



Relevancia clínica de los anticuerpos en el trasplante renal

M^a Fuensanta Torrecillas Nicolás

Tesis doctoral

Sevilla, 2017

Memoria presentada por M^a Fuensanta Torrecillas Nicolás para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

El presente trabajo ha sido realizado en el hospital universitario Virgen del Rocío y el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) bajo la supervisión del Doctor Antonio Núñez Roldán y la Doctora M^a Francisca González Escribano.

El proyecto de investigación ha recibido financiación del Proyecto de Excelencia P07-CTS-02886 y del Fondo de Investigaciones Sanitarias (10/02332).



D. ANTONIO NÚÑEZ ROLDÁN, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA, CATEDRÁTICO DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y JEFE DE SERVICIO DE INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCÍO DE SEVILLA

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que lleva por título “Relevancia clínica de los anticuerpos en el trasplante renal” ha sido realizado por la licenciada D.ª Mª Fuensanta Torrecillas Nicolás bajo su dirección y que reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

En Sevilla, a 23 Enero 2017
Fdo: Antonio Núñez Roldán
Director de tesis



D.ª Mª FRANCISCA GONZÁLEZ ESCRIBANO, DOCTORA EN BIOLÓGIA Y FACULTATIVA ESPECIALISTA DE ÁREA EN INMUNOLOGÍA EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DEL ROCÍO DE SEVILLA

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación que lleva por título “Relevancia clínica de los anticuerpos en el trasplante renal” ha sido realizado por la licenciada D.ª Mª Fuensanta Torrecillas Nicolás bajo su dirección y que reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

En Sevilla, a 23 Enero 2017

Fdo: Mª Francisca González Escribano

Directora de tesis

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis la oportunidad que me han dado de poder realizar este trabajo, así como su ayuda y guía durante todo el proyecto. Gracias por confiar en mí.

A todo el personal del Servicio de Inmunología y del IBiS, gracias por vuestra acogida durante estos 5 años. Ha sido una experiencia laboral y vital muy intensa.

A los amigos y compañeros con los que empecé esta andadura que hoy están distribuidos por distintas partes de España y del mundo. Hemos vivido muy buenos momentos que nunca olvidaré, y los que nos quedan por vivir...

A todos a los que he tenido oportunidad de conocer durante este camino, cada uno de vosotros ha puesto su granito de arena.

A los que estaban antes de comenzar esta etapa y estarán después, sois un auténtico pilar en mi vida. Y en especial a ti, por intentar hacerme la vida más fácil en estos últimos tiempos.

Y a mi familia, por su apoyo incondicional en todo momento. Por animarme a conseguir mis objetivos. Sin la educación y valores que tenéis y me habéis aportado, no lo hubiera logrado. No puedo estar más orgullosa de vosotros!!

Gracias!!!!

A mi familia y amigos

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
Mecanismos de daño mediado por Ac	13
Sistema HLA	19
Familia de genes y estructura	19
Técnica de detección de Ac anti-HLA	21
Métodos celulares.....	22
Técnica de microlinfocitotoxicidad	22
Citometría de flujo	24
Métodos no celulares	26
Ac frente a moléculas no HLA	31
MICA	32
Polimorfismo MICA	34
Moléculas relacionadas con el sistema renina	
angiotensina: ATR1 Y ERAP2	38
ATR1	36
Ac frente a ATR1 y trasplante renal.....	41
ERAP2.....	42

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
PACIENTES Y MÉTODOS	51
Sujetos de estudio	51
Características de las cohortes	52
Cohorte 1	52
Cohorte 2	54
Criterios de inclusión	56
Diagnóstico de rechazo	57
Genotipado	57
Obtención del ADN	57
Genes HLA clásicos	58
Gen MICA	59
Gen ERAP2	58
Detección de Ac	61
Ac anti-HLA	61
Escrutinio	61
Escrutinio convencional	61
Escrutinio con anti-C1q	63
Escrutinio con anti-IgG1 e IgG3	64
Cálculo del factor de corrección para la MFI de los ensayos no convencionales	65
Determinación de especificidades	67

Ensayo convencional	68
Ensayo con C1q	69
Ensayo con IgG1 e IgG3	69
Normalización de la MFI de los ensayos no convencionales	69
Interpretación de resultados	70
Ac anti-MICA	70
Escrutinio de Ac anti-MICA	70
Determinación de especificidades MICA.....	72
Ac anti-ATR1	73
Análisis estadístico	74
Plan de trabajo	75
Objetivo 1	75
Objetivo 2	76
Objetivo 3	77
RESULTADOS	81
OBJETIVO 1	81
Ensayo de escrutinio	82
Valor de MFI de la microesfera control positivo	82
Concordancia de los 2 ensayos con los diferentes grupos de microesferas	83
Determinación del número de microesferas positivas	86

Comparación de resultados del ensayo de escrutinio	89
Ensayo de determinación de especificidades.....	90
Valor medio de MFI de la microesfera control positivo	90
Valor medio de MFI de la microesfera más positiva	91
Concordancia de las 5 y 10 microesferas más positivas.....	91
Comparación de resultados del ensayo de SA.....	94
Comparación con técnica de CDC	95
Comparación con XMv	96
Ac fijadores de C y evolución en el trasplante	99
OBJETIVO 2.....	103
Genotipado de MICA	103
Distribución de alelos	103
Variante MICA A5.1	105
Polimorfismo aminoácido 129.....	106
Estudio de Ac anti-MICA	108
OBJETIVO 3.....	115
Ac anti-ATR1	115
Genotipos ERAP2.....	119

DISCUSIÓN	125
PERSPECTIVAS	149
CONCLUSIONES	153
BIBLIOGRAFÍA	157
ANEXOS	179
ANEXO 1: Pruebas previas	181
ANEXO 2: Otras publicaciones del doctorando	191
ANEXO 3: Comunicaciones orales a congresos	195

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1: Isotipos de Ig	14
Figura 2: Vías de activación del C incluyendo moléculas reguladoras	15
Figura 3: Posibles mecanismos de daño crónico mediado por Ac	18
Figura 4: Genes y moléculas HLA.....	20
Figura 5: Fundamento de la técnica de CDC.....	23
Figura 6: Principio de la técnica de detección de Ac mediante citometría de flujo.....	25
Figura 7: Ejemplo de cómo la densidad de antígenos y la concentración de Ac puede influir en el rendimiento de los ensayos de detección de Ac.	28
Figura 8: Técnica de detección de Ac con C1q.....	31
Figura 9: Estructura cristalográfica de MICA.....	33
Figura 10: Implicaciones de la interacción NKG2D-MICA en el trasplante de órganos sólidos	37
Figura 11: Sistema renina-angiotensina-aldosterona.	39
Figura 12: Estructura del ATR1	40

Figura 13: Localización de gen <i>ERAP2</i> y sus dos isoformas: haplotipo A y B	44
Figura 14: Esquema de la técnica SSOP	59
Figura 15: Plan de trabajo para el objetivo 1.	76
Figura 16: Plan de trabajo para el objetivo 2.	77
Figura 17: Plan de trabajo para el objetivo 3	78
Figura 18: MFI de la microesfera control positivo en el ensayo de escrutinio.	82
Figura 19: Índices k de los grupos de microesferas en los ensayos de escrutinio.....	88
Figura 20: Valores de MFI de la microesfera control positivo para el ensayo de SA con cada uno de los 2° Ac	90
Figura 21: Valores más elevados de MFI para el ensayo de SA con cada uno de los 2° Ac.....	91
Figura 22: Índices k de las 5 primeras microesferas positivas en el ensayo de SA	92
Figura 23: Índices k de las 10 primeras microesferas positivas en el ensayo de SA	93
Figura 24: Comparación de técnicas de asignación de especificidades de Ac anti-HLA fijadores de C	96
Figura 25: Porcentaje de sueros con XMv positivo con cada uno de los 2° Ac	97
Figura 26: Esquema y resultados del estudio de Ac anti-MICA	109

Figura 27: Ac anti-ATR1 en sueros pre y post-trasplante	115
Figura 28: Modelo de daño producido por Ac anti-ATR1	146
Figura A1: MFI de la microesfera control positivo en el ensayo de escrutinio	184

TABLAS

Tabla 1: Criterios de Banff para diagnóstico de rechazo en trasplante renal (actualización 2013)	9
Tabla 2: Características de las técnicas de detección de Ac	30
Tabla 3: Alelos MICA y posición 129 de la molécula	36
Tabla 4: Pacientes incluidos en cada objetivo del estudio	52
Tabla 5: Características de la cohorte 1	53
Tabla 6: Características de la cohorte 2.....	55
Tabla 7: Variantes del gen <i>ERAP2</i> incluidas en el estudio	60
Tabla 8: FC para los diferentes grupos de microesferas del escrutinio.....	66
Tabla 9: Punto de corte para los diferentes grupos de microesferas del escrutinio.....	67
Tabla 10: Número medio de grupos de microesferas positivas en los sueros con Ac en el ensayo de	

escrutinio.....	83
Tabla 11: Concordancia de los distintos grupos de microesferas en el ensayo de escrutinio	84
Tabla 12: Número de ensayos de escrutinio positivos con los distintos 2° Ac	89
Tabla 13: Datos utilizados para el cálculo de concordancia en el ensayo de escrutinio entre técnicas de Ac fijadores de C	89
Tabla 14: Comparativa del porcentaje de coincidencia de las 5 y 10 primeras microesferas del SA	94
Tabla 15: Número de sueros positivos en los diferentes ensayos de determinación de especificidades con los distintos 2°Ac	94
Tabla 16: Datos utilizados para el cálculo de concordancia en el ensayo de determinación de especificidades entre técnicas de Ac fijadores de C.....	95
Tabla 17: Datos utilizados para el cálculo de concordancia entre las dos técnicas de detección de Ac anti-HLA DSA fijadores de C	98
Tabla 18: Valores medios de MFI en el ensayo convencional para la microesfera DSA y detección de DSA en cada uno de los ensayos de Ac fijadores de C.....	99
Tabla 19: Evolución del trasplante y Ac anti-HLA DSA de clase I fijadores de C	100

Tabla 20: Evolución del trasplante y Ac anti-HLA DSA de clase II fijadores de C.....	101
Tabla 21: Evolución del trasplante y Ac anti-HLA DSA con diversos 2º Ac	102
Tabla 22: Distribución de alelos MICA en nuestra población	104
Tabla 23: Frecuencias genotípicas de MICA A5.1 y número de incompatibilidades recibidas	105
Tabla 24: Evolución en el trasplante y MICA A5.1	106
Tabla 25: Frecuencia del polimorfismo en el aminoácido 129	107
Tabla 26: Polimorfismo del aminoácido 129 y evolución del trasplante	108
Tabla 27: Genotipado MICA de las parejas donante/receptor y descripción de especificidades.....	111
Tabla 28: Evolución del trasplante y Ac anti-MICA detectados por el escrutinio.....	112
Tabla 29: Análisis multivariante Ac anti-HLA DSA y Ac anti-MICA.....	113
Tabla 30: Evolución del trasplante y Ac anti-MICA detectados por SA	113
Tabla 31: Evolución del trasplante y Ac anti-MICA-DSA	114
Tabla 32: Evolución del trasplante y Ac anti-ATR1 preformados	117

Tabla 33: Ac anti-ATR1 y HLA-DSA preexistentes y evolución del trasplante	117
Tabla 34: Distribución de los alelos y genotipos de <i>ERAP2</i> en receptores y donantes	120
Tabla 35: Frecuencia de haplotipos de <i>ERAP2</i>	121
Tabla 36: Frecuencia de genotipos de <i>ERAP2</i>	121
Tabla 37: Distribución de genotipos de los receptores en relación a Ac anti-ATR1 previos al trasplante	122
Tabla 38: Genotipos de <i>ERAP2</i> y evolución del trasplante.....	123
Tabla A1: Valores de MFI de la microesfera control positivo en el ensayo de escrutinio para diferentes diluciones del 2° Ac	182
Tabla A2: Valores medios de MFI en el ensayo de escrutinio con los distintos 2° Ac	186
Tabla A3: Ensayos de escrutinio con IgG2/IgG4.....	188

ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo/s.

ACV: accidente cerebrovascular.

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AMR: rechazo mediado por anticuerpos.

APC: células presentadoras de antígenos.

ATG: timoglobulina.

ATR1: receptor tipo 1 de la angiotensina II.

C: complemento.

CDC: citotoxicidad dependiente de complemento.

D: donante.

DSA: anticuerpos específicos frente al donante.

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima.

ENDAT: genes de activación y daño endotelial.

ERAP: endoplasmic reticulum aminopeptidase.

FA: frecuencia alélica.

FC: factor de corrección.

Fc: fragmento cristizable.

GSTT1: enzima glutatión S-trasferasa T1.

H: Cadena pesada de inmunoglobulinas.

HLA: Moléculas del sistema principal de histocompatibilidad humano.

Hsp70: proteína de choque térmico 70.

IFN- γ : interferón γ .

Ig: inmunoglobulinas.

IMGT: *International ImMunoGeneTics project*.

K: índice Kappa.

LD: desequilibrio de ligamiento.

M: metionina.

MAC: complejo de ataque a la membrana.

MAF: Frecuencia del alelo minoritario.

MFI: intensidad media de fluorescencia.

MHC: complejo principal de histocompatibilidad.

MICA: *human major histocompatibility complex class I chain-related gene A*.

min: minuto.

MMF: mofetil micofenolato.

n: tamaño muestral.

NDSA: anticuerpos no específicos frente al donante.

NK: natural killer.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PE: ficoeritrina.

Pr: prednisona.

PRA: panel de reactividad de anticuerpos. Porcentaje de donantes de una población frente a los que se predice que el paciente tendría una prueba cruzada positiva según su patrón de anticuerpos anti-HLA.

R: receptor.

RIC: rango intercuartílico.

RT: temperatura ambiente.

s: segundo.

SA: ensayo de antígeno simple.

SD: desviación típica.

SNPs: polimorfismos de cambio de nucleótido.

SSOP: sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia.

SSP: *primers* específicos de secuencia.

Tac: tacrolimus.

TCMR: rechazo mediado por células T.

V: valina.

VHC: virus de la hepatitis C.

XM: prueba cruzada.

XMv: prueba cruzada virtual.

INTRODUCCIÓN

El problema inmunológico más importante en el trasplante es el rechazo, una respuesta que implica el reconocimiento de antígenos presentes en los tejidos del donante por linfocitos y anticuerpos (Ac) del receptor, con el consecuente daño al injerto. Entre las causas que contribuyen a que se desencadene la respuesta inmune que puede conducir al rechazo se encuentran factores presentes tanto en el donante como en el receptor. Así, el factor más importante a considerar en el donante es la expresión de antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, HLA en humanos) en los tejidos y la presencia de células presentadoras de antígenos en el injerto; mientras que el principal factor a tener en cuenta en el receptor es la sensibilización previa frente a antígenos ABO y HLA expresados en el injerto.

El rechazo de órganos sólidos se ha clasificado tradicionalmente según sus características histopatológicas

o el tiempo transcurrido desde el trasplante, más que por los mecanismos inmunitarios efectores; así, se distinguen rechazo hiperagudo, agudo y crónico.

Rechazo hiperagudo: Se produce a los pocos minutos o primeras horas después del trasplante. Se debe a la existencia de Ac preformados frente a los antígenos del sistema ABO (*Pikul FJ y col. 1987*) o HLA específicos del donante que activan el sistema del complemento (C) y desencadenan una trombosis intravascular rápida con necrosis de la pared vascular. Este tipo de rechazo es, hoy día, muy poco frecuente.

Rechazo agudo: Suele iniciarse después de la primera semana del trasplante. Puede tener dos causas distintas, dependiendo de que la respuesta inmunológica se produzca a través de los linfocitos T (rechazo celular, TCMR) o de Ac producidos por linfocitos B (rechazo mediado por Ac, AMR).

Rechazo crónico: Puede darse en cualquier momento de la evolución del trasplante. Actualmente es la principal causa de pérdida del aloinjerto. La etiopatogenia no ha sido aclarada totalmente, se piensa que están implicados mecanismos no inmunológicos como daño por isquemia/reperfusión, hipertensión, hiperlipidemia, edad del donante, etc., junto con mecanismos inmunológicos que pueden ser de tipo humoral o celular.

Con el fin de desarrollar un esquema para la estandarización internacional de la nomenclatura y criterios de diagnóstico histológico de rechazo del aloinjerto renal,

surgen en 1991 los denominados criterios de Banff. A lo largo de los años, estos criterios se han ido modificando, apareciendo entidades previamente no contempladas y desapareciendo otras. La última actualización se realizó en 2013 (Haas M y col. 2014). En la tabla 1 se describen estos criterios.

Tabla 1: Criterios de Banff para diagnóstico de rechazo en trasplante renal (actualización 2013).

<p>1. Normal</p>
<p>2. Cambios mediados por Ac</p> <p><u>AMR agudo/activo, los 3 rasgos deben estar presentes al diagnóstico</u></p> <p>a. <u>Evidencia histológica de daño tisular agudo, incluyendo uno o más de los siguientes:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Inflamación microvascular • Arteritis intimal o transmural • Microangiopatía trombótica aguda, en ausencia de otras causas • Daño tubular agudo en ausencia de otras causas aparentes <p>b. <u>Evidencia de interacción de Ac con el endotelio vascular, incluyendo al menos uno de las siguientes:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Tinción C4d en capilares peritubulares • Al menos moderada inflamación microvascular • Aumento de la transcripción de genes de activación y daño endotelial (ENDATs) u otros marcadores génicos validados de expresión de daño endotelial en tejido de biopsia <p>c. <u>Evidencia serológica de Ac donante específicos (HLA u otros antígenos)</u></p> <p><u>AMR crónico/activo, los 3 rasgos deben estar presentes al diagnóstico</u></p> <p>a. <u>Evidencia histológica de daño tisular crónico, incluyendo uno o más de los siguientes:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Glomerulopatía del trasplante, duplicación de la membrana basal glomerular (ME) o dobles contornos en las paredes de los capilares glomerulares (MO). Si no hay evidencias de microangiopatía trombótica crónica • Severa multilaminación de las membranas basales de capilares peritubulares (ME) • Fibrosis arterial intimal de nuevo inicio excluyendo otras causas

b. Evidencia de interacción de Ac con el endotelio vascular, incluyendo al menos uno de las siguientes:

- Tinción C4d en capilares peritubulares
- Moderada inflamación microvascular
- Aumento de la transcripción de ENDATs u otros marcadores génicos validados de expresión de daño endotelial en tejido de biopsia

c. Evidencia serológica de Ac donante específicos (HLA u otros antígenos)

3. Cambios borderline: “sospechosos” de rechazo agudo mediado por células T

- No hay arteritis intimal pero hay focos de tubulitis con mínima inflamación intersticial, o hay inflamación intersticial leve

4. Rechazo mediado por células T

Rechazo agudo mediado por células T

Tipo/grado:

- IA. Inflamación intersticial >25% y focos de tubulitis moderada
- IB. Inflamación intersticial >25% y focos de tubulitis severa
- IIA. Arteritis intimal leve a moderada
- IIB. Arteritis intimal severa, obstruyendo más del 25% de su luz
- III. Arteritis transmural o necrosis fibrinoide de la pared arterial acompañada de inflamación linfocítica

Rechazo crónico activo mediado por células T

- Arteriopatía crónica del injerto (fibrosis intimal arterial con infiltración de células mononucleares en la fibrosis, formación de neoíntima)

5. Fibrosis intersticial y atrofia tubular, sin evidencia de etiología específica

Puede incluir esclerosis vascular o glomerular inespecíficas, pero la severidad se gradúa de acuerdo con las lesiones crónicas tubulointersticiales. Grado:

- Fibrosis intersticial y atrofia tubular leve (<25% del área cortical)
- Fibrosis intersticial y atrofia tubular moderada (26-50% del área cortical)
- Fibrosis intersticial y atrofia tubular severos (>50% del área cortical)

6. Otros

- Cambios que no se consideran debidos a rechazo agudo y/o crónico. Puede incluir glomerulitis, glomerulopatía crónica del injerto o engrosamiento fibroso intimal arterial aislado

ME: microscopio electrónico; MO: microscopio óptico.

Una vez que se describieron las causas del rechazo hiperagudo y se estableció la manera de evitarlo (ver más adelante), el principal reto a superar en la medicina del trasplante pasó a ser el rechazo celular agudo. Desde los primeros años del trasplante, este tipo de rechazo era extremadamente común y, debido a su complicado tratamiento, era la principal causa de pérdida del injerto (*Starzl TE y col. 1980, Ferguson R 1994*). En la década de los 80, el desarrollo de potentes agentes inmunosupresores disminuyó las tasas de rechazo agudo situándolos en niveles inferiores al 10% en el primer año. Actualmente, el rechazo celular raramente es causa de pérdida del injerto (*Tantravahi JR y col. 2007*). Por ello, la investigación se ha dirigido al estudio del rechazo mediado por Ac.

Existen gran cantidad de evidencias que sustentan que los Ac pueden ser causa directa de pérdida del injerto (*Terasaki PI 2003*). Así, como hemos comentado anteriormente, si un riñón es trasplantado a un paciente con alta tasa de Ac preformados frente a moléculas presentes en ese riñón, el órgano es inmediatamente rechazado (rechazo hiperagudo) y este hecho determinaba que en los inicios del trasplante, la tasa de rechazo aumentara con los sucesivos retrasplantes. Sin embargo, gracias al uso de métodos que permiten detectar la presencia de Ac dirigidos frente a moléculas HLA del donante (HLA-DSA) en el suero del receptor, es decir, a la realización de pruebas cruzadas previas al trasplante, la tasa de supervivencia del injerto de un individuo trasplantado por primera vez o retrasplantado, ha pasado a ser prácticamente idéntica (*Patel R y col. 1969*). Esta mejora se ha producido incluso, a

pesar de que la técnica tradicionalmente utilizada hasta fechas recientes, la citotoxicidad dependiente de C (CDC), no es un método muy sensible. La relevancia clínica de esta técnica es incuestionable, ya que, la presencia de HLA-DSA detectados mediante CDC en sueros pre-trasplante es predictivo de rechazo hiperagudo y disminuye la tasa de supervivencia del injerto (*Terasaki PI y col. 1971*).

El desarrollo de la tecnología y el mejor conocimiento de la biología aloinmune, han permitido incrementar la sensibilidad de las técnicas de detección de Ac. Además, la determinación de especificidades con ensayos muy específicos y sensibles permite, disponiendo del tipaje HLA del donante, la realización de una prueba cruzada virtual (HLA-XMv), que se considera positiva si los Ac detectados son HLA-DSA y negativa en caso de que no se detecten Ac o éstos no sean HLA-DSA. En este sentido, uno de los problemas que más debate ha generado recientemente es el impacto clínico de los Ac detectados con estos métodos mucho más sensibles, especialmente cuando se detectan en tasas bajas. Numerosas publicaciones concluyen que los Ac anti-HLA detectados con estos métodos son clínicamente relevantes y que, no se deben trasplantar pacientes con una HLA-XMv positiva siempre que pueda evitarse (*Gibney EM y col. 2006, Patel AM y col. 2007, Biemann D y col. 2007, Eng HS y col. 2008, Amico P y col. 2009, Rietmüller S y col. 2010, Lefaucheur C y col. 2010, Amico P y col. 2011*).

MECANISMOS DE DAÑO MEDIADO POR Ac

Pese a todo lo expuesto anteriormente, hay ciertas cuestiones que siguen sin resolverse. La evolución clínica de los pacientes con HLA-DSA determinados con métodos más sensibles es diversa, algunos pacientes presentan claros signos clínicos y anatomopatológicos de AMR con deterioro de la función renal y otros mantienen buena función renal sin signos de rechazo a medio y largo plazo.

Entre los factores que determinan esta diversidad en la evolución, podrían encontrarse los problemas de relacionados con la detección de las dianas relevantes clínicamente y los distintos mecanismos de daño mediado por Ac determinados por diferencias en las funciones efectoras de los isotipos de inmunoglobulinas (Ig). En relación con la primera cuestión, Ac frente a moléculas no HLA también pueden influir en la evolución del trasplante. Pero lo cierto es que, aunque la determinación Ac DSA frente a moléculas HLA o no-HLA, se incluyen entre los criterios diagnósticos de AMR de Banff (ver tabla 1), el resto de las dianas moleculares no están bien definidas. En cuanto a la segunda cuestión, recordar que existen 5 isotipos de Ig: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD con diferencias estructurales y funcionales que están relacionadas con su cadena pesada (H) (figura 1). Así, sólo la IgM y dos de los subtipos de IgG, IgG1 e IgG3, son capaces de activar el C, mientras que, la IgG, IgA e IgE son capaces de activar células efectoras con receptores Fc para la correspondiente cadena H.

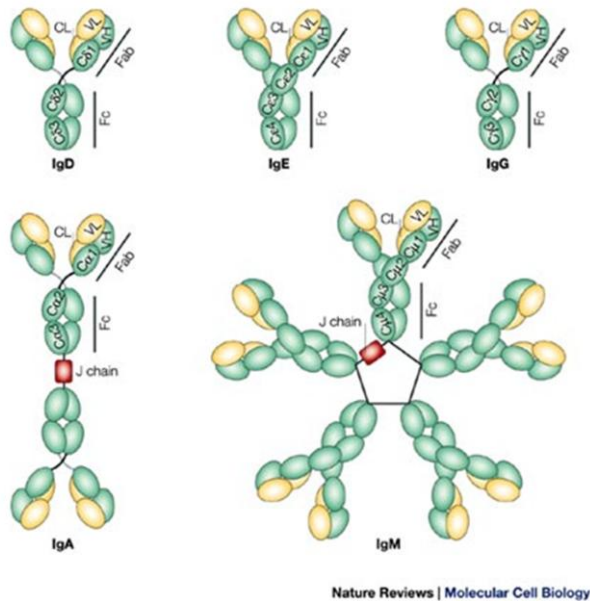


Figura 1: Isotipos de Ig. (Rojas R y col. 2002). Existen 5 tipos distintos de Ig denominadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM que pueden aparecer de forma soluble y como parte del receptor de los linfocitos B. Cada Ig consta de dos cadenas H y dos cadenas ligeras y forman monómeros (IgD, IgE e IgG), dímeros como la IgA o pentámeros como la IgM.

Desde la descripción de Ehrlich a finales de 1890 y la posterior caracterización por Bordet, se ha atribuido un importante papel a la cascada del C en la respuesta inmunitaria. La capacidad de la cadena H de los Ac para unir la fracción C1q es el primer paso para la activación de la vía clásica del C y determina el potencial citotóxico de los Ac. En la figura 2, se muestra un resumen de la vía clásica de activación del C. Hay que señalar que C4b, y en especial su producto de inactivación posterior, C4d, permanece en la superficie de las células endoteliales y puede ser detectado inmunohistoquímicamente, por lo que

se utiliza como un marcador de AMR. La activación del C tiene un gran potencial patológico por lo que está sometida a una estrecha regulación.

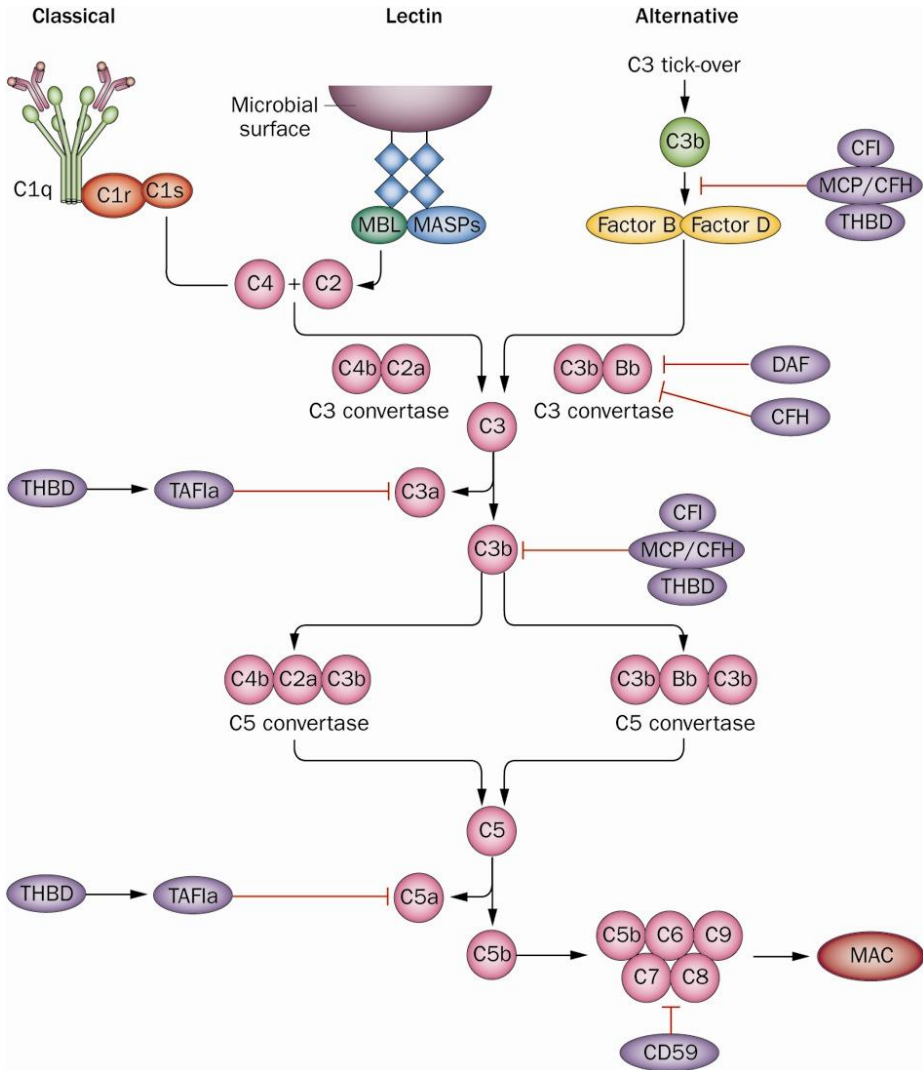


Figura 2: Vías de activación del C incluyendo moléculas reguladoras (Noris M y col. 2012). La unión de la porción Fc a C1q activa C1r que actúa como una serín-proteasa activando a su vez a C1s que una vez

activa, hidroliza C4 generando dos fragmentos, uno pequeño, C4a, que difunde al plasma y otro grande, C4b, capaz de fijarse a la membrana de la célula diana. De igual modo, C1s activa tiene capacidad de escindir la molécula C2 en un fragmento pequeño que difunde al plasma, C2b, y un fragmento más grande que queda unido a C4b, C2a. El complejo C4bC2a activo es conocido como "convertasa de C3", ya que, cataliza la ruptura enzimática de C3, dando lugar a C3a (fragmento pequeño soluble) y C3b que se une a C4bC2a activo formando el complejo "convertasa de C5" que escindiré la molécula C5, siendo el fragmento C5b clave para la formación del "complejo de ataque a la membrana" (MAC) en el que participan las subunidades C6, C7, C8 y C9. El inicio de la formación del MAC es la etapa convergente de las tres vías de activación del C (clásica, alternativa y de las lectinas).

Abreviaturas: CFH, factor H; CFI, factor I; DAF, factor acelerador del decaimiento; MAC, complejo de ataque a la membrana; MASP, serín proteasa asociada a manosa; MBL, lectina de unión a manosa; MCP, proteína cofactor de membrana; TAFIa, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina; THBD, trombomodulina.

En relación con el trasplante, la activación del C puede causar daño al injerto por tres mecanismos diferentes: a) daño directo del endotelio provocado por el MAC (*Lautenschlager I y col. 1999*); b) reclutamiento de células inflamatorias por los fragmentos solubles del C (C3a, C4a y C5a) con capacidad quimiotáctica (*Bos IG y col. 2002*) y c) reconocimiento de fragmentos del C depositados en el endotelio a través de receptores de fagocitos (*Deitch EA y col. 1993*).

Sin embargo, también es posible que tras la unión de los Ac al antígeno, el daño endotelial sea producido por un mecanismo independiente de C como es la citotoxicidad celular dependiente de Ac (ADCC) (*Stiller CR y col. 1976*).

Por tanto, los Ac no fijadores de C también podrían estar involucrados en la evolución del trasplante. De hecho, aunque algunos estudios sugieren que sólo los DSA con isotipos capaces de unir C1q tienen un papel relevante en la patogénesis del AMR (*Lachmann N y col. 2013*) y en la supervivencia del injerto (*Loupy A y col. 2013*), este punto no ha sido totalmente aclarado, especialmente en el AMR crónico (*Stegall MD y col. 2012*). La figura 3 muestra ejemplos de los posibles mecanismos de daño crónico mediado por Ac dependiente o independientemente de su capacidad de fijación de C.

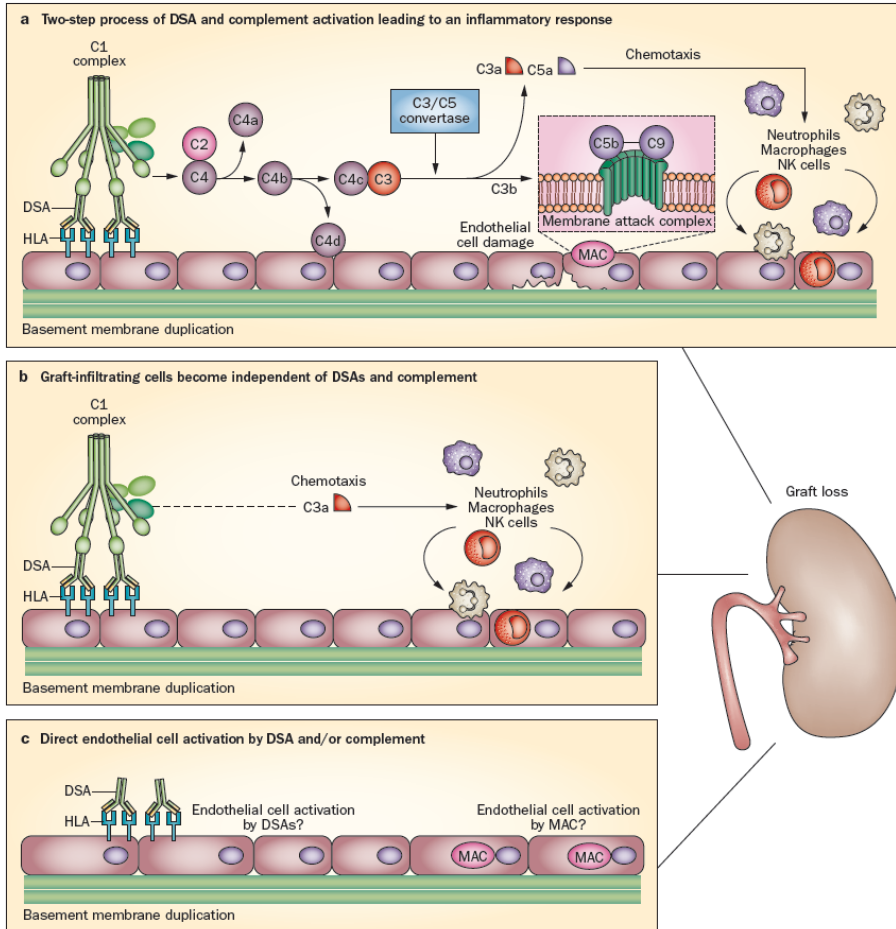


Figura 3: Posibles mecanismos de daño crónico mediado por Ac. (Stegall MD y col. 2012). La figura muestra ejemplos de los posibles mecanismos de daño crónico mediado por Ac en pacientes trasplantados renales en los que están implicados factores dependientes e independientes de la activación del C: a) Depósito de Ac frente a antígenos del donante y activación del C con generación de C3a y C5a que provoca infiltración con células inflamatorias. b) El AMR crónico podría ser inicialmente independiente del C o resultado de una activación intermitente debido a niveles bajos de DSA no detectables por técnicas actuales. c) Los Ac frente a moléculas del

donante pueden causar daño directo a las células endoteliales mediante activación de la cascada del C y formación del MAC.

SISTEMA HLA

Como se ha dicho anteriormente, los Ac más relevantes en la evolución del trasplante son los dirigidos frente a las moléculas del sistema HLA. Las moléculas del MHC humano (sistema HLA) juegan un papel clave en el sistema de defensa del organismo, ya que se encargan de presentar los antígenos a los linfocitos T. Este sistema se descubrió precisamente por su importancia en el rechazo de órganos.

FAMILIA DE GENES Y ESTRUCTURA

Los genes de este sistema se encuentran en una región localizada en el brazo corto del cromosoma 6 que abarca unas 4Mb (figura 4a). Las moléculas HLA se dividen en dos grandes grupos, clase I y clase II que se diferencian en su estructura, distribución celular y función. Según su estructura, las moléculas de clase I constan de una sola cadena α , que se asocia con una cadena de β_2 microglobulina, mientras que las moléculas de clase II están formadas por dos cadenas polipeptídicas, α y β (figura 4b). En cuanto a su distribución celular, las moléculas de clase I se expresan de manera constitutiva en la mayoría de las células del organismo, mientras que las de clase II sólo lo hacen en células presentadoras de antígenos. Por último, respecto a su función, las moléculas de clase I presentan péptidos a las células T CD8 y algunas de ellas controlan la actividad NK a través de la unión a determinados

receptores de estas células, los denominados KIR, mientras que, las moléculas de clase II presentan péptidos a los linfocitos T CD4. Existen diferentes tipos de moléculas HLA clásicas, entendiéndose por tales las que son capaces de presentar péptidos a las células T α/β , son las moléculas A, B y C (clase I); y DR, DQ y DP (clase II). Además, existen las denominadas moléculas HLA no clásicas (como HLA-E, HLA-F, HLA-G, MICA, MICB, etc.) semejantes a las clásicas en cuanto a estructura pero desempeñan funciones diferentes, así, algunas regulan la actividad de las células NK y otras la de los linfocitos T γ/δ .

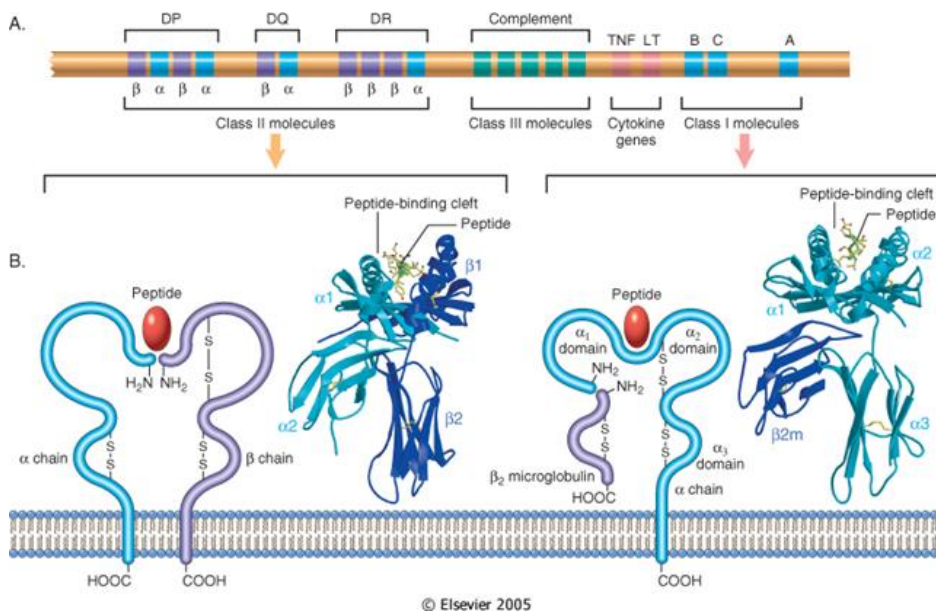


Figura 4: Genes y moléculas HLA. (Bjorkman P 2005). a) Localización de genes HLA. b) Estructura de las moléculas HLA de clase I y clase II. Las moléculas HLA de clase II tienen 2 cadenas polipeptídicas (α y β) con 2 dominios extracelulares cada una de ellas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$). La hendidura de unión al péptido la forman los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ que son los más polimórficos. Las moléculas HLA de clase I tienen una sola cadena

polimórfica que consta de 3 dominios extracelulares, $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son los más polimórficos y forman el bolsillo de unión al péptido. Otras moléculas no clásicas como las MIC tienen estructura similar a la de las moléculas de HLA de clase I pero a diferencia de éstas no se asocian a $\beta 2$ microglobulina.

El sistema HLA se caracteriza por ser poligénico, por la expresión codominante de sus proteínas y por ser el más polimórfico del genoma, de algunos loci se han identificado más de 250 alelos diferentes en la población humana. El gran polimorfismo del sistema condiciona que sea muy complicado encontrar dos personas no emparentadas HLA idénticas. Este elevado grado de polimorfismo determina que, cuando un individuo se pone en contacto con células o tejidos de otra persona (embarazos, transfusiones o trasplantes), puede producir Ac frente a las moléculas HLA extrañas. Estas situaciones son bastante frecuentes en pacientes candidatos a trasplante, sobre todo renal que, por su patología, necesitan a menudo transfundirse y que pueden sufrir varios retrasplantes a lo largo de su vida.

TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE Ac ANTI-HLA

Las técnicas de detección de Ac anti-HLA han ido evolucionando a lo largo de los años, desde técnicas menos sensibles y específicas pero con relevancia clínica bien establecida, a técnicas más sensibles y específicas pero cuya relevancia clínica es más cuestionable. En general, estas técnicas se pueden agrupar en: métodos celulares, que serían aquellos en los que se utilizan células vivas y métodos no celulares, que serían aquellos en los que se utilizan moléculas HLA como diana.

MÉTODOS CELULARES

Existen diferentes métodos de determinación de Ac anti-HLA en los que se utilizan como dianas células vivas. A continuación se resumen los dos que más se han utilizado en los laboratorios asistenciales.

Técnica de microlinfocitotoxicidad

La técnica de CDC consiste básicamente en una reacción antígeno-Ac con fijación de C y visualización con un colorante. Esta técnica se ha utilizado como método de escrutinio de la presencia de Ac anti-HLA en pacientes en lista de espera, para asignación de especificidades y para la realización de XM (XM-CDC) pre-trasplante. La reacción se cuantifica según el porcentaje de células muertas, por lo que la viabilidad celular en la muestra de partida es fundamental (figura 5). Las células diana son generalmente células mononucleares de sangre periférica, o linfocitos T y/o B separados. La célula diana es esencial para la interpretación de resultados, ya que, los linfocitos T expresan sólo clase I de manera constitutiva mientras que los linfocitos B expresan tanto clase I como clase II. Un XM-CDC positivo con células T es contraindicación absoluta para el trasplante; algunos autores defienden que un XM-CDC positiva con células B a títulos altos también debe ser una contraindicación para el trasplante, al menos en algunos casos (*Scornit JC y col. 1992*) mientras que, otros han cuestionado la relevancia de un XM positivo con células B (*Karpinski M y col. 2001, Le Bas-Bernardet S y col. 2003*).

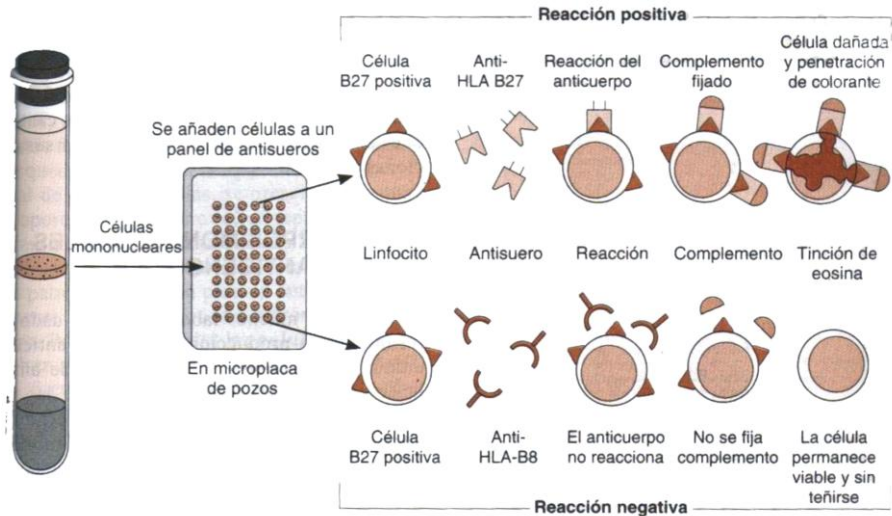


Figura 5: Fundamento de la técnica de CDC. En primer lugar, se incuban en una microplaca varios sueros de pacientes en lista de espera junto con células mononucleares extraídas del donante. Si existen en el suero Ac dirigidos frente a moléculas presentes en la superficie de las células del donante (en este caso Ac contra HLA-B*27), éstos se unirán a su antígeno y posteriormente al añadir C la célula se lisará y permitirá la penetración del colorante (reacción positiva). Por el contrario, si no hay Ac en el suero del paciente contra moléculas del donante, no se producirá reacción antígeno-Ac, ni lisis celular (reacción negativa).

Esta prueba continúa siendo la técnica *gold estándar* en el trasplante renal, ya que es la que predice y evita el rechazo hiperagudo, pero tiene, sin embargo, algunas limitaciones. Posee una especificidad relativamente baja, ya que, la diana de los Ac es en realidad desconocida, cualquier molécula de la superficie de las células podría ser reconocida por los Ac. Por tanto, esta técnica no discrimina entre Ac anti-HLA y no anti-HLA, pudiendo desaconsejarse el trasplante por la presencia, en el suero del paciente, de Ac completamente irrelevantes en la evolución, como es el

caso de algunos auto-Ac. Por otra parte, la sensibilidad de la técnica es también relativamente baja, por lo que, en ocasiones, no se detectaría la presencia de Ac relevantes por encontrarse a concentración inferior al umbral. Y por último, esta técnica solo detecta Ac fijadores de C.

Citometría de flujo

Esta técnica se ha utilizado básicamente en la realización de XM pre-trasplante en determinados grupos de pacientes como los retrasplantados y los inmunizados, para intentar evitar los problemas relacionados con la sensibilidad de la CDC. El método consiste en una reacción antígeno-Ac sobre la superficie celular visualizada mediante la utilización de un segundo Ac marcado con un fluorocromo y el uso de un citómetro de flujo, instrumento capaz de detectar una a una las células presentes en una corriente de líquido iluminada por un haz de láser (figura 6). Las muestras de partida para la obtención de células son las mismas que en el caso de la CDC pero no es necesario separar las poblaciones T y B, ya que el uso de Ac monoclonales marcados con fluorocromos nos permite distinguirlas en el citómetro. Las células deben tener también una buena viabilidad, ya que, de otra manera no son reconocidas por el citómetro como linfocitos.

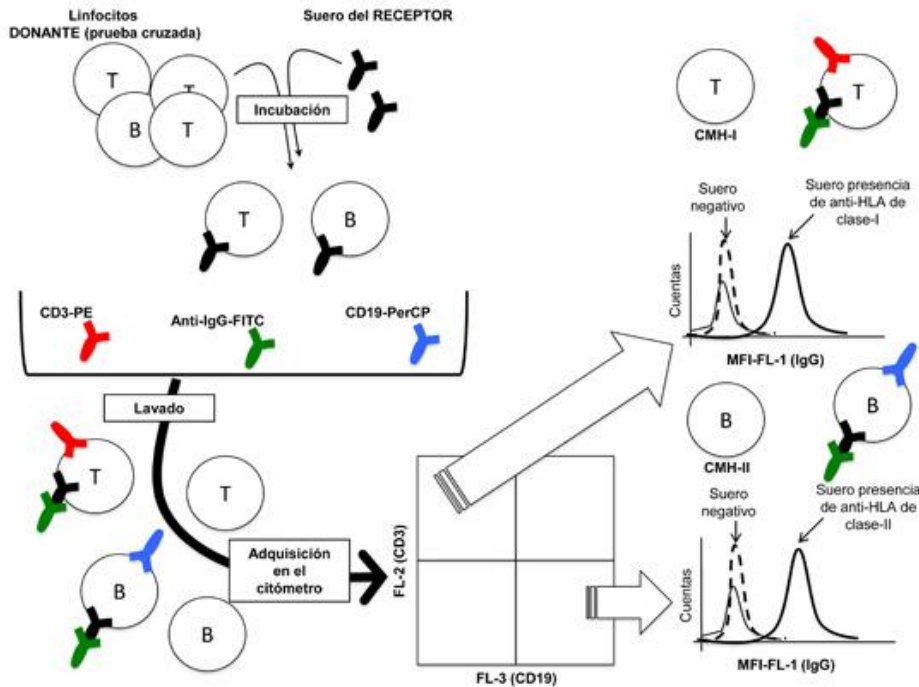


Figura 6: Principio de la técnica de detección de Ac mediante citometría de flujo. Se utilizaría un Ac dirigido frente a una molécula característica de la subpoblación celular (T o B) marcado con un fluorocromo (por ejemplo rojo) para distinguirla y un segundo Ac dirigido contra las Ig humanas (generalmente la IgG) marcado con otro fluorocromo (por ejemplo verde) para detectar presencia de Ac en el suero del paciente (reacciones positivas) de su ausencia (reacciones negativas).

En la técnica de citometría de flujo convencional, el isotipo de los Ac anti-HLA que detectamos depende de la especificidad del segundo Ac y, por tanto, podemos detectar Ac tanto fijadores como no fijadores de C. Fue la generalización del uso de esta técnica, que por otra parte tiene los mismos problemas de especificidad que la CDC, la

que llevo a plantearse si la relevancia de los Ac anti-HLA dependía de su capacidad para fijar C.

MÉTODOS NO CELULARES

El desarrollo de nuevos ensayos en fase sólida como los de tipo *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Kao KJ y col. 1993, Zachary AA y col. 2001) y sobretodo, aquellos que utilizan microesferas múltiples, ensayos tipo Luminex® (Pei R y col. 1998), han contribuido a mejorar la sensibilidad y especificidad cuando se trata de determinar la presencia de Ac anti-HLA en el suero de pacientes candidatos a trasplante y facilitar los estudios post-trasplante que anteriormente eran muy difíciles de realizar.

La tecnología Luminex® se basa en la utilización de microesferas impregnadas de colorante a las que se unen moléculas HLA extraídas de líneas celulares o recombinantes. La reacción se lee en un fluorocitómetro que tiene dos láseres (Luminex® Corporation TX, USA). Un láser rojo que excita el colorante de las microesferas y otro láser verde que excita la ficoeritrina (PE) conjugada con el Ac secundario. De este modo, los detectores reconocen por un lado, la microesfera, y por otro, la fluorescencia emitida si el Ac 2º conjugado con PE, se ha unido a una microesfera concreta. De esta manera el sistema distinguirá las microesferas negativas de las positivas. Las principales ventajas del Luminex® respecto a los otros métodos son que no requiere de células vivas y que los dos fluoróforos en sus distintas combinaciones posibilitan que se puedan generar hasta 100 ventanas distintas en el citómetro, permitiendo analizar en un único pocillo hasta 100 proteínas distintas. De

hecho, esta técnica ha tenido gran aceptación en los laboratorios asistenciales en los que se ha incorporado tanto para el escrutinio como para la determinación de especificidades

En estas técnicas, como en el caso de la citometría de flujo convencional, el isotipo de Ac que se detecta también depende de la especificidad del segundo Ac por lo que podemos detectar Ac tanto fijadores como no fijadores de C. De hecho, los sistemas que se utilizan habitualmente tanto en el escrutinio como en la determinación de especificidades, incluyen como 2º Ac una anti-IgG total que revela la presencia tanto de las subclases fijadoras (IgG1 e IgG3) como de las no fijadoras (IgG2 e IgG4).

Otro aspecto a tener en cuenta en la utilización de estas técnicas, es que pese al gran salto de sensibilidad en la detección de Ac, la interpretación de los resultados es compleja. Características concernientes a la fuente de antígenos tales como si este es purificado o recombinante, intacto o desnaturalizado o la densidad de antígenos que cubre la microesfera, pueden interferir en la detección de Ac, así como en la interpretación de los resultados (figura 7).

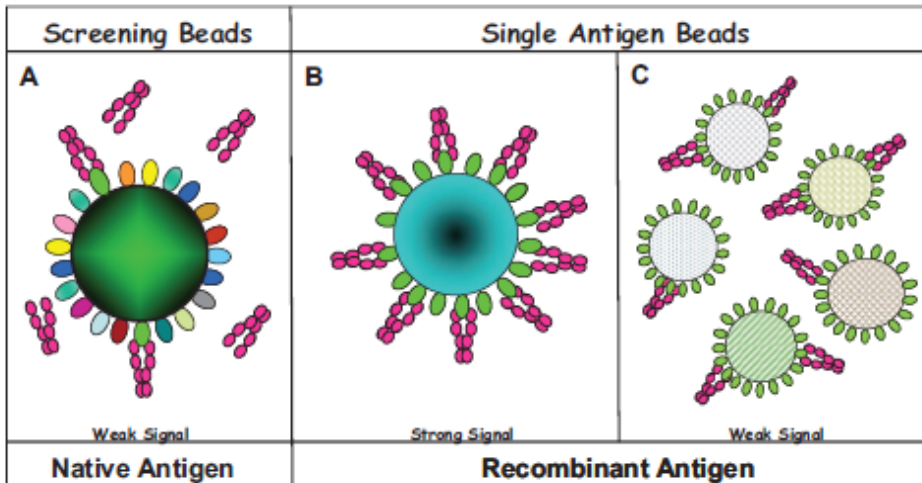


Figura 7: Ejemplo de cómo la densidad de antígenos y la concentración de Ac puede influir en el rendimiento de los ensayos de detección de Ac. (Gebel HM y col. 2014). a) Hay una cantidad suficiente de Ac en el suero, pero existe un bajo número de moléculas del antígeno diana en la superficie de la microesfera, situación que daría lugar a falsos negativos. b) La misma concentración de Ac podría ser detectada si la microesfera tiene mayor densidad en superficie de la molécula HLA diana. c) En este caso, es la concentración de Ac el factor limitante. Esta limitación es importante cuando se realizan ensayos de antígeno simple (ver más adelante) y los Ac reconocen epítomos compartidos por múltiples moléculas HLA. En esta situación se darían también resultados falsos negativos.

Generalmente, estas determinaciones se realizan con dos ensayos. El primero consiste en un cribado con el que determinaríamos la presencia o ausencia de Ac en el suero (positivo/negativo). Posteriormente, determinaríamos la especificidad en los sueros positivos mediante un segundo ensayo. En cuanto a la composición de los antígenos diana puede ser de dos tipos: a) moléculas de HLA de clase I y II purificadas de líneas celulares humanas que se usa

habitualmente en los ensayos de cribado o b) moléculas HLA de clase I o II recombinantes que son empleadas en los ensayos para determinar la especificidad.

Las limitaciones de estas técnicas están relacionadas con las discrepancias en el nivel de intensidad media de fluorescencia (MFI) que se debe establecer como punto de corte para considerar como positivo o “presente” un determinado Ac. Se ha observado una variabilidad del 20-25% en la detección de Ac entre laboratorios, incluso bajo condiciones en las que los reactivos y protocolos eran idénticos (*Reed EF y col. 2013*). Por tanto, se hace necesaria una normalización que soslaye estos problemas, con ese fin se han propuesto tres enfoques, 1) estadístico: establecimiento del nivel de fluorescencia (punto de corte) significativamente por encima del nivel de fluorescencia de fondo; 2) práctico: a través de correlaciones con resultados de pruebas cruzadas y 3) clínico: a través de la identificación de un nivel que pueda predecir una pérdida temprana del injerto (*Gebel HM y col. 2014*).

A modo de resumen, en la siguiente tabla se detallan las principales características de cada técnica.

Tabla 2: Características de las técnicas de detección de Ac.

CARACTERÍSTICA	CDC	CITOMETRÍA DE FLUJO	ELISA	LUMINEX
ESPECIFICIDAD	Baja	Baja	Alta	Alta
SENSIBILIDAD	Baja	Alta	Alta	Muy alta
DETECCIÓN	Fijación de C	Ac 2°	Ac 2°	Ac 2°
ISOTIPO	IgG1, IgG3 e IgM	Ac 2°	Ac 2°	Ac 2°
CÉLULAS VIABLES	Si	Si	No	No
TIPO Ag	Nativo	Nativo	Purificado/ Recombinante	Purificado/ Recombinante

Debido a que las técnicas de citometría de flujo y las que utilizan microesferas múltiples no discriminan entre las subclases de IgG fijadores o no de C, en los últimos años se han desarrollado una serie de modificaciones de la técnica de Luminex®, para detectar Ac anti-HLA fijadores de C. Este ensayo consiste en preincubar los sueros con moléculas C1q o C3d y utilizar como segundo Ac un anti-C1q o anti-C3d marcados con PE (figura 8). De esta manera, se detectarán Ac IgM, IgG1 e IgG3 que serán los únicos que fijen C. Publicaciones recientes utilizan esta técnica para detectar Ac fijadores de C y los asocian a una peor evolución del trasplante (Loupy A y col. 2013, Sicard A y col 2015). Otros investigadores como Tinckam KJ y Heeger PS cuestionan estos hallazgos basándose en limitaciones propias de la

técnica, ya que según estos investigadores esta técnica solo detectaría los Ac fijadores si estos se encuentran en una concentración suficientemente alta (Tinckam KJ y col. 2013).

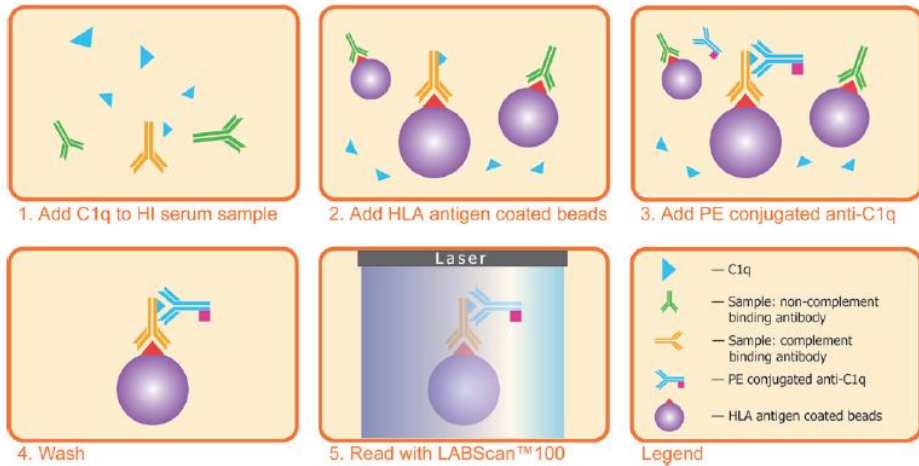


Figura 8: Técnica de detección de Ac con C1q. (One Lambda). Los sueros se preincubaban con C1q y se añaden las microesferas recubiertas de antígenos HLA. Si los Ac presentes en el suero son de isotipos fijadores de C, la molécula C1q se unirá a la cadena H, y si reconocen alguna molécula en la superficie de la microesfera se producirá una reacción antígeno-Ac. Esta reacción se pondrá de manifiesto al unirse al C1q un Ac 2º anti-C1q marcado con un fluorocromo.

Ac FRENTE A MOLÉCULAS NO HLA

Pese a los avances en la detección de Ac anti-HLA y la contribución que estos avances han supuesto en la supervivencia del injerto, siguen dándose casos de AMR agudo incluso en trasplante entre hermanos HLA-idénticos (Opelz G 2005), situación que pone de manifiesto la importancia de la respuesta inmune contra antígenos no

HLA. Entre los Ac no anti-HLA que se han asociado a una peor evolución del trasplante, se encuentran tanto aloantígenos como autoantígenos. Así, se ha descrito cierta influencia de Ac frente a moléculas HLA de clase I no clásicas, concretamente frente a MICA (*human major histocompatibility complex class I chain-related gene A*) (Zou Y y col. 2006), frente a enzimas como la glutatión S-trasferasa T1 (GSTT1) (Aguilera I y col. 2008) y también auto-Ac frente a moléculas localizadas en la superficie de células endoteliales (Praprotnik S y col. 2001), la vimentina (Jurcevic S y col. 2001) y el receptor tipo 1 de la angiotensina II (ATR1) (Dragun D 2008, Zhang Q y col. 2010). Pese a todo, el impacto de estos Ac en la función y supervivencia del injerto sigue siendo bastante controvertido.

MICA

Como se ha dicho anteriormente, existe un grupo de moléculas que están estructuralmente relacionadas con las moléculas de clase I clásicas pero que no presentan péptidos a los linfocitos T α/β , dentro de este grupo se encuentran las moléculas MIC. Estas moléculas están codificadas por una familia de genes que se encuentran localizados a 46.4 kb hacia el centrómero con respecto a HLA-B (*The MHC sequencing consortium 1999*). Debida a esta cercana localización, los genes MIC presentan un fuerte desequilibrio de ligamiento (LD) con el locus HLA-B. La región contiene dos genes funcionales, MICA y MICB, y cinco pseudogenes (MICC a MICG). MICA codifica moléculas de superficie cuya expresión se induce en

condiciones de estrés de forma similar a los genes que codifican la proteína de choque térmico 70 (hsp70) (Groh V y col. 1996). En cuanto a su estructura, es similar a las moléculas MHC de clase I clásicas (figura 9).

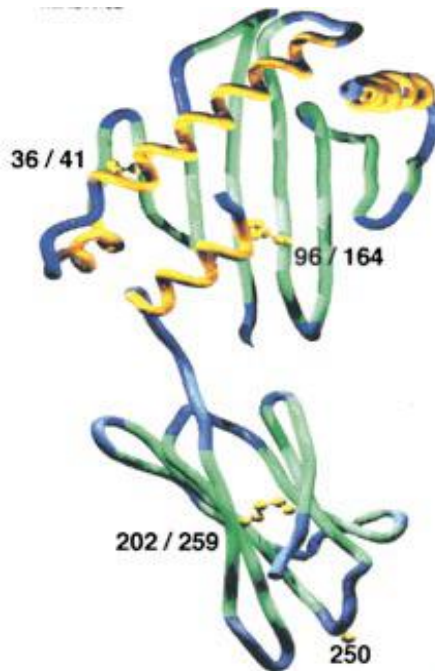


Figura 9: Estructura cristalográfica de MICA. (Li P y col. 1999). El gen MICA, consta de 6 exones separados por 5 intrones siendo el primer intrón el de mayor tamaño (Bahram S 2000). La proteína MICA (11.7 kb) es un polipéptido de 383 aminoácidos y 43 kDa (Bahram S y col. 1994). A diferencia de HLA clase I, la proteína MICA no se asocia con la $\beta 2$ microglobulina. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la proteína forman una plataforma análoga a la plataforma formada por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de las moléculas HLA clase I. Sin embargo, mientras que en la moléculas HLA clase I, esta plataforma constituye la hendidura de unión de péptido, en la molécula MICA, la hendidura tiene muy poca profundidad y es incapaz de unir péptidos.

Las moléculas MICA no tienen una expresión ubicua sino que ésta se encuentra restringida a ciertas células o tejidos tales como queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales o células del epitelio intestinal entre otras (*Stephens HA 2001*), si bien, se han encontrado transcritos de los genes MIC en la mayoría de los órganos salvo en el cerebro (*Schrambach S y col. 2007*). Estas moléculas actúan como marcadores de estrés y su expresión se induce por calor, inflamación, infecciones virales o daño en el ADN y puede ser regulada por $TNF\alpha$ o receptores del sistema inmune como los receptores Toll-like (*Gannage M y col. 2008, Schreiner B y col. 2006*).

Las moléculas MICA son ligandos del receptor NKG2D (*Li P y col. 2001*), una glicoproteína de membrana presente en las células NK y linfocitos citotóxicos tanto α/β como γ/δ . La unión de MICA a su receptor provoca lisis en la célula portadora de la molécula MICA. El receptor NKG2D está relacionado con el sistema inmune innato por lo que se ha atribuido un papel relevante a la interacción MICA-NKG2D en enfermedades autoinmunes, tumores e infecciones. Del mismo modo, la exposición a aloantígenos MICA puede provocar alorespuestas que se asocian con una peor evolución del trasplante, ya que, también presentan cierto grado de polimorfismo.

POLIMORFISMO MICA

El gen MICA es el más polimórfico dentro de los genes que codifican moléculas HLA de clase I no clásicas. Se han identificado 101 alelos diferentes para MICA y 40 para MICB (international ImMunoGeneTics project, IMGT/HLA

database; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>). Los alelos se identifican por el nombre del gen (en este caso MICA) seguido por un asterisco y un número de 3 dígitos que identifica el grupo alélico, siguiendo las normas estandarizadas del IMGT. Las posiciones polimórficas se localizan fundamentalmente entre los exones 2-4 que son los que codifican los 3 dominios extracelulares. Las posiciones polimórficas de MICA son distintas de las descritas en las moléculas HLA de clase I clásicas y la mayoría de estos cambios no son conservadores. Generalmente se trata de sustituciones de un solo aminoácido, que determinan que en una posición concreta encontremos un residuo u otro, salvo en las posiciones 156 y 251 donde se pueden encontrar 3 aminoácidos distintos (*Mason PM y col. 1998*). También se ha descrito otro polimorfismo consistente en un número variable de repeticiones microsatélites del triplete GCT en la región transmembrana de MICA. Concretamente, se han encontrado 7 alelos que se designan como A4-A10 con 4-10 repeticiones y un alelo con 5 repeticiones además de una inserción adicional de G, que se denomina A5.1, esta inserción causa una alteración del marco de lectura que origina un codón prematuro de parada (*Mizuki N y col. 1997*). La forma A5.1 se encuentra solamente en 4 alelos: MICA*008, MICA*023, MICA*028 y MICA*053. Ciertos cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína MICA podrían influir en la afinidad de la interacción con su receptor, NKG2D. Se ha descrito que la presencia de metionina (M) en la posición 129 (129M), confiere fuerte afinidad, mientras que, la presencia de valina 129 (129V) determina afinidad débil por el receptor

(Steinle A y col. 2001). En la tabla 3 se muestran los alelos MICA que codifican 129M y129V.

Tabla 3: Alelos MICA y posición 129 de la molécula.

ALELOS129M		ALELOS129V
MICA*001	MICA*034	MICA*004
MICA*002	MICA*035	MICA*005
MICA*007	MICA*036	MICA*006
MICA*011	MICA*037	MICA*008
MICA*012	MICA*038	MICA*009
MICA*014	MICA*039	MICA*010
MICA*015	MICA*040	MICA*013
MICA*017	MICA*041	MICA*016
MICA*018	MICA*042	MICA*019
MICA*020	MICA*043	MICA*022
MICA*021	MICA*045	MICA*024
MICA*023	MICA*046	MICA*027
MICA*025	MICA*047	MICA*028
MICA*026	MICA*050	MICA*033
MICA*029	MICA*051	MICA*044
MICA*030	MICA*052	MICA*048
MICA*031	MICA*055	MICA*049
MICA*032		MICA*053
		MICA*054
		MICA*056

El conocimiento relativo a los polimorfismos MICA en diferentes poblaciones y grupos étnicos es aún limitado. Sin embargo, hay algunos estudios que muestran ligeras diferencias en las frecuencias de alelos MICA entre grupos étnicos debidas a la microevolución propia de la separación de los grupos raciales, al igual que lo observado para los loci HLA (Chen E y col. 2014).

Actualmente, se piensa que las moléculas MICA pueden estar implicadas en el rechazo de órganos (Sumitran-Holgersson S 2008). Los mecanismos involucrados en esta relación pueden ser: el reconocimiento de MICA en los aloinjertos y la citotoxicidad mediada por NKG2D; el desarrollo de Ac anti-MICA; el aumento de expresión del receptor NKG2D provocada por interleucinas y la activación de las NK en condiciones inflamatorias; la maduración de células dendríticas inducidas por NK y la consiguiente la activación de células T aloreactivas, y la reducción de células T reguladoras mediada por NK que podrían inducir la tolerancia del injerto (Suárez-Álvarez B y col. 2009) (figura 10).

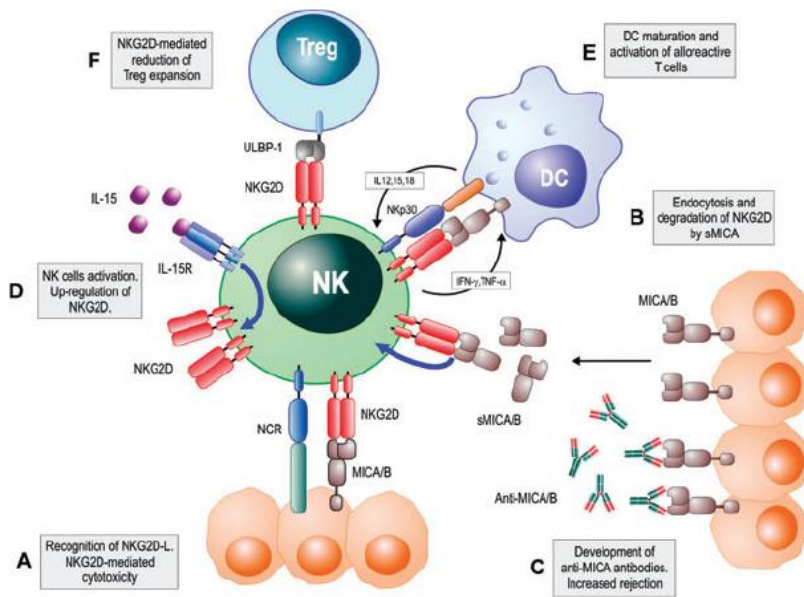


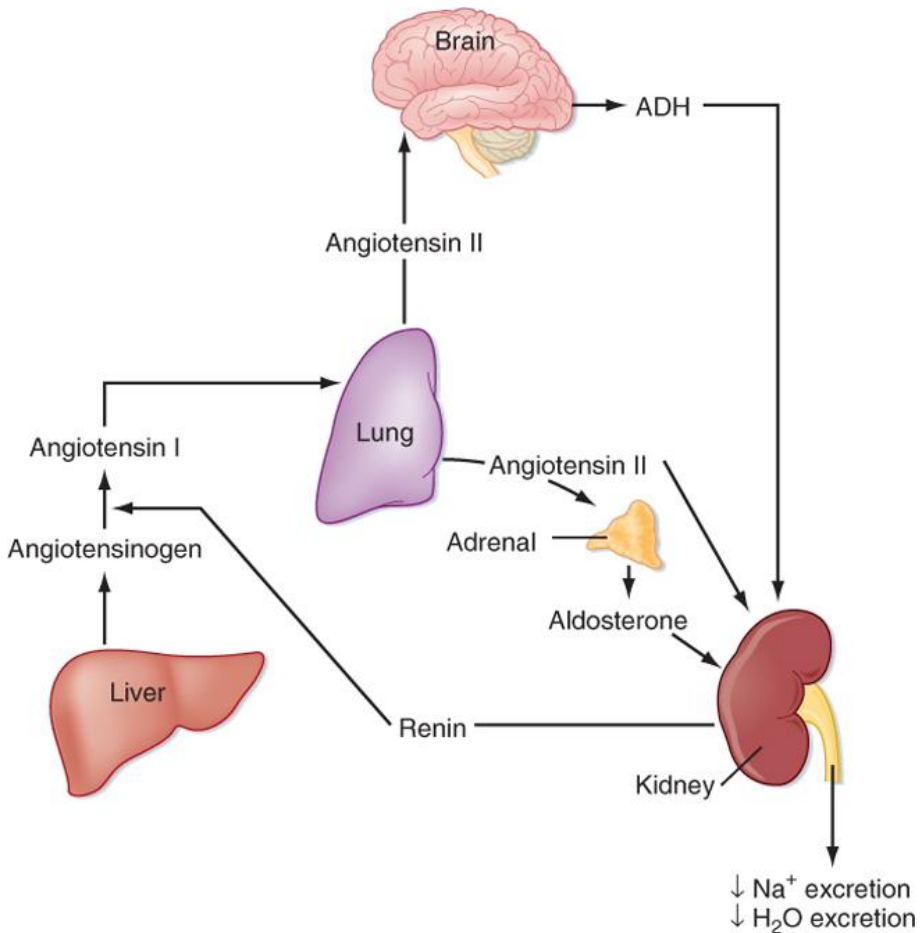
Figura 10: Implicaciones de la interacción NKG2D-MICA en el trasplante de órganos sólidos. (Suárez-Álvarez B y col. 2009). En esta figura se

describen algunos de los posibles factores por los cuales las moléculas MICA estarían implicadas en el rechazo de aloinjertos.

MOLÉCULAS RELACIONADAS CON EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA: ATR1 Y ERAP2

ATR1

El receptor tipo 1 de la angiotensina II (ATR1) media la mayoría de las acciones fisiológicas de su ligando, la angiotensina II, a través de la activación de cascadas de señalización celular. Es un receptor ampliamente distribuido, ya que, se encuentra en hígado, glándulas adrenales, cerebro, pulmón, riñón, corazón y en los vasos sanguíneos. Es el receptor final del sistema renina-angiotensina-aldosterona cuya principal función es el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular y renal (figura 11).



Koepfen & Stanton: Berne and Levy Physiology, 6th Edition.
Copyright © 2008 by Mosby, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved

Figura 11: Sistema renina-angiotensina-aldosterona. (Koeppen & Stanton 2009). La renina es secretada por las células del aparato yuxtaglomerular cuando se detecta un aumento de la osmolaridad del plasma o una caída de presión sanguínea. Esta enzima activa al angiotensinógeno producido por el hígado y da lugar a angiotensina I. La angiotensina I en los pulmones es convertida en angiotensina II por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La angiotensina II es la que ejerce las funciones en distintos órganos diana como en las glándulas adrenales donde estimula la liberación de aldosterona.

La figura 12 muestra la estructura del ATR1 que actúa acoplado a la proteína G por medio de la vía de la fosfolipasa C lo que promueve, entre otras acciones, movilización del calcio del retículo endoplásmico causando contracción vascular. Entre las funciones fisiológicas que media se incluyen la homeostasis de la presión arterial y el balance electrolítico, y en situaciones patológicas la disfunción endotelial, inflamación, migración celular, hipertrofia y crecimiento de células musculares lisas (Mehta PK y col. 2007).

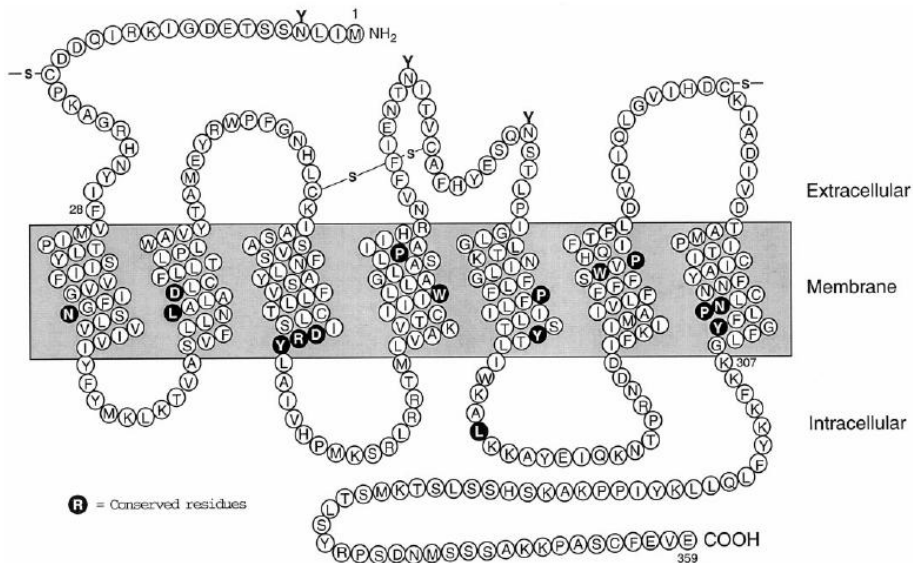


Figura 12: Estructura del ATR1. (Gasparo M y col. 2000). El ATR1 pertenece a la familia tipo A de los receptores acoplados a proteínas G. Presenta una estructura similar a la rodopsina con siete hélices- α transmembrana unidas por tres bucles intracelulares y tres extracelulares, además contiene una región extracelular glicosilada unida a las hélices- α .

El gen que codifica este receptor está situado en el cromosoma 3 y contiene 4 exones, por procesamiento alternativo de los exones 1, 2 y 3 respecto al 4 se originan 4 transcritos primarios distintos, con marcadas diferencias en la tasa de traducción, situación que podría estar implicada en la expresión del receptor (*Elton TS y col. 2003*). Se han descrito al menos 14 polimorfismos en este gen algunos de ellos implicados en la activación del receptor (*Arsenault y col. 2010*). El más estudiado es el A1166C que se asocia a un aumento en la respuesta a angiotensina II en patologías cardiovasculares y renales.

Ac FRENTE A ATR1 Y TRASPLANTE RENAL

Los Ac frente el ATR1, fueron descritos en el año 2005 en 16 pacientes trasplantados renales con rechazo vascular e hipertensión maligna que no presentaban Ac anti-HLA (*Dragun D y col. 2005*). Estos Ac ya se habían asociado a preeclampsia e hipertensión maligna (*Fu ML y col. 2000, Wallukat G y col. 1999*). La presencia de Ac anti-ATR1 en pacientes trasplantados puede ser consecuencia de un aumento en la expresión de ATR1 en el riñón dañado por alorrespuestas (*Reinsmoen NL y col. 2010*). No se conoce porqué estos Ac se relacionan con una peor evolución del trasplante, sin embargo, los Ac se unen al segundo loop extracelular del ATR1 mimetizando los efectos de su propio ligando (la angiotensina II) lo que origina una hiperactivación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (*Dragun D y col. 2005*). La alteración del eje renina-angiotensina-aldosterona da lugar a varios efectos patológicos que incluyen la hipertensión, preeclampsia, fallo

cardíaco, enfermedad renal, arteriosclerosis y desarrollo de cáncer.

ERAP2

Variantes de la enzima *endoplasmic reticulum aminopeptidase* (ERAP2), parálogo de ERAP1, así como de sus niveles de expresión, se han asociado a preeclampsia y otras complicaciones hipertensivas del embarazo con componentes inmunológicos e inflamatorios (Johnson MP y col. 2009). Esta enzima, al igual que ERAP1, está implicada en el procesamiento intracelular de péptidos, ya que, su papel principal es el recorte de péptidos que van a ser cargados a las moléculas de clase I en el retículo endoplásmico. Las moléculas ERAP1 y 2 tienen distinta especificidad y pueden actuar de forma complementaria, ya que se ha observado que la acción de ambas enzimas es necesaria para recortar los péptidos y que puedan ser cargados eficazmente en las moléculas HLA. De hecho, pueden formar heterodímeros que mejoran la eficacia en la generación de péptidos de tamaño adecuado (Saveanu L y col. 2005, Evnouchidou I y col. 2014). Además, ERAP1 y ERAP2 contribuyen a otros procesos biológicos (Andrés AM y col. 2010), así, pueden regular la angiogénesis y la presión sanguínea a través de la degradación de angiotensina II y angiotensina III (Watanabe Y y col. 2003, Yamamoto y col. 2002). Ambos genes están regulados por interferón γ (IFN- γ) y están implicados en la activación de la respuesta inmune y la inflamación.

ERAP2 está menos estudiado que ERAP1, ya que fue descubierto posteriormente y, además, no existe análogo

en roedores, por lo que no se dispone de un modelo animal. El gen *ERAP2* está situado en la región 5q15, entre *ERAP1* y *LNPEP* (*leucil-cistinil aminopeptidasa*) y tiene 19 exones. Se han descrito diferentes polimorfismos en el gen *ERAP2* que dan lugar a dos variantes haplotípicas que, según se ha sugerido por datos en 6 poblaciones humanas, se mantendrían por selección equilibrada. Las dos variantes genéticas dan lugar a ARNm diferentes a causa de la presencia de un polimorfismo de cambio de nucleótido (SNP), rs2248354A/G, que determina un splicing alternativo en el exón 10 que origina un codón prematuro de parada, de manera que, teóricamente, la variante daría lugar a una proteína truncada de 534 aminoácidos en lugar de la proteína completa que consta de 960 aminoácidos (figura 13). En realidad, la variante no genera proteína porque el ARNm se degrada por el proceso denominado *nonsense-mediated decay* que elimina los ARNm aberrantes. Como consecuencia, los niveles enzimáticos serían nulos en los homocigotos para esta variante, y más bajos en los heterocigotos que en los homocigotos para el otro alelo. Previsiblemente, y según datos experimentales, la expresión de complejos de membrana moléculas HLA de clase I-péptidos se vería afectada por este polimorfismo (Andrés AM y col. 2010). Por tanto, el polimorfismo de *ERAP2* podría condicionar la evolución del trasplante por dos mecanismos: determinando una mayor o menor expresión de moléculas HLA de clase I en el injerto y por su relación con el eje renina-angiotensina.

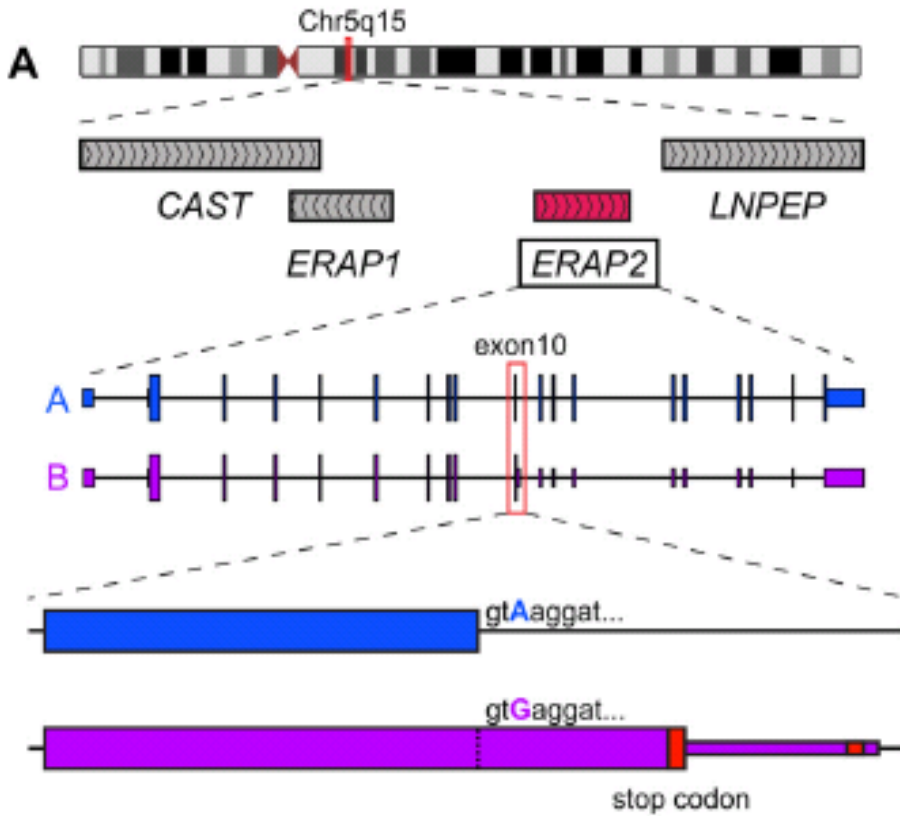


Figura 13: Localización de gen ERAP2 y sus dos isoformas: haplotipo A y B (Andrés AM y col. 2010). Este último codifica un ARNm aberrante que no llega a traducirse.

HIPÓTESIS

Los Ac dirigidos contra las moléculas HLA juegan un papel crucial en el rechazo y pérdida de los órganos trasplantados. Sin embargo, hay pacientes trasplantados sin Ac anti-HLA que presentan signos clínicos y anatomopatológicos de AMR con deterioro de la función renal, mientras que algunos pacientes con Ac anti-HLA DSA mantienen buena función renal y no muestran ningún signo de rechazo. Planteamos como hipótesis de trabajo que, determinados factores como el isotipo de los Ac anti-HLA, la presencia de alo-Ac dirigidos frente a las moléculas MICA o de auto-Ac como los dirigidos frente al receptor tipo 1 de la angiotensina II pueden influir en la evolución del trasplante.

OBJETIVOS

1. Comparar métodos de detección de Ac anti-HLA fijadores de C para determinar su relevancia clínica en la evolución del trasplante renal.
2. Investigar si el polimorfismo de moléculas de histocompatibilidad no clásicas, MICA y/o la presencia de Ac frente a éstas condiciona la evolución del trasplante renal.
3. Investigar si moléculas relacionadas con el sistema renina angiotensina condicionan la evolución del trasplante renal.

PACIENTES Y MÉTODOS

Parte susceptible de publicación.

RESULTADOS

Parte susceptible a publicación.

DISCUSIÓN

La relevancia de los HLA-DSA en el trasplante renal se conoce desde que Patel y Terasaki demostraron que un CDC-XM positivo causaba rechazo hiperagudo en la mayoría de los casos, y esta determinación se incluyó como prueba previa a trasplante renal para evitar este problema (Patel R y col. 1969, Terasaki PI y col. 1971). Mucho más reciente es la introducción de otro tipo de determinaciones para demostrar la presencia de HLA-DSA en el suero de pacientes candidatos a trasplante. Estas determinaciones, basadas en técnicas no celulares, son más sensibles y específicas, sin embargo, su relevancia clínica es más cuestionable. Los pacientes con CDC-XM negativo que presentan HLA-DSA detectados con estas técnicas sufren, en general, más episodios de rechazo y tienen peor supervivencia del injerto, pero estos problemas no son generales, y determinadas cuestiones no han sido solucionadas hasta el momento.

Una de estas cuestiones está relacionada con la propiedad de fijar C que presentan la IgM, la IgG1 y la IgG3. Los ensayos no celulares que se utilizan de manera habitual para la detección de Ac anti-HLA utilizan como 2º Ac una anti-IgG y, por tanto, detectan todas las subclases de IgG, mientras que con la CDC se detectan IgM, IgG1 e IgG3. Actualmente existen ensayos en el mercado que permiten la detección de Ac anti-HLA fijadores de C mediante la determinación de especificidades con moléculas HLA recombinantes preincubando los sueros con moléculas de la cascada del C, como C1q y C3d (*Chen G y col. 2011, Almahri A y col. 2012*). La activación de la cascada del C por la vía clásica requiere tres niveles secuenciales: 1) estabilización del complejo antígeno-Ac; 2) cambio conformacional en el Ac que permite la exposición del sitio de unión de la molécula C1q y formación de un complejo entre el Ac y la molécula de C1q; y 3) cambio conformacional del C1q unido al complejo antígeno-Ac que activa C1qr, que a su vez activa a C4 y C2, y al resto de componentes de la cascada del C, lo que conduce finalmente a la lisis celular. Podemos encontrar varios patrones de reactividad en función de los resultados de las diferentes técnicas de detección de Ac anti-HLA. Así, encontraríamos sueros que resultan positivos en el ensayo convencional con Luminex® IgG pero negativos en las determinaciones Luminex® C1q y CDC. En los sueros que presentan este patrón, que podría corresponder con los que presentan Ac no fijadores de C, la unión del Ac a su antígeno se limitaría a la formación de un complejo inmune estable, sin unión a C1q. Un segundo patrón se correspondería con muestras positivas tanto en el ensayo

convencional con Luminex® IgG como en el ensayo de C1q que, sin embargo, resultan negativas con CDC, por tanto, un ensayo positivo con C1q no siempre predice un positivo con CDC. Estas muestras podrían corresponderse con sueros que presenten bajas concentraciones de Ac fijadores de C, en los que la unión de C1q es insuficiente para la activación total de la cascada completa que conduce a la lisis celular. Por último, tendríamos los sueros con patrón positivo para las 3 técnicas, que puede corresponder con muestras con concentraciones altas de Ac fijadores de C, que producirían activación total de la cascada del C (Duquesnoy RJ y col.2013).

En general, en la práctica diaria, la interpretación de los resultados conjuntos de estas técnicas presenta ciertos problemas. De hecho, aunque se ha publicado una abundante producción bibliográfica analizando la influencia de los Ac anti-HLA fijadores de C frente a moléculas HLA recombinantes detectados con anti-C1q o anti-C3d en la evolución del trasplante (Loupy A y col. 2013, Sicard A y col 2015), esta metodología presenta, desde nuestro punto de vista, diversos problemas. El primero deriva del hecho de la nula disponibilidad de ensayos estandarizados que permitan la detección de Ac no fijadores, de manera que, en muchos trabajos, se asume que, como hemos citado anteriormente, un patrón positivo en un ensayo de IgG y negativo en un ensayo de fijadores, corresponderá con Ac no fijadores, sin embargo esto no es necesariamente cierto. De hecho, de las relaciones moleculares entre las Ig fijadoras y las moléculas de la cascada del C, cabría esperar que los ensayos de C1q y

C3d, fueran menos sensibles que los ensayos de IgG y así se ha puesto de manifiesto muy recientemente (*Lobo PI y col. 2014, Tinckam KJ y col. 2013, Yell M y col. 2015, Loupy A y col. 2015, Sicard A y col. 2015*). Otros problemas derivan de la propia técnica ya que las proteínas presentes en el plasma pueden interferir y enmascarar esta detección (*Gloor JM y col. 2010, Weinstock C y col. 2013*).

En el presente trabajo intentamos desarrollar un método de detección de subclases de IgG fijadoras, IgG1+IgG3, y no fijadoras, IgG2+IgG4. Este objetivo presentaba una serie de limitaciones de las que éramos conscientes. En primer lugar, la microesfera control positivo, que se utiliza en los ensayos convencionales, tanto escrutinio como en el estudio de especificidades, para verificar la adición del 2^a Ac, está recubierta por las diferentes subclases de IgG en las proporciones en las que estas se encuentran en el suero. Por tanto, cabía esperar que el valor de MFI obtenido al revelar con determinadas subclases de IgG fuera inferior al obtenido al revelar con IgG total. Esta limitación nos generaría una cierta incertidumbre en el control del ensayo, ya que el valor de MFI de esta microesfera dependería de la concentración de cada subclase de IgG y podría ser mayor en el caso del ensayo de IgG1+IG3 que en el caso de IgG2+IgG4. De hecho, los valores de MFI obtenidos en los diferentes ensayos con esta microesfera corroboran esta suposición, correspondiendo los valores más elevados con IgG1 (37.0%) y los más bajos con IgG3 (2.5%), siendo el porcentaje de IgG2 el esperado (13.0%) y el de IgG4 más elevado del previsible (13.5%). En este sentido resaltar, que con el ensayo

de C1q comercial, se obtuvieron valores de MFI para esta microesfera control similares a los obtenidos al detectar IgG1 e IgG3 conjuntamente y que correspondían aproximadamente con el 40% del valor del ensayo convencional, circunstancia también previsible si se tienen en cuenta tanto la coexistencia de isotipos fijadores y no fijadores como las relaciones moleculares entre los Ac fijadores y el C1q. La suma del valor de MFI de esta microesfera en los ensayos con las diferentes subclases de IgG es ligeramente inferior a la MFI del ensayo convencional. Por otro lado, el hecho de que la suma de los valores de MFI obtenida en los ensayos de las distintas subclases de IgG sea inferior a la obtenida en el ensayo de IgG, sugiere una menor sensibilidad de la técnica de detección con los diferentes subtipos de IgG con respecto al ensayo convencional. Esta menor sensibilidad puede estar relacionada con diferencias en las propiedades de unión del 2º Ac, o bien con el hecho de que éste no se encuentre a saturación.

Cabría esperar, sin embargo, que la limitación con la microesfera control positivo no influyera en la detección de los Ac anti-HLA, ya que, el resto de las microesferas están recubiertas de moléculas HLA nativas (escrutinio) o recombinantes (determinación de especificidades), a las que deberían unirse los Ac independientemente de la subclase, y que, por tanto, los valores de MFI en estas microesferas solo dependerían de la subclase de IgG de los Ac anti-HLA. Sin embargo, no conseguimos poner a punto la metodología para poder detectar Ac no fijadores de C, ya que, nos encontramos con problemas de sensibilidad y

especificidad que no nos permitían discriminar correctamente qué sueros presentaban estas subclases. En consecuencia, con respecto a la detección de Ac no fijadores, no hemos podido alcanzar totalmente nuestro objetivo.

En cuanto a la comparación de ensayos de fijadores, el problema es que no se dispone de una técnica *gold estándar*, ya que, en principio, cabe esperar que entre los sueros positivos para el ensayo de IgG, se encuentren tanto sueros con isotipos fijadores como no fijadores y que, por tanto, como se dijo anteriormente, encontremos sueros con patrón positivo en el ensayo convencional pero negativos con IgG1+IgG3 y C1q. Por tanto, establecimos una serie de parámetros que nos permitieran comparar los ensayos, en concreto, en los ensayos de escrutinio, el número de grupos de microesferas positivos; y en el de determinación de especificidades, la concordancia de las primeras 5 y 10 microesferas. En lo que respecta al ensayo de escrutinio, en general, se observó que el número de sueros positivos para todos los grupos de microesferas es mayor cuando se utiliza el ensayo de IgG1+IgG3 que cuando se utiliza el de C1q, y que el grado de concordancia entre las 2 técnicas de Ac fijadores de C es bastante pobre. La concordancia de las técnicas de fijadores con el ensayo convencional era también bastante deficiente en ambos casos, encontrándose las discordancias en el sentido de sueros positivos según la técnica convencional y negativos con las de IgG1+IgG3 y C1q. Estas discordancias eran más acusadas con el ensayo de C1q, y esto puede ser debido a que este ensayo no está validado para escrutinio, sino sólo

para la determinación de especificidades, aunque intentamos adaptarlo por razones básicamente económicas, ya que, los ensayos de detección de especificidades con SA son muchos más caros que los de escrutinio, por lo que, poder contar con una técnica de escrutinio capaz de distinguir este tipo de Ac supondría un ahorro importante. En cuanto al ensayo de determinación de especificidades, los resultados de ambas técnicas son muy similares. Tanto en lo que respecta al grado de concordancia de las primeras 5 y 10 microesferas positivas, como en los valores medianos de MFI, donde no observamos diferencias significativas. Además presentan un grado de concordancia bueno, tanto en la detección de Ac frente a moléculas de clase I como de clase II.

En cuanto a la correlación entre las dos técnicas no celulares para fijadores de C y la CDC, la concordancia del ensayo de determinación de especificidades de clase I con ambos 2º Ac y la CDC es bueno, aunque con algunas discordancias en ambos sentidos. Quizás la más llamativa, es el caso de 2 sueros positivos con CDC y en los que se detectan Ac anti-HLA-A2 en el ensayo convencional, que, sin embargo, resultaron negativos tanto para IgG1+G3 como para C1q, resultados que ponen de manifiesto que se pueden encontrar sueros con Ac anti-HLA específicos en concentraciones suficientes para ser detectados por CDC y que, sin embargo, resultan negativos con técnicas más sensibles cuando se utilizan anti-IgG1+G3 o C1q como 2ºAc. No se pudo establecer concordancia de estos ensayos con la CDC para clase II porque sólo disponíamos de los resultados de ensayos de CDC con células T.

En resumen, aunque el grado de concordancia entre las técnicas de detección de Ac fijadores de C para el ensayo de determinación de especificidades es bueno, se encontraron discrepancias en ambos sentidos, por lo que, se decidió analizar los resultados con ambos 2º Ac. Así, de acuerdo con nuestros resultados, en nuestra cohorte de pacientes trasplantados con XMv positivo en el ensayo convencional y CDC negativa, detectamos que prácticamente la tercera parte de los pacientes se trasplantó con XMv positivo para Ac fijadores de C tanto con el ensayo de IgG1+IgG3, como con el ensayo de C1q. Nuestros resultados para el ensayo de IgG1+IgG3 son similares a los publicados por otros autores en cuanto a la prevalencia de Ac anti- HLA-DSA de isotipos IgG1+IgG3 en sueros pre-trasplante de pacientes trasplantados con CDC-XM negativo y XMv IgG positivo (*Hönger G y col. 2011*). Existen discrepancias en cuanto a los datos de prevalencia de Ac anti-C1q DSA pre-trasplante, que oscilan entre la mitad (*Crepo M y col. 2013*), un cuarto (*Thammanichanond P y col. 2016*) e incluso menos, alrededor de un 15% (*Otten HG y col. 2012*) de los pacientes trasplantados con CDC-XM negativo y XMv IgG positivo. Las diferencias encontradas pueden deberse al número de pacientes incluidos en cada estudio, que es bastante bajo, algunos con menos de 30 pacientes; a diferencias en los valores de MFI considerados en los puntos de corte y a diferencias de procedimiento. Nuestros datos sugieren que el resultado del XMv con C1q o con IgG1+IgG3 depende en gran medida de los valores de MFI de la microesfera DSA en el ensayo convencional, ya que, los anti-HLA DSA detectados por las técnicas de Ac fijadores de C presentaban valores de MFI más elevados

con la técnica convencional, observación que coincide con las de otros autores (*Crespo M y col. 2013, Yell M y col. 2015, Zeevi A y col. 2013*). Por tanto, además de que la clase y subclase de los Ac anti-HLA sea fijadora de C, el resultado del XMv con fijadores de C parece depender de la concentración de Ac específicos, ya que, los valores de MFI en técnicas como SA reflejan, aunque con excepciones, la concentración de Ac. Además, determinados estudios sugieren que XMv C1q positivo y cualquier DSA con MFI > 12.000 tienen efectos equivalentes sobre la supervivencia del injerto (*Freitas M y col. 2013*).

Uno de los objetivos de este trabajo era determinar si existen diferencias en la evolución del trasplante entre los pacientes que presentan DSA fijadores y aquellos con DSA no fijadores de C. En la cohorte empleada para este estudio, se había demostrado en un estudio previo, que los DSA detectados con técnicas sensibles eran relevantes en la evolución del trasplante, no obstante, se observaban diferencias en la evolución de los pacientes (*Caro-Oleas JL y col. 2011, Caro-Oleas JL y col. 2013*). Los resultados del presente estudio, que pretende ayudar a establecer las bases de esa diferente evolución, sugieren una mayor incidencia de AMR en los pacientes con XMv positivo cuando la determinación de DSA se realiza con C1q y o, sobre todo, con IgG1+IgG3, tanto para clase I y especialmente para clase II, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística, probablemente por limitaciones en el tamaño de la cohorte. Sin embargo, no se observó ninguna tendencia en la incidencia de TCMR ni en la pérdida de injerto. En este sentido, nuestros resultados son

consistentes con los de otros estudios donde se observa mayor incidencia de AMR en pacientes que presentaban Ac anti-HLA DSA de subclases IgG1 y/o IgG3, tanto de manera aislada como en mezcla con Ac anti-HLA DSA de subclases no fijadoras de C (Hönger G y col. 2011). Además, en estudios en pacientes pediátricos trasplantados de corazón se ha observado asociación entre XMv con C1q positivo y mayor incidencia de AMR agudo, si bien, algunos de estos pacientes presentaban en el momento del trasplante incluso CDC-XM positivos (Chin C y col. 2012, Zeevi A y col. 2012). Sin embargo, otros autores no observan mayores tasas de AMR en trasplantados renales con XMv C1q positivo pre-trasplante (Crespo M y col. 2013; Thammanichanond P y col. 2016). De nuevo, las discrepancias pueden ser debidas al bajo número de pacientes incluidos en los diferentes estudios, a los puntos de corte y a la metodología empleada. En estos trabajos, al igual que en el nuestro, no se observa mayor incidencia de pérdida del injerto en estos pacientes (Hönger G y col. 2011, Otten HG y col. 2012, Crespo M y col. 2013, Thammanichanond P y col. 2016). Nuestras conclusiones se han encontrado limitadas por el hecho de no poder poner a punto la metodología para detectar las subclases no fijadoras de C. No hemos podido determinar el papel que pueden tener estos Ac en la evolución del trasplante, pero creemos que no se debería asumir que los casos XMv IgG positivo que son negativos para IgG1+G3 y C1q, son XMv positivos correspondientes a Ac no fijadores de C. Nuestros resultados, como se ha mencionado, sugieren que los XMv IgG1+G3 y C1q se corresponden con XMv con valores de MFI más elevados en el ensayo convencional, por lo que

pensamos que el grupo de sueros negativos para ambos ensayos de fijadores incluiría algunos no fijadores, pero también sueros que, en general, presenten valores de MFI más bajos. Además, los sueros con Ac anti HLA-A2 detectados tanto con Luminex® IgG como con CDC que son negativos con IgG1+IgG3 y C1q, demuestran que no solo factores propios del suero como el isotipo y la concentración intervienen en el patrón de reacción del mismo. Algunos de estos factores son conocidos: concentración de moléculas HLA en cada microesfera, reconocimiento de epítomos compartidos por muchas moléculas HLA, etc., pero otros tienen difícil interpretación.

Además, la capacidad de activar el C *in vivo* depende de muchos más factores. El isotipo de Ig o subclase de IgG, es condición necesaria pero no suficiente para la activación *in vivo*. Otros condicionamientos a parte de los ya mencionados para la activación *in vivo* son, el efecto sinérgico generado por varios Ac dirigidos a distintos epítomos situados en la misma o en diversas moléculas HLA, y los mecanismos de regulación de la activación del C que presentan las células endoteliales (Kushihata F y col. 2004, Bartel G y col. 2007). Además, los cambios que se producen en el trasplante y después del mismo, así como la terapia inmunosupresora pueden condicionar la magnitud de la respuesta humoral y de la antigenicidad al epítomo HLA diana (Burns JM y col. 2008), y este hecho podría explicar, en parte, las diferencias encontradas entre los estudios pre y post-trasplante.

En cuanto al estudio del sistema MICA, la distribución de los alelos que se ha encontrado en el presente trabajo, es similar a la descrita en población española (Lucas D y col. 2008, Cambra A. y col. 2009). Cabe destacar la diferente distribución de los alelos MICA*008 y MICA*009 en los grupos de pacientes y donantes. Una posible explicación para este hallazgo y especialmente para el incremento de MICA*009 entre los receptores, puede ser la enfermedad de base de los pacientes trasplantados. Así, las nefropatías de base autoinmune pueden estar asociadas a determinados haplotipos HLA que contengan este alelo MICA. De hecho, entre los pacientes portadores de MICA*009 observamos que las enfermedades más comunes son la nefropatía diabética y algunas enfermedades sistémicas (nefritis lúpica, vasculitis por ANCA, síndrome urémico hemolítico y el síndrome de Goodpasture), todas ellas con componente autoinmune y asociadas a HLA. Concretamente, el 23.8% de los receptores MICA*009 tenían este tipo de patologías frente al 5.0% de los receptores no portadores de este alelo ($p= 0.001$; OR 5.9 IC 95% [1.7-21.6]). Existen algunos estudios que sugieren asociación de ciertos alelos MICA, entre los que se encuentra MICA*009 y la diabetes (Triolo TM y col. 2009, Alizadeh BZ y col. 2007, Van Autreve JE y col. 2006, Gambelunghe G y col. 2000, Raache R y col. 2012) aunque otros atribuyen esta asociación al desequilibrio de ligamiento de ciertos alelos MICA con determinados alelos HLA de la región de clase II, que serían los relacionados con la enfermedad (Field SF y col. 2008).

Las moléculas MICA actúan como ligandos para las células NK y los cambios en la secuencia de la proteína

podrían influir en una expresión anormal de la molécula. Así, el alelo MICA*008 tiene una mutación (A5.1) que determina que la proteína sea más corta y contenga menos aminoácidos hidrófobos, características que influyen en la expresión de la molécula en la superficie celular y que podrían relacionarse con alteraciones de la respuesta inmune (Tonnerre P y col. 2010). La mutación A5.1 se ha asociado con predisposición al cáncer (Lavado-Valenzuela R y col. 2009), a determinadas infecciones virales (Moenkemeyer M y col. 2009) y, más recientemente, con la evolución del trasplante (Tonnerre P y col. 2013). Interesantemente, en nuestro estudio se observó que todos los pacientes que perdieron su injerto, habían sido trasplantados con donantes de portadores de la mutación A5.1. Aunque el número de pacientes es pequeño y la tasa de pérdida del injerto baja, se trata de un factor a considerar en futuros estudios, ya que, las células endoteliales con la mutación A5.1 potencian la interacción con el ligando NKG2D y la activación de las células NK del receptor, promoviendo la lisis de las células endoteliales A5.1 alogénicas (Tonnerre P y col. 2013), lo que podría afectar a la supervivencia del injerto y explicar nuestros resultados.

El polimorfismo MICA puede afectar no solo a la expresión de la molécula en superficie, sino también a su afinidad en la interacción con NKG2D que puede afectar al umbral de activación de las células NK y a la modulación de la respuesta de las células T CD8 (Steinle A y col. 2001). Las interacciones de alta afinidad podrían desempeñar un papel en el desencadenamiento o exacerbación de

reacciones autoinmunes (Groh V y col. 2001). En el contexto del trasplante, los acoplamientos entre moléculas MICA de alta afinidad del injerto y NKG2D de las células NK de los receptores puede promover toxicidad celular y lisis de células endoteliales (Tonnerre P y col. 2010). En este sentido, se ha descrito que la presencia de M o V en posición 129 confiere afinidad fuerte o débil por NKG2D respectivamente. Al contrario de lo que sucede con la mutación A5.1, el polimorfismo de la posición 129 presenta la misma distribución en pacientes y donantes. En cuanto a la evolución del trasplante, nuestros resultados sugieren asociación entre la tasa de TCMR y este polimorfismo, ya que, en general, los pacientes trasplantados con incompatibilidad 129M presentan con mayor frecuencia episodios de TCMR.

En cuanto a la prevalencia de Ac anti-MICA en los sueros pre-trasplante y post-trasplante, en nuestro estudio es similar a la descrita por otros autores (Zou YN y col. 2007, Terasaki PI y col. 2007, Lemy A y col. 2010, Cox ST y col. 2011). La mayoría de los trabajos que analizan los Ac anti-MICA solo incluyen un estudio de escrutinio y, en este sentido, hay que destacar, que cuando se consideran los resultados obtenidos tras el estudio de especificidades, la prevalencia desciende a la mitad. Por tanto, hemos observado discordancia entre la técnica de escrutinio y de asignación de especificidades, ya que, en más de la mitad de las muestras positivas con el escrutinio, no se detectó ninguna especificidad, situación aún más patente con las muestras con resultados consideradas en el área gris en el escrutinio. Aunque no se observaron grandes diferencias respecto a

otros estudios en cuanto al escrutinio, hay factores como la mala sensibilidad y/o especificidad del sistema de detección y la falta de estandarización de los ensayos de detección de Ac anti-MICA que pueden influir en los resultados (Luo L y col. 2014). Por ejemplo, hay cierta controversia con elementos fundamentales como el punto de corte que se selecciona para atribuir un resultado como positivo. Estos ensayos están menos estandarizados que los de Ac anti-HLA, ya que éstos son relevantes en el trasplante y se usan en la práctica clínica diaria. Los valores de positivo/negativo en los ensayos de Ac anti-HLA se han ajustado con datos previos de otros ensayos y de las historias de inmunización de los pacientes. No obstante, los resultados de Ac anti-HLA dudosos en ensayos de escrutinio suelen ser negativos en la detección de especificidades. En los ensayos de Ac anti-MICA los valores de escrutinio no están tan ajustados porque no se utilizan sistemáticamente ni en nuestro laboratorio, ni en otros y no existen las referencias de resultados con otros ensayos. Por lo tanto, la tasa de Ac anti-MICA puede estar sobrevalorada, si el ensayo de escrutinio es inespecífico, o por el contrario, podría infravalorarse, si el ensayo de determinación de especificidades tiene problemas de baja sensibilidad. Así, si bien la producción de Ac anti-MICA es alogénica y, por tanto, se induce sólo tras ponerse en contacto con moléculas extrañas, hay trabajos que describen Ac frente a moléculas MICA propias (Sapák M y col. 2014; Suárez-Álvarez B y col. 2009). En nuestro estudio, hemos no hemos detectado Ac anti-MICA frente a antígenos propios.

En cuanto a la relación entre la presencia de Ac anti-MICA y la evolución del trasplante, el número de pacientes con Ac pre-trasplante y desarrollados *de novo* no nos permitió realizar un análisis por separado, pero nuestros resultados sugieren asociación de la presencia de Ac anti-MICA y la pérdida del injerto cuando estos son detectados en el escrutinio, y la tendencia es idéntica cuando se consideran los Ac anti-MICA detectados por SA. Esta asociación sería independiente de la coexistencia de Ac anti-HLA-DSA y se mantiene cuando se analizan los MICA-DSA, si bien, el número es demasiado bajo para alcanzar la significación estadística. En relación con esta cuestión, los trabajos previos muestran resultados contradictorios, en algunos trabajos se describe una mayor tasa de pérdida del injerto en pacientes con Ac anti-MICA previos al trasplante (Zou Y y col. 2007) o desarrollados *de novo* (Terasaki PI y col. 2007); mientras que en otros estudios no se observó relación entre la presencia de Ac anti-MICA y la evolución del mismo (Solgi G y col. 2012, Yu LX y col. 2011, Lemy A y col. 2010). Las discrepancias pueden deberse a las consideraciones metodológicas reseñadas anteriormente, además, la mayoría de los estudios investigan la presencia de Ac anti-MICA en general, sin distinguir si estos son o no MICA-DSA, ya que, no se realiza el MICA-XMv, puesto que no se analiza la especificidad de los Ac-MICA ni se determinan los alelos del donante. Por tanto, el papel de los Ac anti-MICA DSA en la evolución del trasplante es completamente desconocido.

En cuanto a la posible intervención de moléculas del sistema renina-angiotensina en la evolución del trasplante señalar que se encontraron diferencias significativas en la

frecuencia de Ac anti-ATR1 entre las dos cohortes que se utilizaron en este estudio. La prevalencia de estos auto-Ac es doble en el suero de pacientes de la cohorte retrospectiva que en los de la prospectiva, tanto en sueros pre como post-trasplante. Estas cohortes presentan una serie de características diferentes, así, en la retrospectiva es más frecuente la infección por virus de la hepatitis C (VHC) (10.7% frente al 2.8% en la prospectiva) y el ACV como causa de muerte (73.3% frente al 55.3% de la cohorte prospectiva). Estas diferencias pueden deberse a que los pacientes de la cohorte retrospectiva se incluyeron por tener estudio biopsia y en nuestro hospital no se realizan biopsias de protocolo sino únicamente biopsias diagnósticas y, por tanto, los pacientes de esta cohorte tienen, en general, peor función renal. Tanto la infección por VHC del paciente como la edad del donante y, por tanto, indirectamente el ACV, más frecuente en donantes añosos, son variables que influyen negativamente en la evolución del trasplante. Por tanto, las diferencias encontradas entre estas dos cohortes, pueden ser reflejo indirecto de la relación entre la presencia de estos Ac y la evolución del trasplante. Cabe destacar que en la literatura se encuentran grandes variaciones en los datos de prevalencia de Ac anti-ATR1 del 17.0% (*Taniguchi y col. 2013*) al 47.2% (*Giral y col. 2013*) y que las diferencias que hemos encontrado entre nuestras cohortes podrían explicar, al menos en parte, estas discrepancias. Otras limitaciones están relacionadas con los puntos de corte de los ensayos que oscilan entre 9-10 U/mL (*Taniguchi y col. 2013, Banasik M y col. 2014*) y 17 U/mL (*Dragun D y col. 2005, Reinsmoen NL y*

col. 2010), criterio que puede influir también en los resultados.

Se ha descrito asociación entre la presencia de Ac anti-ATR1 y pérdida del injerto (*Taniguchi y col. 2013, Giral y col. 2013*) con un riesgo bastante elevado, especialmente si son *de novo*, de hasta 2.6 a partir del 3º año de seguimiento, si los Ac se detectan en sueros pre-trasplante. Sin embargo, en nuestro estudio, los pacientes de la cohorte retrospectiva con Ac anti-ATR1 no tenían más probabilidad de pérdida de injerto que los que no presentaban Ac, si bien, detectamos que el tiempo que transcurría desde el trasplante hasta la biopsia era menor en los pacientes con este tipo de auto-Ac. Por otro lado, en la cohorte prospectiva, con una menor prevalencia de Ac anti-ATR1 y un tamaño muestral muy pequeño, las pérdidas de injerto fueron más frecuentes en el grupo de pacientes con Ac. Todos estos resultados, sugieren algún tipo de relación entre la presencia de Ac anti-ATR1 y una peor función del injerto que, al menos en la cohorte retrospectiva, no se traduce en un número más elevado de pérdidas. En este sentido, sólo el TCMR es más frecuente entre pacientes con Ac anti-ATR1 en ambas cohortes y nuestros resultados concuerdan con los de un trabajo previo que describe mayor tasa de TCMR IIB en pacientes con Ac anti-ATR1 (*Banasik y col. 2014*). Los hallazgos histológicos en la biopsia sugieren que los pacientes con Ac anti-ATR1 tienen un mayor componente vascular, de hecho, la presencia de vasculitis en las biopsias es significativamente más frecuente en pacientes con estos auto-Ac. En este sentido, los Ac anti-ATR1, fueron descritos en un grupo de 16 pacientes trasplantados renales con

rechazo vascular e hipertensión maligna sin Ac anti-HLA (*Dragun D y col. 2005*) y, anteriormente, ya se habían asociado a preeclampsia e hipertensión maligna (*Fu ML y col. 2000, Wallukat G y col. 1999*). Además, nuestra observación es concordante con la de otros grupos que han descrito un mayor grado de endarteritis en pacientes con Ac anti-ATR1 (*Banasik y col. 2014*). Algunos autores insisten en la necesidad de clasificar los patrones de rechazo en función de la presencia de componente vascular para tratar más adecuadamente a los pacientes (*Lefaucheur y col. 2013*). Otro factor que se ha asociado a la preeclampsia y otras complicaciones hipertensivas del embarazo con componentes inmunológicos e inflamatorios, han sido las variantes de la enzima ERAP2 (*Johnson MP y col. 2009*). En el presente estudio, se observó que la prevalencia de Ac anti-ATR1 era mayor entre pacientes con genotipos productores de la enzima (AA y AB), aunque esta tendencia no alcanzó la significación estadística, quizás debido el bajo número de pacientes con Ac. Sin embargo, este dato es interesante para posteriores estudios, ya que, incluso se observa una gradación entre los individuos productores del enzima, y así, la prevalencia de Ac es mayor entre homocigotos que entre heterocigotos.

Destacar que aunque no se sabe por qué determinados individuos producen estos auto-Ac, su presencia se ha asociado con procesos infecciosos e inflamatorios y pueden dar lugar a una pérdida de tolerancia de las células T al generar epítomos ligeramente modificados, que pueden estar implicados en el origen de la producción de estos Ac. Por ejemplo, se ha descrito que

los Ac anti-ATR1 IgG3 reconocen un epítipo que también se encuentra en la proteína de la cápside del parvovirus B19 (Stepan H y col. 2007) y se han encontrado Ac frente a receptores acoplados a proteínas G en miastenia grave y la enfermedad de Chagas (Schwimmbeck PL y col. 1989, Masuda MO y col. 1998). No se conoce porque los Ac anti-ATR1 podrían relacionarse con una peor evolución del trasplante, sin embargo, se sabe que se unen al segundo loop extracelular del ATR1 mimetizando los efectos de su propio ligando (la angiotensina II) lo que origina una hiperactivación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Dragun D y col. 2005). La alteración del eje renina-angiotensina-aldosterona da lugar a varios efectos patológicos que incluyen hipertensión, preeclampsia, fallo cardíaco, enfermedad renal, arteriosclerosis y desarrollo de cáncer. La relación con el trasplante puede ser consecuencia de un aumento en la expresión de ATR1 en el riñón dañado por la respuesta alogénica (Reinsmoen NL y col. 2010). Se ha propuesto un mecanismo fisiopatológico de daño, según el cual, la unión de estos Ac a su receptor ejercería un efecto directo sobre las células endoteliales y células musculares vasculares del injerto mediante la activación de la vía de señalización de la fosfolipasa C, que produce la fosforilación de la kinasa Erk 1/2 y aumento del factor de transcripción $\kappa\beta$ (Dragun D y col. 2005). Este mecanismo sería independiente de la vía del C lo que explicaría la baja frecuencia de biopsias C4d positivas encontradas en estos pacientes (Scornik y col. 2007). El modelo plantea varios factores permisivos, tales como el estrés oxidativo, inducido por la isquemia/reperfusión o los aloantígenos, factores pueden alterar el equilibrio

homeostático en el endotelio y/o cambiar las características bioquímicas y biofísicas de la unión del Ac a su receptor y, por lo tanto, aumentar la predisposición a este proceso. La unión del Ac al receptor podría provocar disfunción endotelial causando vasoconstricción arteriolar, aumento de la adhesión y migración de células efectoras o favorecer la coagulación, lo que provocaría hipertensión y rechazo de tipo vascular. Además, los Ac anti-ATR1 pueden actuar sobre las células epiteliales tubulares y las células intersticiales, amplificando la respuesta inflamatoria local y aumentando la presentación antigénica, así como de citoquinas de tipo Th1 y de quimiocinas que, en definitiva, provocarían un rechazo celular (figura 28). Por tanto, aún no está claro si la patología relacionada con la presencia de Ac anti-ATR1 supone una situación cierta de rechazo, o por el contrario, se trata de un fenómeno autoinmune que se evidencia en un medio ambiente alogénico permisivo (Dragun y col. 2007).

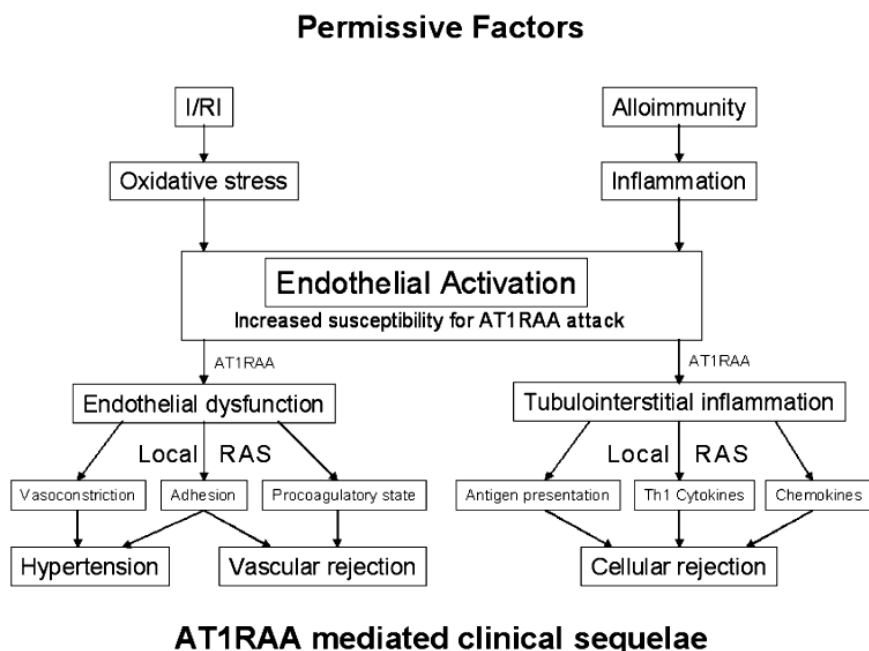


Figura 28: Modelo de daño producido por Ac anti-ATR1. (Dragun D y col. 2007). Determinados factores tales como la isquemia/reperfusión, el estrés oxidativo y la inflamación pueden provocar disfunción endotelial e inflamación tubulointerstitial que desembocan en hipertensión, rechazo vascular o rechazo celular del injerto al estar presentes Ac anti-ATR1. AT1RAA: Ac anti-ATR1; I/R: daño por isquemia/ reperfusión; RAS: sistema renina angiotensina.

En resumen, aunque está bien establecido que los Ac anti-HLA juegan un papel esencial en el rechazo y pérdida de injertos, en el presente trabajo hemos desarrollado un método de detección de Ac anti-HLA IgG1+IgG3 que presenta un buen grado de correlación con la detección con C1q para la determinación de especificidades. Los pacientes con XMv positivo IgG1+IgG3 presentan mayor tendencia al desarrollo de AMR y pérdida de injerto. Además, hemos observado que determinados polimorfismos

de las moléculas MICA condicionan la evolución del trasplante, ya que, los pacientes trasplantados con injertos de donantes con la mutación A5.1 presentan mayor tasa de pérdida del órgano y los pacientes trasplantados con la incompatibilidad 129M tienen mayor prevalencia de TCMR. Por último, nuestros resultados sugieren relación entre la presencia de Ac anti-MICA y la pérdida de injertos y mayor prevalencia de TCMR precoz con mayor grado de vasculitis en los pacientes con Ac anti-ATR1.

PERSPECTIVAS

Se debe seguir profundizando en el papel que podrían jugar los distintos isotipos de Ac en la evolución del trasplante renal. Para ello, en primer lugar se deberían de desarrollar ensayos capaces de detectar Ac no fijadores de C, algo que no hemos podido lograr en el presente trabajo, para poder conocer su implicación real. Y en segundo lugar, conociendo las limitaciones de estas técnicas, confirmar la relevancia de estos Ac en estudios pre-trasplante y post-trasplante, ya que parece que la presencia de Ac fijadores de C post-trasplante y especialmente los de *novu* tienen implicaciones en la evolución de trasplante. Loupy describe en su trabajo una fuerte asociación entre la presencia de Ac anti-C1q post-trasplante y mayor riesgo de pérdida del injerto (Loupy y col. 2013). En un trabajo publicado en 2015 asocian la presencia de Ac de subclase IgG3 DSA con mayor incidencia de AMR agudo y con un menor tiempo de rechazo y la presencia de Ac C1q DSA con un mayor fracaso del injerto (Lefaucheur C y col. 2015).

En lo que respecta a los estudios de Ac anti-MICA, en la mayoría de los estudios no se analiza la especificidad de los Ac ni se estudia el tipaje MICA del donante. La especificidad de los Ac contra antígenos MICA se debe verificar realizando el tipaje MICA del donante y del receptor. En nuestro estudio 9 pacientes desarrollaron Ac anti-MICA *de novo* (uno de tipo DSA) y no se observó ninguna asociación entre la presencia de Ac anti-MICA post-trasplante y una peor evolución del trasplante renal.

CONCLUSIONES

1. En relación con las técnicas de detección de anticuerpos fijadores de complemento frente a moléculas HLA, se ha desarrollado una metodología para detectar anticuerpos de isotipos IgG1 e IgG3 con buen grado de concordancia con la técnica comercial de detección de moléculas HLA recombinantes con anti-C1q. Ninguno de estos métodos de detección es adecuado para el escrutinio con moléculas HLA nativas.
2. Las técnicas de detección de anticuerpos anti-HLA fijadores de complemento presentan ciertos problemas de sensibilidad, que sugieren que el grupo de pacientes con prueba cruzada virtual negativa para estos anticuerpos, es en realidad un grupo mixto donde se encuentran pacientes con anticuerpos anti-HLA específicos frente moléculas del donante de

isotipos no fijadores, junto con otros que presentan niveles más bajos de anticuerpos fijadores.

3. En cualquier caso, la tasa de AMR y pérdida del injerto es más elevada en los pacientes con prueba cruzada positiva para fijadores de complemento, sobre todo cuando se detectan con IgG1+IgG3, si bien, las diferencias no alcanzan significación estadística.
4. Nuestros resultados sugieren influencia del polimorfismo del sistema MICA, tanto de la variante MICA A5.1 como de la variante 129M/V en la evolución del trasplante. En este sentido, los pacientes trasplantados con injertos de donante A5.1 tienen mayor tasa de pérdida de injertos y los trasplantados con incompatibilidad 129M presentan mayor tasa de rechazo celular.
5. Nuestros resultados sugieren que los Ac anti-MICA serían marcadores de mal pronóstico en la supervivencia del injerto, ya que, los pacientes con anticuerpos frente a estas moléculas tienen tasas de pérdidas de injerto más elevadas.
6. Nuestros resultados sugieren influencia de los autoanticuerpos anti-ATR1 en la evolución del trasplante renal, ya que los pacientes con este tipo de autoanticuerpos tienen mayor incidencia de rechazo celular precoz con componente vascular.
7. La prevalencia de anticuerpos anti-ATR1 puede estar condicionada en parte por el polimorfismo de *ERAP2*,

ya que, los pacientes de genotipos productores de proteína producen estos autoanticuerpos más frecuentemente que el resto, si bien, las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- **Aguilera I, Alvarez-Marquez A, Gentil MA et al.** *Anti-glutathione S-transferase T1 antibody-mediated rejection in C4d-positive renal allograft recipients.* Nephrol Dial Transplant 2008; 23: 2393-8.
- **Alizadeh BZ, Eerligh P, van der Slik AR et al.** *MICA marks additional risk factors for Type 1 diabetes on extended HLA haplotypes: an association and meta-analysis.* Mol Immunol 2007; 44: 2806-2812.
- **Almahri A, Holgersson J, Alheim M.** *Detection of complement-fixing and non-fixing antibodies specific for endothelial precursor cells and lymphocytes using flow cytometry.* Tissue Antigens 2012; 80: 404-415.
- **Amico P, Hirt-Minkowski P, Hönger G et al.** *Risk stratification by the virtual crossmatch : a prospective study in 233 renal transplantations.* Transplant International 2011; 24: 560-569.
- **Amico P, Hönger G, Mayr M et al.** *Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads.* Transplantation 2009; 1681-1688.
- **Andrés AM, Dennis MY, Kretzschmar WW et al.** *Balancing selection maintains a form of ERAP2 that undergoes nonsense-mediated decay and affects antigen presentation.* PLoS Genet 2010; 6: e1001157.

- **Arsenault J, Lehoux J, Lanthier L et al.** *A single-nucleotide polymorphism of alanine to threonine at position 163 of the human angiotensin II type 1 receptor impairs Losartan affinity.* Pharmacogenet Genomics 2010; 20: 377-388.
- **Bahram S.** *MIC genes: from genetics to biology.* Adv. Immunol 2000; 76: 1-60.
- **Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE et al.** *A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes.* Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1994; 91: 6259-6263.
- **Banasik M, Boratyńska M, Kościelska-Kasprzak K et al.** *The influence of non-HLA antibodies directed against angiotensin II type 1 receptor (AT1R) on early renal transplant outcomes.* Transpl Int 2014; 27: 1029-1038.
- **Bartel G, Wahrmann M, Exner M et al.** *Determinants of the complement-fixing ability of recipient presensitization against HLA antigens.* Transplantation 2007; 83: 727-733.
- **Bielmann D, Hönger G, Lutz D et al.** *Pretransplant risk assessment in renal allograft recipients using virtual crossmatching.* Am J Transplant 2007; 7: 626-632.
- **Bjorkman P,** California Institute of Technology, Pasadena, CA. Robbins & Cotran: Pathologic Basis of Diseases, Elsevier 2005.

- **Bos IG, Ten Berge IJ, Hack CE.** *Role of complement in graft rejection after organ transplantation.* *Transfus Med Rev* 2002; 61: 251-264.
- **Burns JM, Cornell LD, Perry DK et al.** *Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation.* *Am J Transplant* 2008; 8: 2684-94.
- **Cambra A, Muñoz-Saá I, Crespí C et al.** *MICA-HLA-B haplotype diversity and linkage disequilibrium in a population of Jewish descent from Majorca (the Balearic Islands).* *Hum Immunol* 2009; 70: 513-517.
- **Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, Gentil-Govantes MA et al.** *Clinical relevance of anti-HLA donor-specific antibodies by Luminex assay in the development of rejection after renal transplantation.* *Transplantation* 2012; 94: 338-44.
- **Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, Gentil-Govantes MA et al.** *Influence of donor specific HLA antibodies detected by Luminex in kidney graft survival: a multivariate analysis.* *Hum Immunol* 2013; 74(5): 545-9.
- **Chen E, Lin L, Chen CJ et al.** *MIC gene polymorphism and haplotype diversity in Zhuang nationality of Southern China.* *Hum Immunol* 2014; 75: 953-959.
- **Chen G, Sequeira F, Tyan DB.** *Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G*

strength on single antigen beads. Hum Immunol 2011; 72: 849-858.

- **Chin C, Chen G, Sequeria F et al.** *Clinical usefulness of a novel C1q assay to detect immunoglobulin G antibodies capable of fixing complement in sensitized pediatric heart transplant patients. J Heart Lung Transplant 2011; 30: 158-163.*
- **Cox ST, Stephens HA, Fernando R et al.** *Major histocompatibility complex class I-related chain A alleles mismatching, antibodies, and rejection in renal transplantation. Hum Immunol 2011; 72: 827-34.*
- **Crespo M, Torio A, Mas V et al.** *Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: Does C1q-fixation matter? Transpl Immunol 2013; 29: 28-33.*
- **Deitch EA, Mancini MC.** *Complement receptors in shock and transplantation. Arch Surg 1993; 128: 1222-1226.*
- **Dragun D.** *The role of angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies in renal allograft vascular rejection. Pediatr Nephrol 2007; 22: 911-914.*
- **Dragun D.** *Humoral responses directed against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplantation. Transplantation 2008; 86: 1019-1025.*
- **Dragun D, Muller DN, Brasen JH et al.** *Angiotensin II type 1- receptor activating antibodies in renal allograft rejection. N Engl J Med 2005; 352: 558-569.*

- **Duquesnoy RJ, Marrari M, Jelenik L et al.** *Structural aspects of HLA class I epitopes reacting with human monoclonal antibodies in Ig-binding, C1q-binding and lymphocytotoxicity assays.* Hum Immunol 2013; 74: 1271-1279.
- **Elton TS, Martin MM.** *Alternative splicing: a novel mechanism to fine-tune the expression and function of the human AT1 receptor.* Trends Endocrinol Metab 2003; 14: 66-71.
- **Eng HS, Bennett G, Tsiopelas E et al.** *Anti-HLA donor-specific antibodies detected in positive B-cell crossmatches by luminex predict late graft loss.* Am J of Transplant 2008; 8: 2335-2342.
- **Evnouchidou I, Weimershaus M, Saveanu L et al.** *ERAP1 ERAP2 dimerization increases peptide trimming efficiency.* J Immunol 2014; 193: 901-908.
- **Ferguson R.** *Acute rejection episodes – best prediction of longterm primary cadaveric renal transplant survival.* Clin Transplant 1994; 8: 328-331.
- **Field SF, Nejentsev S, Walker NM, et al.** *Sequencing-based genotyping and association analysis of the MICA and MICB genes in type 1 diabetes.* Diabetes 2008; 57: 1753-6.
- **Freitas MC, Rebellato LM, Ozawa M et al.** *The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney*

transplantation outcomes. Transplantation 2013; 95: 1113-1119.

- **Fu ML, Herlitz H, Schulze W et al.** *Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension. J Hypertens 2000; 18: 945- 953.*
- **Gambelunghe G, Ghaderi M, Cosentino A et al.** *Association of MHC Class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with Type I diabetes. Diabetologia 2000; 43: 507-514.*
- **Gannage M, Buzyn A, Bogiatzi SI et al.** *Induction of NKG2D ligands by gamma radiation and tumor necrosis factor-alpha may participate in the tissue damage during acute graft-versus-host-disease. Transplantation 2008; 27: 911-915.*
- **Gasparo M, Catt KJ, Inagami T et al.** *International Union of Pharmacology XXIII. The Angiotensin II Receptors. Pharmacol Rev 2000; 52: 415-472.*
- **Gibney EM, Cagle LR, Freed B et al.** *Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. Nephrol Dial Transplant 2006; 21: 2625-2629.*
- **Giral M, Foucher Y, Dufay A et al.** *Pretransplant sensitization against angiotensin II type 1 receptor is a risk factor for acute rejection and graft loss. Am J Transplant 2013; 13: 2567-2576.*

- **Gloor JM, Winters JL, Cornell LD et al.** *Baseline donor-specific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation.* Am J Transplant 2010; 10: 582-589.
- **Grebel HM y Bray RA.** *HLA antibody detection with solid phase assays: great expectations or expectations too great?* Am J Transplan 2014; 14: 1964-1975.
- **Groh V, Bahram S, Bauer S et al.** *Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium.* Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1996; 93: 12445-12450.
- **Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J et al.** *Costimulation of CD8 α beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced in virus-infected cells.* Nat Immunol 2001; 2: 255-60.
- **Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K et al.** *Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions.* Am J Transplant 2014; 14: 272-283.
- **Hönger G, Hopfer H, Arnold ML et al.** *Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection.* Transplantation 2011; 92: 41-47.
- **Johnson MP, Roten LT, Dyer TD et al.** *The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations.* Hum Genet 2009; 126: 655-666.

- **Jurcevic S, Ainsworth ME, Pomerance A et al.** *Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation.* *Transplantation* 2001; 71: 886-92.
- **Kao KJ, Scornik JC, Small SJ.** *Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies-an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity.* *Transplantation* 1993; 55: 192-196.
- **Karpinski M, Rush DR, Jeffery J et al.** *Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch.* *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 2807-2814.
- **Koeppen & Stanton:** *Berne & Levy Physiology; 6th Edition, Elsevier 2009.*
- **Kushihata F, Watanabe J, Mulder A et al.** *Human leukocyte antigen antibodies and human complement activation: role of IgG subclass, specificity, and cytotoxic potential.* *Transplantation* 2004; 78: 995-1001.
- **Lachmann N, Todorova K, Schulze H et al.** *Systematic comparison of four cell-and Luminex-based methods for assessment of complement-activating HLA antibodies.* *Transplantation* 2013; 95: 694-700.
- **Lautenschlager I, Hockerstedt K, Meri S.** *Complement membrane attack complex and protectin (CD59) in*

liver allografts during acute rejection. J Hepatol 1999; 31; 537-541.

- **Lavado-Valenzuela R, Benavides M, Carabantes F et al.** *MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism in Spanish women with breast cancer.* Tissue Antigens 2009; 74: 46-9.
- **Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Valentin N et al.** *Identification of the antibodies involved in B-cell crossmatch positivity in renal transplantation.* Transplantation 2003; 75: 477-482.
- **Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS et al.** *Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation.* J Am Soc Nephrol 2010; 21: 1398-1406.
- **Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D et al.** *Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study.* Lancet 2013; 26: 313-319.
- **Lefaucheur C, Viglietti D, Bentejewski C et al.** *IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury.* J Am Soc Nephrol 2015; 27: 293-304.
- **Lemy A, Andrien M, Wissing KM et al.** *Major histocompatibility complex class I chain-related antigen A antibodies: sensitizing events and impact on renal graft outcomes.* Transplantation 2010; 90: 168-174.

- **Li P, Morris DL, Willcox BE et al.** *Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA.* Nat Immunol 2001; 2: 443-451.
- **Li P, Willie ST, Bauer S et al.** *Crystal structure of the MHC Class I homolog MIC-A, a $\gamma\delta$ T Cell Ligand.* Immunity 1999; 10: 577-584.
- **Lobo PI, Spencer CE, Brayman KL.** *Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney transplantation.* N Engl J Med 2014; 370: 83-84.
- **Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D et al.** *Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival.* N Engl J Med 2013; 369: 1215-26.
- **Lucas D, Campillo JA, López-Hernández R et al.** *Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain.* Hum immunol 2008; 69: 655-660.
- **Luo L, Li Z, Wu W et al.** *Role of MICA antibodies in solid organ transplantation.* Clin Transplant 2014; 28: 152-60.
- **Mason PM, Parham P.** *HLA class I region sequences.* Tissue Antigens 1998; 51: 417-466.
- **Masuda MO, Levin M, De Oliveira SF et al.** *Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by Trypanosoma cruzi antigens.* FASEB J 1998; 12: 1551-1558.
- **Metha PK, Griending KK.** *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the*

cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C82.

- **Mizuki N, Ota M, Kimura M et al.** Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behçet disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997; 94: 1298-1303.
- **Moenkemeyer M, Heiken H, Schmidt RE et al.** Higher risk of cytomegalovirus reactivation in human immunodeficiency virus-1-infected patients homozygous for MICA5.1. *Hum Immunol* 2009; 70: 175-8.
- **Norris N, Mescia F y Remuzzi G.** STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8: 622-633.
- **Opelz G.** Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet* 2005; 365: 1570-6.
- **Otten HG, Verhaar MC, Borst HP et al.** Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant* 2012; 12: 1618-1623.
- **Patel AM, Pancoska C, Mulgaonkar S et al.** Renal transplantation in patients with pre-transplant donor-specific antibodies and negative flow cytometry crossmatches. *Am J Transplant* 2007; 7: 2371-2377.

- **Patel R, Terasaki PI.** *Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation.* N Engl J Med 1969; 280: 735-739.
- **Pei R, Wang G, Tarsitani C et al.** *Simultaneous HLA class I and class II antibody screening with flow cytometry.* Hum Immunol 1998; 59: 313-322.
- **Pikul FJ, Bolman RM, Saffitz JE et al.** *Anti-B-mediated rejection of an ABO-incompatible cardiac allograft despite aggressive plasma exchange transfusion.* Transplant Proc 1987; 19: 4601-4604.
- **Praprotnik S, Blank M, Meroni PL et al.** *Classification of anti-endothelial cell antibodies into antibodies against microvascular and macrovascular endothelial cells: pathogenic and diagnostic implications.* Arthritis Rheum 2001; 44: 1484-1494.
- **Raache R, Belanteur K, Amroun H et al.** *Association of major histocompatibility complex class 1 chain-related gene a dimorphism with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults in the Algerian population.* Clin Vaccine Immunol 2012; 19: 557-561.
- **Reed EF, Rao P, Zhang Z et al.** *Comprehensive assessment and standardization of solid phase multiplex-bead arrays for the detection of antibodies to HLA.* Am J Transplant 2013; 13: 1859-1870.
- **Reinsmoen NL, Lai CH, Heidecke H et al.** *Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA*

antibody negative patients. Transplantation 2010; 90: 1473- 1477.

- **Riethmüller S, Ferrari-Lacraz S, Müller MK et al.** *Donor-specific antibody levels of three generations of crossmatches to predict antibody-mediated rejection in kidney transplantation. Transplantation 2010; 90: 160-167.*
- **Rojas R, Apodaca G.** *Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3: 944-955.*
- **Sapák M, Chrenová S, Tirpáková J et al.** *Donor non-specific MICA antibodies in renal transplant recipients. Immunobiology 2014; 219: 109-112.*
- **Saveanu, L, Carroll O, Lindo V et al.** *Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. Nat Immunol 2005; 6: 689–697.*
- **Scheiner B, Voss J, Wischhusen J et al.** *Expression of toll-like receptors by human muscle cells in vitro and in vivo: TLR3 is highly expressed in inflammatory and HIV myopathies, mediates IL-8 release and up-regulation of NKG2D receptor. FASEB J 2006; 20: 118-120.*
- **Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V et al.** *In vivo expression patterns of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. PloS ONE 2007; 2: e518.*

- **Schwimmbeck PL, Dyrberg T, Drachman DB et al.** *Molecular mimicry and myasthenia gravis. An autoantigenic site of the acetylcholine receptor alpha-subunit that has biologic activity and reacts immunochemically with herpes simplex virus.* J Clin Invest 1989; 84: 1174-1180.
- **Scornik JC, Guerra G, Schold JD et al.** *Value of posttransplant antibody tests in the evaluation of patients with renal graft dysfunction.* Am J Transplant 2007; 7: 1808-1814.
- **Scornik JC, LeFor WM, Cicciarelli JC et al.** *Hyperacute and acute kidney graft rejection due to antibodies against B cells.* Transplantation 1992; 54: 61-64.
- **Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M et al.** *Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss.* J Am Soc Nephrol 2015; 26: 457-467.
- **Solez K, Colvin RB, Racusen LC et al.** *Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions.* Am J Transplant 2008; 8: 753-760.
- **Solgi G, Furst D, Mytilineos J et al.** *Clinical relevance of pre and post-transplant immune markers in kidney allograft recipients: anti-HLA and MICA antibodies and serum levels of sCD30 and sMICA.* Transpl Immunol 2012; 26: 81-87.

- **Starzl TE, Weil R, Iwatsuki S et al.** *The use of cyclosporine A and prednisone in cadaver kidney transplantation.* Surg Gynecol Obstet 1980; 151: 16-26.
- **Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD.** *The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation.* Nat Rev Nephrol 2012; 8: 670-678.
- **Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V et al.** *Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family.* Immunogenetics 2001; 53: 279-287.
- **Stepan H, Wallukat G, Schultheiss HP et al.** *Is parvovirus B19 the cause for autoimmunity against the angiotensin II type receptor?* J Reprod Immunol 2007; 73: 130-134.
- **Stephens HA.** *MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?* Trends in Immunology 2001; 22: 378-385.
- **Stiller CR, StC Sinclair NR, Abrahams S et al.** *Anti-donor immune responses in prediction of transplant rejection.* N Engl J Med 1976; 294: 978-982.
- **Suárez-Álvarez B, López-Vázquez A, Baltar JM et al.** *Potential role of NKG2D and its ligand in organ transplantation: new target for immunointervention.* Am J Transplant 2009; 9: 251-257.

- **Sumitran-Holgersson S.** *Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation.* *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 607-613.
- **Taniguchi M, Rebellato LM, Cai J et al.** *Higher risk of kidney graft failure in the presence of anti-angiotensin II type-1 receptor antibodies.* *Am J Transplant* 2013; 13: 2577-2589.
- **Tantravahi JR, Womer KL y Kaplan B.** *Why hasn't eliminating acute rejection improved graft survival?* *Ann Rev Med* 2007; 58: 369-385.
- **Terasaki PI.** *Humoral theory of transplantation.* *Am J Transplant* 2003; 3: 665-73.
- **Terasaki PI, Kreisler M, Mickey RM.** *Presensitization and kidney transplant failures.* *Postgrad Med J* 1971; 47: 89-100.
- **Terasaki PI, Ozawa M, Castro R et al.** *Four-years follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival.* *Am J Transplant* 2007; 7: 408-415.
- **Thammanichanonda D, Wiwattanathumb P, Mongkolsuka T et al.** *Role of Pretransplant Complement-fixing Donor-specific Antibodies Identified by C1q Assay in Kidney Transplantation.* *Transplant Proc* 2016; 48: 756-760.
- **The MHC sequencing consortium.** *Complete sequence and gene map of a human major*

histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. Nature 1999; 401: 921-923.

- **Tinckam KJ y Heeger PS.** *Complement donor-specific antibody testing. Nat Rev Nephrol 2013; 9: 713-714.*
- **Tonnerre P, Gérard N, Chatelais M et al.** *MICA gene polymorphism in kidney allografts and possible impact of functionally relevant variants. Transplant Proc 2010; 42: 4318-21.*
- **Tonnerre P, Gérard N, Chatelais M et al.** *MICA variant promotes allosensitization after kidney transplantation. J Am Soc Nephrol 2013; 24: 954-966.*
- **Triolo TM, Baschal EE, Armstrong TK et al.** *Homozygosity of the polymorphism MICA5.1 identifies extreme risk of progression to overt adrenal insufficiency among 21-hydroxylase antibody-positive patients with type 1 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94: 4517-4523.*
- **Van Autreve JE, Koeleman BP, Quartier E et al.** *MICA is associated with type 1 diabetes in the Belgian population, independent of HLA-DQ. Hum Immunol 2006; 67: 94-101.*
- **Wallukat G, Homuth V, Fischer T et al.** *Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. J Clin Invest 1999; 103: 945- 952.*
- **Watanabe Y, Shibata K, Kikkawa F et al.** *Adipocyte-derived leucine aminopeptidase suppresses*

angiogenesis in human endometrial carcinoma via renin-angiotensin system. Clin Cancer Res 2003; 9: 6497-6503.

- **Weinstock C, Schnaidt M.** *The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. Int J Immunogenet 2013; 40: 171-177.*
- **Yamamoto N, Nakayama J, Yamakawa-Kobayashi K et al.** *Identification of 33 polymorphisms in the adipocyte-derived leucine aminopeptidase (ALAP) gene and possible association with hypertension. Human Mutat 2002; 19: 251-257.*
- **Yell M, Muth BL, Kaufman DB et al.** *C1q binding activity of de novo donor-specific HLA antibodies in renal transplant recipients with and without antibody-mediated rejection. Transplantation 2015; 99: 1151-1155.*
- **Yu LX, Gui W, Fu SJ et al.** *Anti-MICA antibodies: risk factors for sensitization and the impact on renal transplantation outcome. J South Med Univ 2011; 31: 615-618.*
- **Zachary AA, Ratner LE, Graziani JA et al.** *Characterization of HLA class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigen targets: II. Clinical relevance. Hum Immunol 2001; 62: 236-246.*
- **Zeevi A, Lunz J, Feingold B et al.** *Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and*

associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. J Heart Lung Transplant. 2013; 32: 98-105.

- **Zhang Q y Reed EF.** *Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. Curr Opin Immunol 2010; 22: 682-8.*
- **Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H et al.** *Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. Hum Immunol 2006; 67: 230-7.*
- **Zou Y, Stastny P, Süsal C et al.** *Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. N Engl J Med 2007; 357: 1293-300.*

ANEXOS

ANEXO 1: ENSAYOS PREVIOS

ENSAYO DE ESCRUTINIO

Pruebas para establecer la dilución del 2º Ac.

Se realizó un ensayo de escrutinio con 2 muestras de suero para determinar la dilución adecuada del 2º Ac en los ensayos con subclases de IgG. Se seleccionaron 2 sueros según sus resultados en el ensayo convencional, uno negativo, suero1, y otro con Ac anti-clase I y II, suero 2. Los valores de MFI de la microesfera control positivo (ver Pacientes y Métodos) que se obtuvieron utilizando diferentes diluciones del 2º Ac (anti-IgG1) se muestran en la tabla A1

Tabla A1: Valores de MFI de la microesfera control positivo en el ensayo de escrutinio para diferentes diluciones del 2º Ac.

DILUCIÓN 2º Ac*	MFI MICROESFERA CP SUERO 1	MFI MICROESFERA CP SUERO 2
1/4000	1145	999
1/2000	1839	1857
1/1000	2750	2488
1/640	2918	3155
1/500	4053	3724
1/400	2261	2112
1/320	3603	3966
1/200	3167	3071
1/160	4871	4585
1/100	4193	5627
1/80	4890	5265
1/50	5314	5228
1/40	5047	5694
1/20	5736	6253
1/10	5960	6600

CP: control positivo. * El 2º Ac ensayado fue la anti-IgG1

Se decidió utilizar la dilución 1/10 para todas las subclases de IgG porque los valores de MFI de la microesfera control positivo eran los más altos y con esta dilución se obtenía una mejor correlación tanto en lo que se

refería al número de grupos de microesferas positivos como al nivel de MFI entre el ensayo convencional y el ensayo con anti-IgG1 para el suero 2. Además, a la dilución seleccionada no se detectaban falsos positivos con el suero 1.

Valor de MFI de la microesfera control positivo con los diferentes 2° Ac.

La figura A1 muestra la media de los valores de MFI de la microesfera control positivo en las determinaciones previas del ensayo de escrutinio tanto con el suero empleado como control negativo propio como con el control negativo del kit con los diferentes 2° Ac utilizados. En algunos casos, se analizaron mezclas de diferentes 2° Ac. En cada ensayo se incluía un control negativo propio y se realizaba una determinación en paralelo con IgG además de con el 2° Ac que se estaba ensayando. Se muestra también la media de los valores de MFI de esta microesfera en el ensayo convencional como referencia.

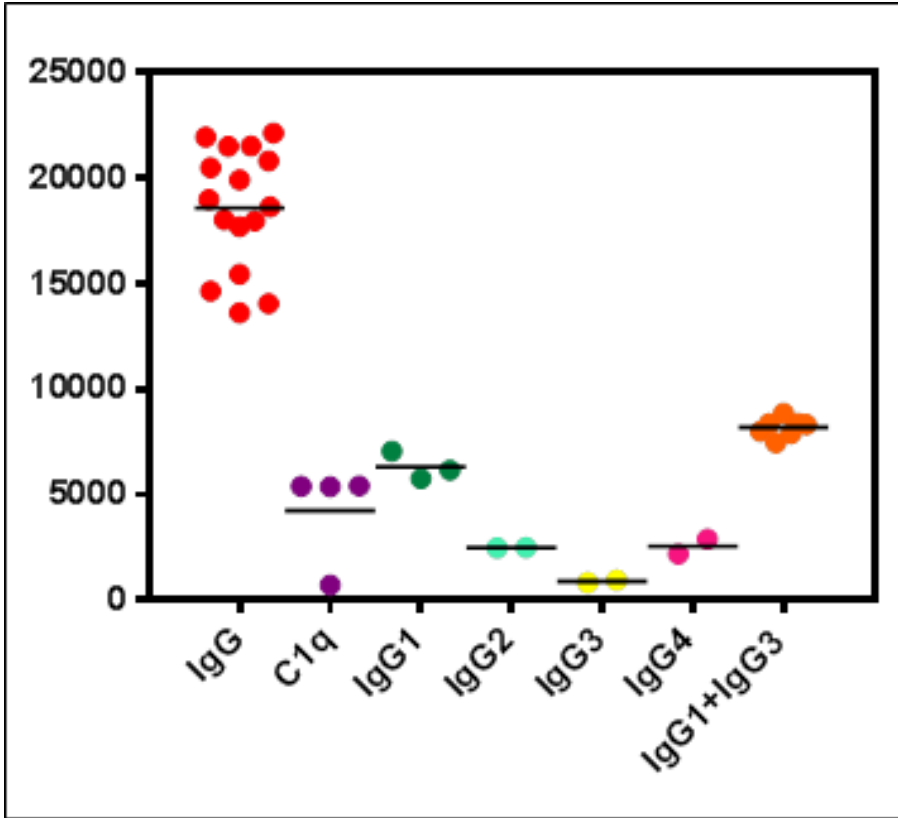


Figura A1: MFI de la microesfera control positivo en el ensayo de escrutinio. En el eje de abscisas se representan los valores de MFI. IgG n=16; C1q n=4; IgG1 n=3; IgG2 n=2; IgG3 n=2; IgG4 n=2 e IgG1+IgG3 n=7. La línea indica la media de cada grupo.

Resultados del ensayo de escrutinio en las pruebas previas.

En la tabla A2 se muestran los resultados preliminares obtenidos en cada ensayo con los distintos 2º Ac en las pruebas previas para clase I (A2a) y para clase II (A2b). Los pacientes incluidos en estas determinaciones habían sido estudiados previamente en el Servicio de Inmunología del

hospital universitario Virgen del Rocío y presentaban alguna de estas 2 características:

- Historial de sueros positivos con CDC que podrían ser positivos en el ensayo anti-IgG1/IgG3 y/o C1q.
- Historial de Ac positivo con técnica de Luminex® y negativo con CDC que, a parte de otras posibilidades, podrían representar sueros con Ac anti-HLA no fijadores de C y ser, por tanto, positivos en los ensayos con anti-IgG2/IgG4.

En base a los niveles de MFI detectados en estas muestras nos planteamos la necesidad de realizar una normalización de los datos poder comparar los resultados de los distintos 2º Ac utilizados.

Tabla A2: Valores medios de MFI en el ensayo de escrutinio con los distintos 2ºAc.**a) Clase I**

2 Ac	CI-01	CI-02	CI-03	CI-04	CI-05	CI-06	CI-07
IgG n=21	3512.2	1854.0	5415.2	3988.5	4442.5	3715.4	4883.4
C1q n=15	10.7	11.5	41.8	12.3	11.8	12.5	24.4
IgG1 n=31	238.4	169.7	530.2	363.7	351.3	276.0	473.8
IgG2 n=4	37.5	28.3	42.5	37.8	22.0	30.0	39.0
IgG3 n=13	70.2	53.5	275.8	144.5	177.9	109.6	220.8
IgG4 n=4	28.0	17.0	57.8	32.8	41.5	28.5	49.3
IgG1+ IgG3 n=13	410.7	394.4	1142.0	700.3	743.2	538.4	973.2
IgG2+ IgG4 n=3	44.0	31.0	82.7	66.0	56.0	61.0	102.7

Clase II

2 Ac	CII-01	CII-02	CII-03	CII-04	CII-05
IgG n=21	2414.4	1014.5	2510.4	1720.9	5273.4
C1q n=15	8.2	9.1	148.6	11.2	1189.4
IgG1 n=31	51.0	48.3	62.5	49.5	49.7
IgG2 n=4	55.8	66.8	83.8	220.3	77.5
IgG3 n=13	30.8	34.2	20.9	67.9	46.7
IgG4 n=4	19.3	11.3	38.8	69.0	156.0
IgG1+ IgG3 n=13	38.1	51.5	30.2	61.6	139.2
IgG2+ IgG4 n=3	42.7	35.0	40.3	37.3	223.3

A continuación se muestran los resultados de 9 sueros en los que realizó la determinación de escrutinio con IgG2 e IgG4 (tabla A3). Estos sueros eran positivos para clase I y/o clase II en el ensayo convencional, pero negativos en los ensayos de detección de anti-IgG1/IgG3 y anti-C1q, los datos se normalizaron según lo descrito anteriormente en Pacientes y Métodos.

Tabla A3: Ensayos de escrutinio con IgG2/IgG4.

n=9	IgG n (%)	IgG2 n (%)	IgG4 n (%)
Clase I	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (22.2)
Clase II	4 (44.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
Clase I+II	5 (55.6)	0 (0.0)	0 (0.0)

Los 2 pacientes en los que se detectaban Ac anti-clase I de isotipo IgG4 no presentaban Ac anti-clase I en el ensayo convencional con anti IgG. Por tanto, no se detectó ningún suero que pudiera catalogarse de verdadero positivo y el ensayo con estos 2º Ac no parecía fiable, por lo que se decidió no continuar con esta parte del estudio.

ANEXO 2

OTRAS PUBLICACIONES DEL DOCTORANDO

- **MF. Torrecillas-Nicolás**, JM. Pascasio-Acevedo, MA Montes-Cano, JM. Sousa-Martín, F. Gavilán-Carrasco, JR. García-Lozano, MA. Gómez-Bravo y MF. González-Escribano. “*Role of IL28B Polymorphisms on the Response to Treatment with Pegylated Interferon Alpha-2a and Ribavirin in HCV Infected Patients after Liver Transplantation*”. Journal of GHR 2016; 5: 1914-1920.
- A. González, F. Moniche, A. Cayuela, J.R. García-Lozano, **F. Torrecillas**, I. Escudero-Martínez, J.R. González-Marcos, A. Mayol y J. Montaner. “*Effect of CYP2C19 polymorphisms on the platelet response to Clopidogrel and influence on the effect on high versus standard dose Clopidogrel in carotid artery stenting*”. Eur J Vasc Endovasc Surg 2016; 51:175-186.
- C. Abad-Molina, J.R. García-Lozano, M.A Montes-Cano, A. Torres-Cornejo, **F. Torrecillas**, J. Aguilar-Reina, M. Romero-Gómez, L.F. López-Cortés, A. Núñez-Roldán y M.F. González-Escribano. “*HAVCR1 gene haplotypes and infection by different viral hepatitis C virus genotypes*”. Clin Vaccine Immunol 2012; 19:223-227.
- M.A. Montes-Cano, J.R. García-Lozano, C. Abad-Molina, **F. Torrecillas**, A. Torres, L.F. López-Cortés, A.

Núñez-Roldán y M.F González-Escribano. Reply: *"Interlekin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes"*. *Hepatology* 2011; 53: 367-368.

ANEXO 3

COMUNICACIONES ORALES A CONGRESOS

- *“Influencia del polimorfismo rs12979860 de IL28B en la respuesta al tratamiento de pacientes con hepatitis C trasplantados de hígado”*. **F. Torrecillas-Nicolás**, J.M. Pascasio, M.A. Montes-Cano, J.M. Sousa, S. Burillo-Sanz, F. Gavilán, M.A. Gómez-Bravo, A. Núñez y M.F. González-Escribano. **XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología**, Salamanca. Mayo 2013.
- *“Influence of the presence of pretransplant anti-angiotensin II type 1 receptor antibodies in the outcome of kidney transplant”*. **M.F Torrecillas-Nicolás**, J.L Caro-Oleas, G. Bernal-Blanco, F.M González-Roncero, M.A Gentil-Govantes, M.F González-Escribano, A. Núñez-Roldán. **XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología**, Badajoz. Mayo 2014.
- *“Influencia de la presencia de anticuerpos anti receptor de angiotensina II tipo 1 antes del trasplante en la evolución del trasplante renal”*. **M.F Torrecillas-Nicolás**, J.L Caro-Oleas, F.M González-Roncero, G. Bernal-Blanco, M.A Gentil-Govantes, M.F González-Escribano, A. Núñez-Roldán. **III Congreso de la Sociedad Española de Trasplante**, Valencia. Junio 2014.

