set for a reaction to be considered positive. MFI = 5,000 was the cut-off set to classify antibodies into weak (MFI < 5,000) and strong (MFI $\geq 5,000$) antibodies.

Detection and Characterization of Anti-HLA Antibodies by the Standardized SAB-panIgG Assay: Pre-treatment With Heat and EDTA

Serum samples were pre-treated to overcome the possible inhibitory effect caused by several confounding factors other

than the amount of IgG antibodies. For this purpose, neat-serum samples were pre-heated at 56°C for 30 min and then analyzed by the standardized SAB-panIgG assay according to the manufacturer instructions. In addition, neat-serum samples were tested by the standardized SAB-panIgG assay using EDTA pre-treatment as previously described (22, 35).

Characterization of the C1q-Binding Ability of Anti-HLA Antibodies by the Standardized SAB-C1q Assay

The C1q-binding ability of anti-HLA antibodies was assessed using SAB-C1q assay (One Lambda, Inc.) on neat-serum samples according to the manufacturer protocol. All neat-serum samples were heat pre-treated at 56°C for 30 min as is indicated in the protocol of the SAB-C1q assay in order to remove any endogenous C1q. MFI value ≥ 500 was the threshold set for a C1q-reaction to be considered positive.

Subclass Profile by IgG1-4 SAB-Subclass Assay

The SAB-subclass assay was performed as previously reported (36). The standardized SAB-panIgG assay was modified by replacing the phycoerythrin-conjugated goat anti-human pan-IgG by specific monoclonal antibodies against IgG1-4 subclasses (IgG1 clone HP6001, IgG2 clone 31-7-4, IgG3 clone HP6050, IgG4 clone HP6025; Southern Biotech). In brief, 20 μL of neat-serum was mixed with 2.5 μL of HLA-coated beads (LABScreen, One Lambda, Inc.) for 30 min in darkness at room temperature while being shaken. The beads were washed once for 5 min at 1,300g with 150 μL of wash buffer (One Lambda, Inc.). After discarding the supernatant, 100 μL of each appropriately diluted phycoerythrin-labeled anti-IgG1-4 secondary antibody was added as reported by Lefaucheur et al. (33) and incubated for 30 min in darkness at room temperature while being shaken. After one wash, 80 μL of phosphate buffer saline was added to be acquired on the Luminex platform. All beads showing MFI values >500 were considered positive. Additionally, we analyzed the 1:16 dilution of serum samples by the SAB-subclass assay.

Statistical Analysis

Mean and standard deviations were provided for the description of continuous variables, and total number and frequency for the description of non-continuous variables. χ^2 test was used to compare qualitative data, while Student's *T*-test was used to compare parametric quantitative data. Pearson's test was used as the correlation test. Correlation was classified according to the correlation coefficient (*r*) into weak ($r < 0.5$), moderate ($0.5 > r < 0.75$) and strong ($r > 0.75$) correlation. We considered the raw MFI value of anti-HLA antibodies in all detection assays to perform the statistical analyses. All studied sera were included in the analyses. Values of $p < 0.05$ were regarded as statistically significant.

RESULTS

Analysis of panIgG Anti-HLA Antibodies in Neat and 1:16 Diluted Sera

The standardized SAB-panIgG assay performed with neat-serum samples belonging to the 20 HLA-sensitized patients included in this study defined 1,236 (47.6%) panIgG antibody-specificities as positive ($MFI \geq 1,000$) of the 2,594 Luminex-beads analyzed. Among the 1,236 positive antibody-specificities, 727 (58.8%) exhibited strong-MFI values ($MFI \geq 5,000$), and 509 (41.2%) were characterized as weak-MFI antibodies (Figure 1).

Then, the SAB-panIgG assay was performed with the 1:16 diluted-serum samples. The dilution unmasked the presence of 49 antibody-specificities with strong-MFI values originally detected as negative (Figure 1). As a result, a total of 1,285 antibody-specificities (1,236 detected in neat-sera plus 49 revealed after the dilution) were now regarded as positive. Furthermore, as shown in Figure 1, 72 (14.1%) of 509 neat-sera weakly positive antibodies became strong-specificities. Similarly,

the serum dilution cleared the presence of 114 (15.7%) strong-specificities. Therefore, after the dilution, 235 (18.3%) antibody-specificities dramatically changed their status: 121 from negative or weak to strong-specificities and 114 from strong to negative. Details of the 1,285 antibody-specificities detected, 806 (62.7%) directed against Class I and 479 (37.3%) against Class II molecules, are shown in Supplementary Table 1.

Analysis of the C1q-Binding Ability: Effect of the 1:16 Dilution, EDTA, and Heat Pre-treatments

As others before us, we explored the relationship between the C1q-binding ability of antibodies and their strength, measured as the MFI value. Among the 1,285 positive antibodies pre-defined by SAB-panIgG, 473 (36.8%) were C1q-positive. Additionally, 13 antibody-specificities undetectable neither in neat nor in diluted-serum SAB-panIgG assay (Figure 1) were weakly C1q-positive (908.6 ± 253.4). No subclass was identified in any of these 13 specificities, therefore regarded as false positive C1q-reactions

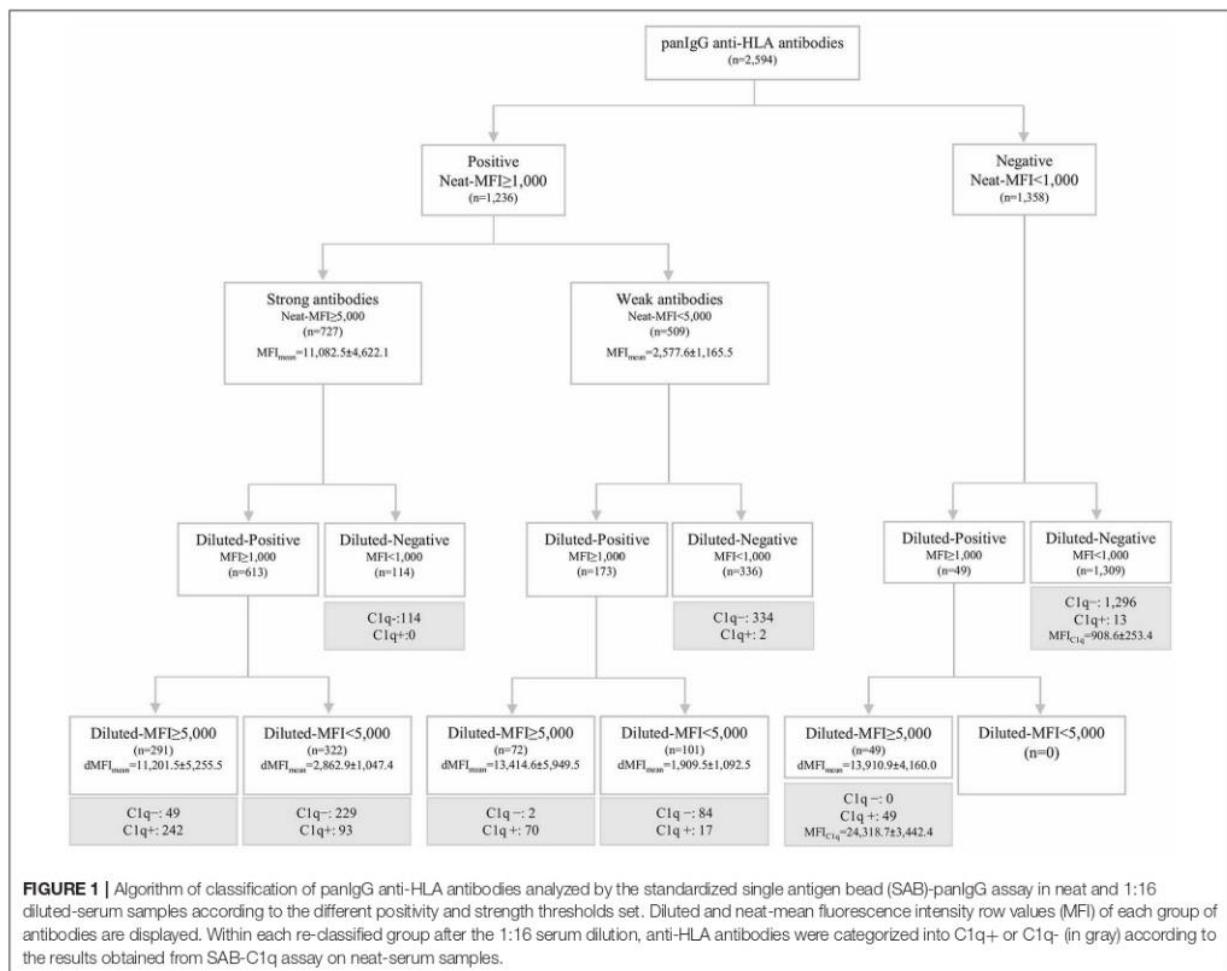


FIGURE 1 | Algorithm of classification of panIgG anti-HLA antibodies analyzed by the standardized single antigen bead (SAB)-panIgG assay in neat and 1:16 diluted-serum samples according to the different positivity and strength thresholds set. Diluted and neat-mean fluorescence intensity row values (MFI) of each group of antibodies are displayed. Within each re-classified group after the 1:16 serum dilution, anti-HLA antibodies were categorized into C1q+ or C1q- (in gray) according to the results obtained from SAB-C1q assay on neat-serum samples.

and not attributed to the presence of isolated IgM given the inactivating heat pre-treatment of the serum required to perform the SAB-C1q assay.

The mean MFI value in neat-serum SAB-panIgG assay of C1q-binding antibodies was significantly higher than that of non-C1q-binding antibodies ($9,204.6 \pm 6,302.3$ vs. $6,193.3 \pm 4,829.1$; $p < 0.001$). However, the correlation per bead between MFI values by SAB-panIgG and SAB-C1q assays was weak ($r_{\text{neat}} = 0.248$), as depicted in **Figure 2A**. Hence, 29.2% (138/473) of antibody-specificities capable of binding C1q exhibited weak neat-serum MFI values, whereas 53.9% (392/727) of strong antibodies were incapable of binding C1q.

As expected, after the dilution, the correlation between the C1q-binding ability and the strength of antibodies (**Figure 2B**) was enhanced ($r_{\text{dil}} = 0.817$). Among the 138 C1q-binding antibodies exhibiting low neat-serum MFI values in the standardized SAB-panIgG assay, 119 (86.2%) significantly increased their MFI value after the dilution ($1,777.1 \pm 1,583.8$ vs. $13,747.3 \pm 5,228.6$; $p < 0.001$). Likewise, the MFI value of the 392 non-C1q-binding strong antibodies significantly decreased ($10,149.1 \pm 4,082.3$ vs. $2,625.6 \pm 2,280.7$; $p < 0.001$).

Figure 2 also depicts the effect of heat (**Figure 2C**) and EDTA (**Figure 2D**) pre-treatments on the correlation between

the MFI value of panIgG anti-HLA antibodies and the ability to bind C1q. Both serum pre-treatments increased the correlation value with respect to that obtained with untreated neat-serum samples ($r_{\text{heat}} = 0.699$ and $r_{\text{EDTA}} = 0.656$, respectively) and seem to be particularly useful to prevent the prozone effect. The correlation per bead between MFI values obtained after heat and EDTA pre-treatments was noticeably high ($r = 0.952$; **Supplementary Figure 1**).

IgG1-4 Anti-HLA Antibodies

The modified SAB-subclass assay was performed to identify the IgG1-4 subclass distribution of the 1,285 antibody-specificities predefined by the standardized SAB-panIgG assay (**Table 1**). Our analyses revealed that 1,012 (78.8%) panIgG anti-HLA antibodies were comprised of at least one IgG1-4 subclass. Of these, IgG1 was by far the most frequent, being present in 95.3% of anti-HLA antibody-specificities, followed by IgG2 (54.7%), IgG3 (13.8%), and IgG4 (13.0%). No subclass was identified in 273 (21.2%) panIgG antibodies considered as positive, which predictably exhibited rather low panIgG MFI values ($2,774.7 \pm 2,457.1$).

Regarding the IgG subclass patterns, 419 (41.4%) panIgG positive antibody-specificities were comprised of isolated IgG1-4 subclasses, whereas the other 593 (58.6%) were comprised of

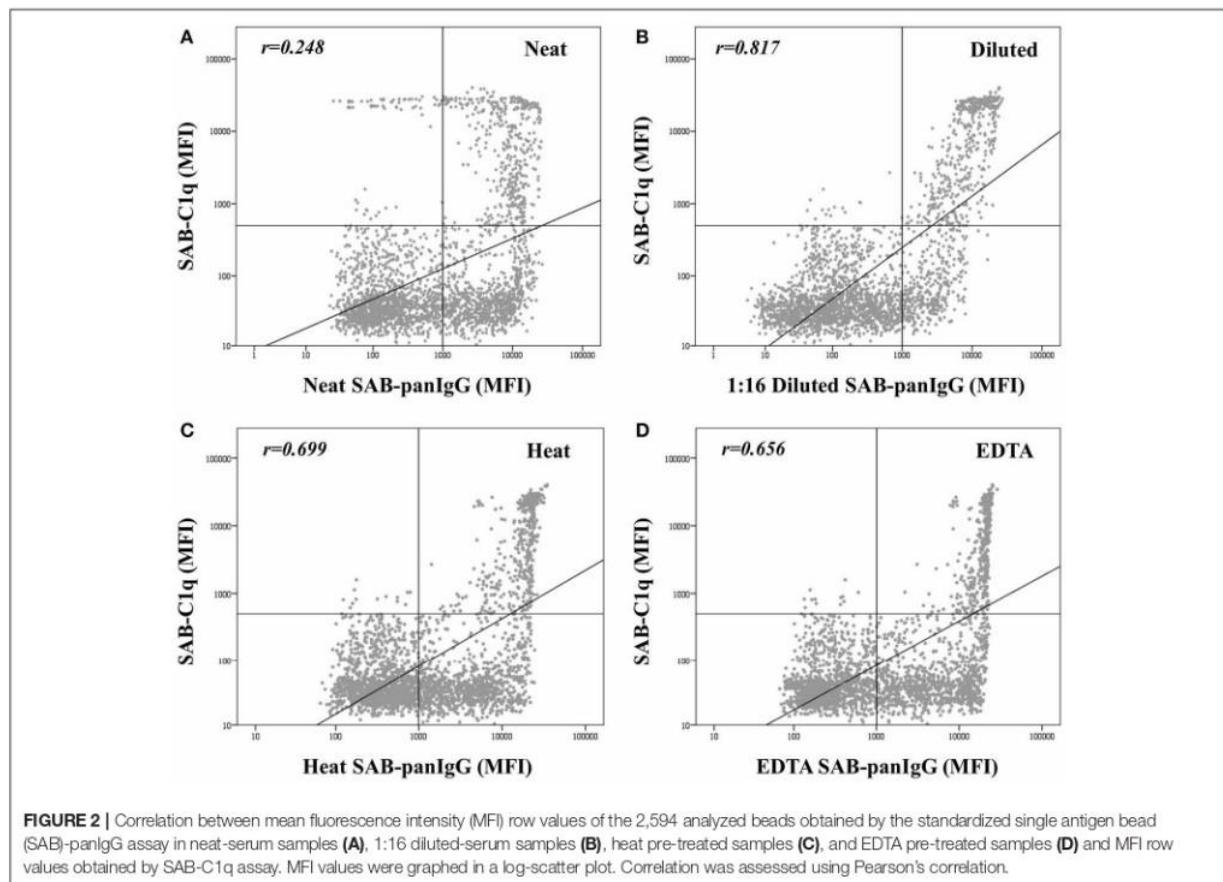


TABLE 1 | IgG1-4 subclasses comprising panIgG anti-HLA antibodies analyzed according to SAB-subclass assay performed on neat-serum samples.

	Positive panIgG anti-HLA antibodies (n = 1,285)
None subclass detected, n (%)	273 (21.2)
Any subclass detected, n (%)^a	1,012 (78.8)
IgG1, n (%)	964 (95.3)
IgG2, n (%)	554 (54.7)
IgG3, n (%)	140 (13.8)
IgG4, n (%)	132 (13.0)
IgG1-4 patterns^a	
Isolated subclass, n (%)	419 (41.4)
Isolated IgG1, n (%)	373 (36.9)
Isolated IgG2, n (%)	5 (0.5)
Isolated IgG3, n (%)	36 (3.6)
Isolated IgG4, n (%)	5 (0.5)
Mixture of subclasses, n (%)	593 (58.6)
IgG1+IgG2, n (%)	376 (37.2)
IgG1+IgG3, n (%)	22 (2.2)
IgG1+IgG4, n (%)	21 (2.1)
IgG2+IgG3, n (%)	1 (0.1)
IgG2+IgG4, n (%)	1 (0.1)
IgG3+IgG4, n (%)	0 (0)
IgG1+IgG2+IgG3, n (%)	67 (6.6)
IgG1+IgG3+IgG4, n (%)	1 (0.1)
IgG2+IgG3+IgG4, n (%)	0 (0)
IgG1+IgG2+IgG4, n (%)	91 (9.0)
IgG1+IgG2+IgG3+IgG4, n (%)	13 (1.3)

^aPercentage of antibodies calculated considering only those with at least one detectable subclass.

a mixture of them. IgG1 + IgG2 was the most common pattern found, which comprised 37.2% of antibody-specificities, followed by isolated IgG1 (36.9%). Specificities comprised of a mixture of the four IgG subclasses (IgG1 + IgG2 + IgG3 + IgG4) or of isolated weak/non-C1q-binding subclasses (IgG2 and/or IgG4) were uncommon (1.3 and 1.1%, respectively). All subclass patterns are also shown in **Table 1**.

IgG Subclass Profile, Strength, and C1q-Reactivity of Anti-HLA Antibodies

Finally, we thoroughly studied the relationship between the pattern of IgG subclasses, the C1q-binding ability and the strength of panIgG anti-HLA antibodies. One of our main findings was that the presence of strong complement-binding subclasses (IgG1 and/or IgG3) was particularly high, comprising 1,001 (98.9%) of 1,012 positive panIgG anti-HLA antibody-specificities with at least one detectable subclass (**Table 2**). However, only 470 of them (46.9%) were capable of binding C1q, evincing that being potentially able to bind complement does not involve that an antibody-specificity was really detected as C1q-positive.

Notwithstanding the significant differences in the proportion of IgG1-4 subclasses according to the C1q-binding ability of

anti-HLA antibodies ($p < 0.001$), the presence of IgG1 and/or IgG3, the most relevant strong complement-binding subclasses, was noticeably high in both groups of antibodies. Indeed, no differences regarding the presence of IgG1 and/or IgG3 between the 473 C1q-binding and the 539 non-C1q-binding antibodies were found (99.4 vs. 98.5%; $p = 0.193$). Unexpectedly, whereas IgG2 and/or IgG4 were present in the 78.9% of C1q-binding antibodies, they were only present in the 38.6% of non-C1q-binding antibodies ($p < 0.001$). The presence of a mixture of IgG1-4 subclasses was more common in C1q-binding than in non-C1q-binding antibody-specificities (79.5 vs. 40.3%; $p < 0.001$). In addition, the 1:16 diluted-MFI value of antibodies comprised of a mixture of IgG1-4 subclasses was significantly higher than that of antibodies comprised of isolated subclasses ($8,394.5 \pm 6,520.4$ vs. $2,527.2 \pm 3,107.2$; $p < 0.001$). Finally, we found 3/473 (0.6%) positive antibody-specificities with the ability to bind C1q only comprised of isolated IgG2, which exhibited high MFI values in the diluted-sera analysis ($22,705.02 \pm 9,257.3$).

Beyond the profile of IgG subclasses, we explored the relationship between the IgG subclass strength, measured as the MFI value, and the C1q-binding ability. Regarding this, **Figure 3** shows the correlation per bead between MFI row values of each IgG1-4 subclass in neat and 1:16 diluted serum-samples and MFI row values of panIgG anti-HLA antibodies in SAB-C1q assay. A strong correlation was found between IgG1 and the C1q-binding ability of antibodies after the dilution ($r_{\text{IgG1dil}} = 0.796$), revealing the close relationship between the presence of strong IgG1 comprising an antibody-specificity and its ability to bind C1q (**Figure 3E**). Conversely, this association was not found with regard to IgG3, probably due to its low prevalence (13.8%). Furthermore, **Figure 3F** shows that the correlation between the strength of IgG2 after the sample dilution and the C1q-binding ability of anti-HLA antibody-specificities was of $r_{\text{IgG2dil}} = 0.758$. This unexpectedly strong correlation could be explained by the fact that IgG2 was mainly found in combination with IgG1 (**Table 2**). Moreover, the correlation between the MFI value of IgG1 and the MFI value of IgG2 in 1:16 diluted-serum samples was strong ($r_{\text{IgG1-IgG2}} = 0.817$; **Figure 4**).

DISCUSSION

In this study, we aimed to elucidate the relationship between the properties of anti-HLA antibodies detected by the different solid-phase assays available and clarify those reactions which have not yet been outlined. Thus far, the data obtained from solid-phase to characterize the pathogenic potential of circulating anti-HLA antibodies has been considered too complex and has led to potential confusion about how to make clinical decisions (3). Furthermore, although the increased sensitivity of detection assays has improved transplantation success, waiting times of sensitized patients have also risen because of the expansion of the number of their unacceptable mismatches (37).

Among the isotypes of immunoglobulins, IgG is considered the main effector of humoral rejection through the activation of the complement pathway (38). Nevertheless, the four IgG

TABLE 2 | IgG subclass profile of C1q-binding and non-C1q-binding anti-HLA antibodies.

	C1q- (n = 539) ^a	C1q+ (n = 473) ^a	p
IgG1-4 subclass profile			<0.001
Isolated IgG subclasses, n (%)	322 (59.7)	97 (20.5)	<0.001
Isolated IgG1, n (%)	283 (52.5)	90 (19.0)	
Isolated IgG2, n (%)	2 (0.4)	3 (0.6)	
Isolated IgG3, n (%)	32 (5.9)	4 (0.8)	
Isolated IgG4, n (%)	5 (0.9)	0	
Mixture of IgG subclasses, n (%)	217 (40.3)	376 (79.5)	<0.001
IgG1+IgG2, n (%)	129 (23.9)	247 (52.2)	
IgG1+IgG3, n (%)	16 (3.0)	6 (1.3)	
IgG1+IgG4, n (%)	16 (3.0)	5 (1.1)	
IgG2+IgG3, n (%)	1 (0.2)	0	
IgG2+IgG4, n (%)	1 (0.2)	0	
IgG3+IgG4, n (%)	0	0	
IgG1+IgG2+IgG3, n (%)	31 (5.8)	36 (7.6)	
IgG1+IgG2+IgG4, n (%)	22 (4.1)	69 (14.6)	
IgG1+IgG3+IgG4, n (%)	1 (0.2)	0	
IgG2+IgG3+IgG4, n (%)	0	0	
IgG1+IgG2+IgG3+IgG4, n (%)	0	13 (2.7)	
Presence of IgG1 and/or IgG3, n (%)	531 (98.5)	470 (99.4)	0.193
Presence of IgG2 and/or IgG4, n (%)	208 (38.6)	373 (78.9)	<0.001

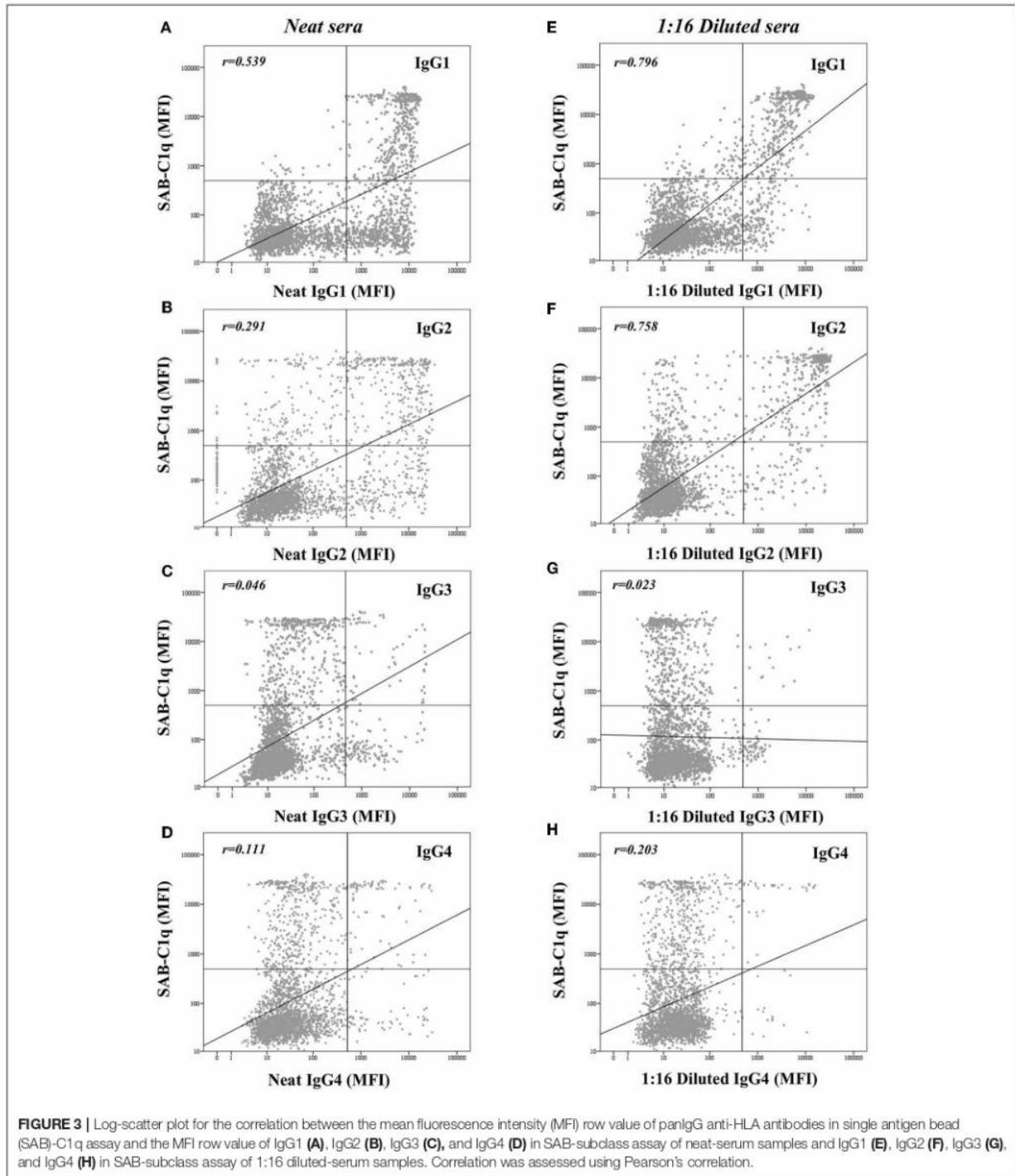
^a Only those antibody-specificities with at least one detectable IgG1-4 subclass were considered. Therefore, 273 non-C1q-binding anti-HLA antibodies with undetectable IgG subclasses were excluded from the analysis.

subclasses exhibit different properties (31, 32, 39). Considering these issues, Chen et al. (40) introduced SAB-C1q as a modified assay to distinguish those hypothetically more dangerous complement-binding subclasses (IgG1/IgG3) from those which a priori suppose an acceptable short-term risk for transplantation (IgG2/IgG4). Several reports have been published to date predicting the risk of allograft failure according to the C1q-binding ability of anti-HLA antibodies before and after transplantation (24–27). However, some authors suggest that determining the complement-binding ability to predict the allograft loss in the clinical practice is unsuccessful (41, 42), and many others question whether the SAB-C1q assay really discriminates among IgG subclasses, given the close relationship observed between the real-strength of antibodies and their ability to bind C1q (21, 22, 28, 29).

Certainly, we found that the relationship between the neat-strength and the C1q-binding ability was weak ($r_{\text{neat}} = 0.248$). Indeed, 29.2% (138/473) of antibodies, usually considered as low-immunological risk because exhibiting MFI values lower than 5,000, were able to bind C1q. Moreover, 10.4% (49/473) were detected as negative. Conversely, 53.9% of antibodies with strong-MFI values (>5,000), which are habitually forbidden in the clinical practice, were not able to bind C1q. The dilution of the serum-samples allowed us to unmask the real-strength of a considerable proportion of antibodies. Hence, 121 antibodies changed their status from low-risk specificities with negative or weak-MFI values to high-risk specificities with strong-MFI values. Additionally, the 1:16 dilution cleared the presence of 114 specificities exhibiting neat-MFI values $\geq 5,000$. Therefore,

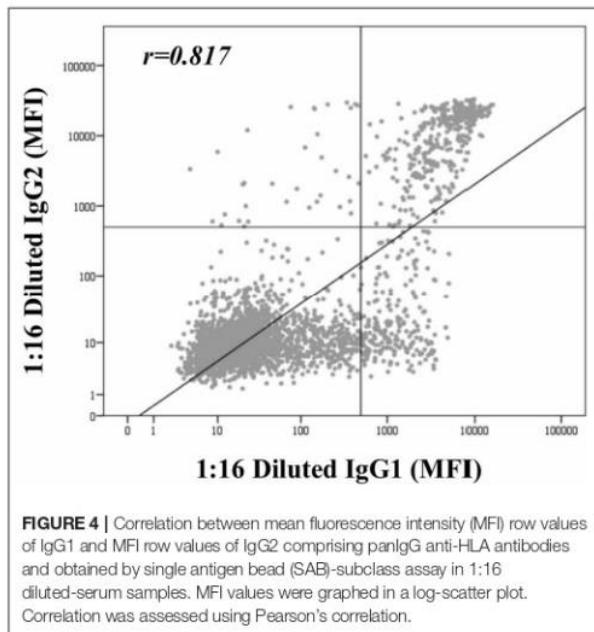
the dilution provided a better assessment of the strength of antibodies, which should be taken into consideration in those pre-transplant studies in which the MFI value is the unique criterion to ascertain the immunological risk and, although the correlation with the C1q-binding status was still not totally perfect ($r_{\text{dil}} = 0.817$), the data support the idea that the ability to bind C1q is tightly linked to the antibody real-strength. As depicted in **Figure 2**, the association between the C1q-binding ability of antibodies and their strength when pre-treating with heat and EDTA, even higher with respect to neat-serum ($r_{\text{heat}} = 0.699$ and $r_{\text{EDTA}} = 0.656$, respectively), was not as strong as with diluted-serum, which could be explained by a lower ability of heat and EDTA to effectively discriminate between different levels of antibodies, beyond the usefulness of both methods preventing the prozone effect.

Regardless of the strength, the IgG subclass composition should determine the potential complement-binding ability of antibodies. Considering the strong complement-binding subclasses (IgG1/IgG3), we identified that these were present in 98.9% of specificities detected, being only 470 of them (46.9%) capable of binding C1q. Indeed, 98.5% of non-C1q-binding antibodies with at least one detectable subclass had IgG1 and/or IgG3 in their profile. Our results were similar to those previously reported by Schaub et al. (28), who found that a negative C1q-reaction did not necessarily mean that the considered antibody was uniquely comprised of subclasses without the ability to activate the complement pathway. Unexpectedly, we found that IgG2 and/or IgG4 more frequently comprised C1q-binding than non-C1q-binding antibodies (78.9 vs. 38.6%; $p <$



0.001). Likewise, the presence of a mixture of IgG1-4 subclasses was more common in C1q-binding antibody-specificities (79.5 vs. 40.3%; $p < 0.001$). Antibodies comprised of a mixture of subclasses could be a sign of the more advanced immune

response, stimulated by a longer and more intense antigen exposure (39). As others before us (28, 33, 36, 43, 44), we found that the presence of isolated IgG2 and/or IgG4 subclasses was particularly low (1.1%). We also confirmed previous studies (33,



36) showing that positive panIgG antibodies without detectable IgG subclasses exhibited low MFI values, which might reflect the different sensitivity of the detection tests used.

Given that all these findings suggest that the complement-binding ability may not be merely explained by differences in the subclass composition, since both C1q-binding and non-C1q-binding antibodies were comprised of similar proportions of complement-binding subclasses (IgG1/IgG3), we decided to explore the strength of them (Figure 3). Our results demonstrate that the strength of IgG1, measured as the MFI value, exhibited the strongest correlation with the C1q-binding ability of panIgG antibodies, particularly after diluting the samples ($r_{\text{IgG1}} = 0.539$ and $r_{\text{IgG1dil}} = 0.796$). Despite the widely proven strong complement-binding ability of IgG3, its presence is unlikely to explain the complement-binding ability of a particular specificity due to its low prevalence (13.8%) and the low MFI value exhibited (Figure 3C). The evolution of IgG subclass switching follows the following sequence: IgG3 → IgG1 → IgG2 → IgG4 (39). We hypothesize that IgG3 is badly detectable because it is the first in order of class-switching and it has the shortest half-life in circulation (31).

It is widely described that triggering complement depends on the antigen density/epitopes and the concentration of antibodies (30). Wang et al. (45) elegantly revealed that the formation of C1q:IgG complexes predominantly assembles at a stoichiometry of 1:6. In the context of Luminex-beads, the C1q-binding must mainly depend on the density of antibodies bound to their target antigens on the bead surface, which in turn depends on their strength (amount, affinity, and avidity). Hence, high titers of strong C1q-binding subclasses, particularly IgG1, alone or combined with other IgG subclasses, mainly IgG2, may compose the hexamer formation to efficiently recruit the C1q

protein. These results are in line with those recently reported by Ponsirenas et al. (46), who, although without revealing the real-strength of IgG subclasses diluting serum-samples, found that C1q-binding was detected in high MFI antibodies comprised of IgG1 or multiple IgG subclasses. Only under certain conditions such as increased concentration of immunoglobulin, even IgG2 could effectively activate the complement (30). The C1q-positivity observed in the three beads comprised uniquely of IgG2 might be due to a considerable high strength of this subclass. However, these are extremely uncommon cases (0.6%). Beyond the antibody load, we found that the correlation of the IgG1 strength with the C1q-binding status was significantly different between HLA-loci ($p < 0.001$). In this regard, the best correlation was obtained for HLA-DQ antigen beads, as depicted in Supplementary Figure 2. These findings reinforce the premise that the C1q-binding ability of anti-HLA antibodies, defined by SAB-C1q assay, must also be affected by a different relative density of HLA antigens coating the bead surface.

The main limitation of our study was that we could not performed serial dilutions analyses to determine the titer of each antibody-specificity. The literature describes that the majority of antibody-specificities reaches the highest MFI value at a 1:16 dilution (22, 29), but some may be even more affected by the prozone effect. Furthermore, we did not study the correlation between the properties of antibodies and the allograft outcome. However, it was not our main purpose but to try to explain those until now incomprehensible reactions. Finally, although the cohort size was low and the number of antibodies analyzed was limited, the data obtained were enough to improve our knowledge about the relationship between the different properties of antibodies.

In conclusion, almost all antibodies are comprised by strongly complement-binding subclasses, mainly IgG1, regardless of their C1q-binding status. In contrast, the presence of IgG2/IgG4, weak and non-C1q-binding subclasses, respectively, is more commonly found in C1q-binding antibodies. The real strength of IgG1, alone or, more usually combined with IgG2, and not the IgG1-4 profile itself, comprising an antibody-specificity is which best correlates with its ability to bind C1q. C1q-binding antibodies exhibiting true low MFI value are not found, suggesting that this is an extremely uncommon event. Thus far, different antibody properties characterized by the available detection assays have been evaluated in an attempt to improve the immunological risk assessment under the presumption that they are unrelated. Herein, we demonstrate a close relationship between the circulating antibody strength, which could be better estimated by the measurement of the MFI value obtained after the serum dilution, the presence of a mixture of IgG subclasses, beyond the quasy omnipresent IgG1, and the C1q-binding ability.

DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the Supplementary Files.

ETHICS STATEMENT

This study was approved by the Ethics Committee of the Reina Sofia University Hospital (ref. 2465). All participants in the study provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AN and RS designed the study. AN and JM conducted the laboratory experiments and wrote the draft. M-LA and AR-B provided and collected the clinical data. AN, JM,

and CA interpreted the results. AN, IG, and AJ performed the statistical analyses. AR-B, CA, and RS reviewed the final version and made significant conceptual contributions to the manuscript. All the authors provided intellectual content, contributed to the article writing, and approved the final version.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01712/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Tait BD. Detection of HLA antibodies in organ transplant recipients—triumphs and challenges of the solid phase bead assay. *Front Immunol.* (2016) 7:570. doi: 10.3389/fimmu.2016.00570
- Haarberg KM, Tambur AR. Detection of donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Br Med Bull.* (2014) 110:23–34. doi: 10.1093/bmb/ldu005
- Schinstock CA, Gandhi MJ, Stegall MD. Interpreting anti-HLA antibody testing data: a practical guide for physicians. *Transplantation.* (2016) 100:1619–28. doi: 10.1097/TP.0000000000001203
- Bostock IC, Alberu J, Arvizu A, Hernandez-Mendez EA, De-Santiago A, Gonzalez-Tableros N, et al. Probability of deceased donor kidney transplantation based on % PRA. *Transpl Immunol.* (2013) 28:154–8. doi: 10.1016/j.trim.2013.05.002
- Amico P, Honger G, Steiger J, Schaub S. Utility of the virtual crossmatch in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* (2009) 14:656–61. doi: 10.1097/MOT.0b013e31823831c169
- Amico P, Hirt-Minkowski P, Honger G, Gurke L, Mihatsch MJ, Steiger J, et al. Risk stratification by the virtual crossmatch: a prospective study in 233 renal transplantations. *Transpl Int.* (2011) 24:560–9. doi: 10.1111/j.1432-2277.2011.01235.x
- Susal C, Ovens J, Mahmoud K, Dohler B, Scherer S, Ruhentrost A, et al. No association of kidney graft loss with human leukocyte antigen antibodies detected exclusively by sensitive luminex single-antigen testing: a collaborative transplant study report. *Transplantation.* (2011) 91:883–7. doi: 10.1097/TP.0b013e3182100f77
- Orandi BJ, Garonzik-Wang JM, Massie AB, Zachary AA, Montgomery JR, Van Arendonk KJ, et al. Quantifying the risk of incompatible kidney transplantation: a multicenter study. *Am J Transplant.* (2014) 14:1573–80. doi: 10.1111/ajt.12786
- Sicard A, Amrouche L, Suberbielle C, Carmagnat M, Candon S, Thervet E, et al. Outcome of kidney transplantations performed with preformed donor-specific antibodies of unknown etiology. *Am J Transplant.* (2014) 14:193–201. doi: 10.1111/ajt.12512
- Gebel HM, Bray RA. HLA antibody detection with solid phase assays: great expectations or expectations too great? *Am J Transplant.* (2014) 14:1964–75. doi: 10.1111/ajt.12807
- Caro-Oleas JL, Gonzalez-Escribano MF, Gonzalez-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chaves V, Gentil-Govantes MA, et al. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* (2012) 27:1231–8. doi: 10.1093/ndt/grf429
- Kannabhiran D, Lee J, Schwartz JE, Friedlander R, Aull M, Muthukumar T, et al. Characteristics of circulating donor human leukocyte antigen-specific immunoglobulin G antibodies predictive of acute antibody-mediated rejection and kidney allograft failure. *Transplantation.* (2015) 99:1156–64. doi: 10.1097/TP.0000000000000511
- Salvade I, Aubert V, Venetz JP, Golshayan D, Saouli AC, Matter M, et al. Clinically-relevant threshold of preformed donor-specific anti-HLA antibodies in kidney transplantation. *Hum Immunol.* (2016) 77:483–9. doi: 10.1016/j.humimm.2016.04.010
- Viglietti D, Lefaucheur C, Glotz D. Evidence for an important role of both complement-binding and noncomplement-binding donor-specific antibodies in renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* (2016) 21:433–40. doi: 10.1097/MOT.0000000000000324
- Marfo K, Ajaimy M, Colovai A, Kayler L, Greenstein S, Lubetzky M, et al. Pretransplant immunologic risk assessment of kidney transplant recipients with donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies. *Transplantation.* (2014) 98:1082–8. doi: 10.1097/TP.0000000000000191
- Susal C, Roelen DL, Fischer G, Campos EF, Gerbase-DeLima M, Honger G, et al. Algorithms for the determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients. *Tissue Antigens.* (2013) 82:83–92. doi: 10.1111/tan.12137
- Susal C, Seidl C, Schonemann C, Heinemann FM, Kauke T, Gombos P, et al. Determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients: recommendations of the German Society for Immunogenetics. *Tissue Antigens.* (2015) 86:317–23. doi: 10.1111/tan.12682
- Zecher D, Bach C, Preiss A, Staudner C, Utpatel K, Evert M, et al. Analysis of luminex-based algorithms to define unacceptable HLA antibodies in CDC-crossmatch negative kidney transplant recipients. *Transplantation.* (2018) 102:969–77. doi: 10.1097/TP.00000000000002129
- Mizutani K, Terasaki P, Hamdani E, Esquenazi V, Rosen A, Miller J, et al. The importance of anti-HLA-specific antibody strength in monitoring kidney transplant patients. *Am J Transplant.* (2007) 7:1027–31. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01721.x
- Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* (2010) 21:1398–406. doi: 10.1681/ASN.2009101065
- Yell M, Muth BL, Kaufman DB, Djamali A, Ellis TM. C1q binding activity of de novo donor-specific HLA antibodies in renal transplant recipients with and without antibody-mediated rejection. *Transplantation.* (2015) 99:1151–5. doi: 10.1097/TP.0000000000000699
- Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KM, Cusick MF, Gordon RA, Leventhal JR, et al. Assessing antibody strength: comparison of MFI, C1q, and titer information. *Am J Transplant.* (2015) 15:2421–30. doi: 10.1111/ajt.13295
- Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nat Rev Nephrol.* (2012) 8:670–8. doi: 10.1038/nrneph.2012.212
- Loupy A, Lefaucheur C, Vemerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med.* (2013) 369:1215–26. doi: 10.1056/NEJMoa1302506
- Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, Savchik C, Masiakos P, Colovai A, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. *Kidney Int.* (2016) 89:209–16. doi: 10.1038/ki.2015.275
- Malheiro J, Tafuro S, Dias L, Martins S, Fonseca I, Beirao I, et al. Determining donor-specific antibody C1q-binding ability improves the prediction of antibody-mediated rejection in human leukocyte antigen-incompatible kidney transplantation. *Transpl Int.* (2017) 30:347–59. doi: 10.1111/tri.12873

27. Molina J, Navas A, Agüera ML, Rodelo-Haad C, Alonso C, Rodríguez-Benot A, et al. Impact of preformed donor-specific anti-human leukocyte antigen antibody C1q-binding ability on kidney allograft outcome. *Front Immunol.* (2017) 8:1310. doi: 10.3389/fimmu.2017.01310
28. Schaub S, Honger G, Koller MT, Liwski R, Amico P. Determinants of C1q binding in the single antigen bead assay. *Transplantation.* (2014) 98:387–93. doi: 10.1097/TP.000000000000203
29. Zeevi A, Lunz J, Feingold B, Shullo M, Bermudez C, Teuteberg J, et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* (2013) 32:98–105. doi: 10.1016/j.healun.2012.09.021
30. Thomas KA, Valenzuela NM, Reed EF. The perfect storm: HLA antibodies, complement, fegammars, and endothelium in transplant rejection. *Trends Mol Med.* (2015) 21:319–29. doi: 10.1016/j.molmed.2015.02.004
31. Hickey MJ, Valenzuela NM, Reed EF. Alloantibody generation and effector function following sensitization to human leukocyte antigen. *Front Immunol.* (2016) 7:30. doi: 10.3389/fimmu.2016.00030
32. Valenzuela NM, Hickey MJ, Reed EF. Antibody subclass repertoire and graft outcome following solid organ transplantation. *Front Immunol.* (2016) 7:433. doi: 10.3389/fimmu.2016.00433
33. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen JP, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG donor-specific anti-human HLA antibody subclasses and kidney allograft antibody-mediated injury. *J Am Soc Nephrol.* (2016) 27:293–304. doi: 10.1681/ASN.2014111120
34. Hamdani G, Goebel JW, Brailey P, Portwood EA, Hooper DK, Girmata AL. IGG3 anti-HLA donor-specific antibodies and graft function in pediatric kidney transplant recipients. *Pediatr Transplant.* (2018) 22:e13219. doi: 10.1111/ptr.13219
35. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads—a technical solution for the prozone effect. *Transplantation.* (2011) 92:510–5. doi: 10.1097/TP.0b013e31822872dd
36. Honger G, Hopfer H, Arnold ML, Spriewald BM, Schaub S, Amico P. Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection. *Transplantation.* (2011) 92:41–7. doi: 10.1097/TP.0b013e31821cdf0d
37. Cecka JM. Calculated PRA (CPRA): the new measure of sensitization for transplant candidates. *Am J Transplant.* (2010) 10:26–9. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02927.x
38. Khovanova N, Daga S, Shaikhina T, Krishnan N, Jones J, Zehnder D, et al. Subclass analysis of donor HLA-specific IgG in antibody-incompatible renal transplantation reveals a significant association of IgG4 with rejection and graft failure. *Transpl Int.* (2015) 28:1405–15. doi: 10.1111/tri.12648
39. Valenzuela NM, Schaub S. The biology of IgG subclasses and their clinical relevance to transplantation. *Transplantation.* (2018) 102:S7–13. doi: 10.1097/TP.0000000000001816
40. Chen G, Sequeira F, Tyan DB. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol.* (2011) 72:849–58. doi: 10.1016/j.humimm.2011.07.001
41. Courant M, Visentin J, Linares G, Dubois V, Lepreux S, Guidicelli G, et al. The disappointing contribution of anti-human leukocyte antigen donor-specific antibodies characteristics for predicting allograft loss. *Nephrol Dial Transplant.* (2018) 33:1853–63. doi: 10.1093/ndt/gfy088
42. Crespo M, Torio A, Mas V, Redondo D, Perez-Saez MJ, Mir M, et al. Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: does C1q-fixation matter? *Transpl Immunol.* (2013) 29:28–33. doi: 10.1016/j.trim.2013.07.002
43. Lowe D, Higgins R, Zehnder D, Briggs DC. Significant IgG subclass heterogeneity in HLA-specific antibodies: implications for pathogenicity, prognosis, and the rejection response. *Hum Immunol.* (2013) 74:666–72. doi: 10.1016/j.humimm.2013.01.008
44. Arnold ML, Ntokou IS, Doxiadis II, Spriewald BM, Boletis JN, Iniotaki AG. Donor-specific HLA antibodies: evaluating the risk for graft loss in renal transplant recipients with isotype switch from complement fixing IgG1/IgG3 to noncomplement fixing IgG2/IgG4 anti-HLA alloantibodies. *Transpl Int.* (2014) 27:253–61. doi: 10.1111/tri.12206
45. Wang G, de Jong RN, van den Bremer ET, Beurskens FJ, Labrijn AF, Ugurlar D, et al. Molecular basis of assembly and activation of complement component C1 in complex with immunoglobulin G1 and antigen. *Mol Cell.* (2016) 63:135–45. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.016
46. Ponsirenas RVG, Cazarote HB, Araujo SA, Wanderley DC, Shimakura S, Valdameri JS, et al. Anti-HLA donor-specific IgG subclasses and C1q-binding evolution in posttransplant monitoring. *Transplant Direct.* (2018) 4:e385. doi: 10.1097/TXD.0000000000000823

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

Copyright © 2019 Navas, Molina, Agüera, Guler, Jurado, Rodríguez-Benot, Alonso and Solana. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

