



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Rechazo mediado por anticuerpos en el trasplante renal, respuesta a diferentes estrategias de tratamiento y factores pronósticos

Gastón Julio Piñeiro

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**RECHAZO MEDIADO POR ANTICUERPOS EN EL TRASPLANTE
RENAL, RESPUESTA A DIFERENTES ESTRATEGIAS DE
TRATAMIENTO Y FACTORES PRONÓSTICOS**

Tesis presentada por:

Gastón Julio Piñeiro

Para obtener el título de doctor por la Universitat de Barcelona

Codirectores: Dr. Jordi Rovira y Dr. Fritz Diekmann

Tutor: Dr. Fritz Diekmann

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional
Barcelona Diciembre de 2020

Los Doctores Jordi Rovira y Fritz Diekmann, directores de tesis, prestan el consentimiento para la presentación de la tesis doctoral del doctorando Gastón Julio Piñeiro.



Jordi Rovira

Co-director



Fritz Diekmann

Co-director y Tutor



Gastón Julio Piñeiro

Doctorando

A mi familia, con quienes comparto la felicidad de esta vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fritz Diekmann, por su confianza durante todos estos años, su actitud siempre abierta a nuevas propuestas ha sido fundamental para el desarrollo de esta tesis. Su apoyo y consejo me han hecho crecer científicamente más de lo que hubiera creído posible.

Al Dr. Jordi Rovira, por creer en mí, sin su apoyo e impulso esta tesis no sería posible. Agradezco sinceramente todo lo que me ha enseñado, su paciencia infinita, su capacidad de trabajo, su meticuloso arte científico y su amistad.

Al Dr. Josep M. Campistol, tutor inicial de esta tesis, por estar siempre listo a dar su apoyo y consejo, los cuales también han sido fundamentales.

A la Dra. Nuria Esforzado, de quien aprendo cada vez que hablamos, su ciencia y conocimientos son base de esta tesis.

A todos los integrantes del Laboratorio Experimental de Nefrología y Trasplante Renal (LENIT), quienes me abrieron las puertas desde el primer momento y me enseñaron con paciencia y compromiso. En especial a Marta Lazo, su conocimiento y pasión por su trabajo fueron imprescindibles para este proyecto.

Al Dr. Lozano y el Dr. Cid, por estar siempre abiertos a nuevos desafíos y compartir su saber de forma desinteresada, su constante apoyo a esta investigación ha sido esencial.

A José Ríos, por su rigurosidad, curiosidad científica y su increíble capacidad de estirar el “espacio-tiempo”. Por los buenos momentos y la amistad.

Al Dr. Esteban Poch, Cap del Servei de Nefrologia i Trasplantament, mi tutor desde la residencia. Por su apoyo, confianza y estímulo constante durante todos estos años. Ha sido fundamental para mi desarrollo como profesional.

A la Dra. Beatriu Bayes y al Dr. Federico Oppenheimer, por su apoyo y confianza desde el primer momento.

Al resto de mis compañeros, quienes me han apoyado para la realización de esta tesis, especialmente al Dr. Ventura, el Dr. Cucchiari, el Dr. Montagud, el Dr. Blasco y el Dr. Quintana.

A Laura, mi esposa, la parte más innovadora de esta tesis se la debo a ella. Su apoyo, estímulo y cariño han sido imprescindibles para conseguir esta tesis.

A mis hijos, Santiago y Matías por su paciencia y por las horas de juego perdidas.

A mi Madre, mi Padre, Hermano y Abuela, quienes siempre me han apoyado en todo y a los que nunca podre agradecer lo suficiente el haberme enseñado a ser feliz.

Financiación

La presente tesis ha sido financiada parcialmente con aportes del Premi Fi de Residencia Emili Letang, Hospital Clínic 2016-2017.



ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	1
Introducción	7
1. Enfermedad renal crónica	9
1.1. Clasificación de la ERC	9
1.2. Epidemiología e impacto de la ERC en el sistema sanitario	11
2. Trasplante Renal	13
2.1. Impacto del trasplante renal en el paciente con ERC terminal	14
2.2. Inmunología del trasplante renal	19
3. Clasificación del rechazo renal	22
3.1. Rechazo celular mediado por células T	24
3.2. Rechazo mediado por anticuerpos	25
3.2.1. Rechazo hiper agudo	27
3.2.2. Rechazo activo mediado por anticuerpos	28
3.2.3. Rechazo crónico mediado por anticuerpos	28
4. Rechazo mediado por anticuerpos en el trasplante hepatorenal simultaneo	29
5. Tratamiento del AMBR	31
5.1 Recambios plasmáticos + IVIG	32
5.2 Rituximab (anti-CD20)	34
5.3 Bortezomib (inhibidor del proteosoma)	39
5.4 inhibidores del complemento	40
5.5 Bloqueo de la Interleuquina 6	43
6. Nuevas estrategias posibles en el manejo del rechazo mediado por anticuerpos	
6.1. IdeS	43
6.2. Fotoaféresis extracorpórea	44

Justificación	49
Hipótesis de trabajo	51
Objetivos	55
Objetivo 1	
1. Justificación del objetivo	57
2. Material y Métodos	58
3. Resultados	61
4. Comunicaciones surgidas de este Objetivo	71
5. Conclusión	72
Objetivo 2	
1. Justificación del objetivo	73
2. Material y Métodos	74
3. Resultados	77
4. Comunicaciones surgidas de este Objetivo	78
5. Conclusión	78
📖 Artículo 1: Rituximab, plasma exchange and immunoglobulins: an ineffective treatment for chronic active antibody-mediated rejection. BMC Nephrol 19, 261 (2018). https://doi.org/10.1186/s12882-018-1057-4	
Objetivo 3	
1. Justificación del objetivo	89
2. Material y Métodos	90
3. Resultados	93
4. Comunicaciones surgidas de este Objetivo	94
5. Conclusión	94
📖 Artículo 2: Kidney Graft Outcomes in High Immunological Risk Simultaneous Liver-Kidney Transplants. Liver Transpl. 2020 Apr;26(4):517-527. doi: 10.1002/lt.25726. PMID: 32011089.	
Objetivo 4	
1. Justificación del objetivo	106
2. Material y Métodos	108
3. Resultados	116
4. Comunicaciones surgidas de este Objetivo	125
5. Conclusión	125
Discusión	128
Conclusiones generales	145

Líneas de investigación de futuro	148
Bibliografía	151

LISTA DE ABREVIATURAS

8-MOP: metoxaleno

aABMR: Rechazo activo mediado por anticuerpos

ABMR: Rechazo mediado por anticuerpos

ABOi: ABO incompatible

APC: célula presentadora de antígenos

ATG: globulina anti-timocitos

C1-INH: Inhibidor de C1

caABMR: Rechazo crónico activo mediado por anticuerpos

cABMR: Rechazo crónico mediado por anticuerpos

CDC-CM: crossmatch por citotoxicidad

CF-CM: crossmatch por citometría de flujo

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

DP: Diálisis peritoneal

EEUU: Estados Unidos de Norteamérica

EICH: Enfermedad injerto contra huésped

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

ERC: enfermedad renal crónica

FDA: Food and Drug Administration of United States of America

FG: Filtrado glomerular

FGe: Filtrado glomerular estimado

FR: función renal

GT: Glomerulopatía del trasplante

HD: Hemodiálisis

HLA: Antígeno leucocitario humano

HR: Hazard ratios

HTA: Hipertensión arterial

IA: Inmunoadsorción

ICC: Índice de comorbilidades de Charlson

ICN: Inhibidor de la calcineurina

IFN γ : Interferón gamma

IL-2: Interleuquina 2

IL-10: Interleuquina 10

ImTOR: Inhibidor de mammalian Target of Rapamycin

ICN: Inhibidores de la calcineurina

K/DOQI: Kidney Disease Outcome Quality Initiative

MAT: Microangiopatía trombótica

MFI: Intensidad de fluorescencia media

MVI: Inflamación microvascular

NTA: Necrosis tubular aguda

OR: Odds ratios

pmh: Por millón de habitantes

RP: Recambio plasmático

RTX: Rituximab

RTX: Rituximab

SOC: Standard of care

T helper (Th): Linfocito T helper

TAC: Tacrolimus

TCMR: Rechazo mediado por células T

TFG- β 1: Factor de crecimiento transformante beta

TNF: Factor de necrosis tumoral

TR: Trasplante renal

TSR: Terapia sustitutiva renal

UPCR: Cociente proteína/creatinina en orina

UVA: Radiación ultravioleta A

Tesis en formato de artículos

La tesis consta de de 4 objetivos de los que se desprenden dos artículos publicados en revistas científicas y 2 trabajos que todavía no publicados.

Objetivo 2:

Artículo 1 Factor de impacto: 2,088, Cuartil: 3

Gastón J Piñeiro, Erika De Sousa-Amorim, Manel Solé, José Ríos, Miguel Lozano, Frederic Cofán, Pedro Ventura-Aguiar, David Cucchiari, Ignacio Revuelta, Joan Cid, Eduard Palou, Josep M Campistol, Federico Oppenheimer, Jordi Rovira & Fritz Diekmann. **Rituximab, plasma exchange and immunoglobulins: an ineffective treatment for chronic active antibody-mediated rejection.** *BMC Nephrol* 19, 261 (2018).
<https://doi.org/10.1186/s12882-018-1057-4>

Objetivo 3:

Artículo 2: Factor de impacto: 4,57, Cuartil: 1

Piñeiro GJ, Rovira J, Montagud-Marrahí E, Torregrosa JV, Ríos J, Cucchiari D, Ugalde-Altamirano J, Ventura-Aguiar P, Gelpi R, Palou E, Colmenero J, Navasa M, Diekmann F, Esforzado N. **Kidney Graft Outcomes in High Immunological Risk Simultaneous Liver-Kidney Transplants.** *Liver Transpl.* 2020 Apr;26(4):517-527. doi: 10.1002/lt.25726. PMID: 32011089.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad renal crónica

La enfermedad renal crónica (ERC) es un término que engloba múltiples patologías que se caracterizan por un deterioro irreversible de la función renal. En la publicación de las guías K/DOQI (Kidney Disease Outcome Quality Initiative) por parte de la National Kidney Foundation en el año 2002, se propuso por primera vez una clasificación basada en estadios de severidad definidos por el filtrado glomerular.(1) Desde entonces, múltiples guías clínicas(2,3) han confirmado la definición de ERC como la presencia, durante al menos tres meses, de alguna de las siguientes situaciones:

- Filtrado glomerular (FG) inferior a 60 ml/min/1,73 m²
- Lesión renal: presencia de anomalías estructurales o funcionales del riñón, que puedan provocar potencialmente un descenso del FG, con implicaciones para la salud.

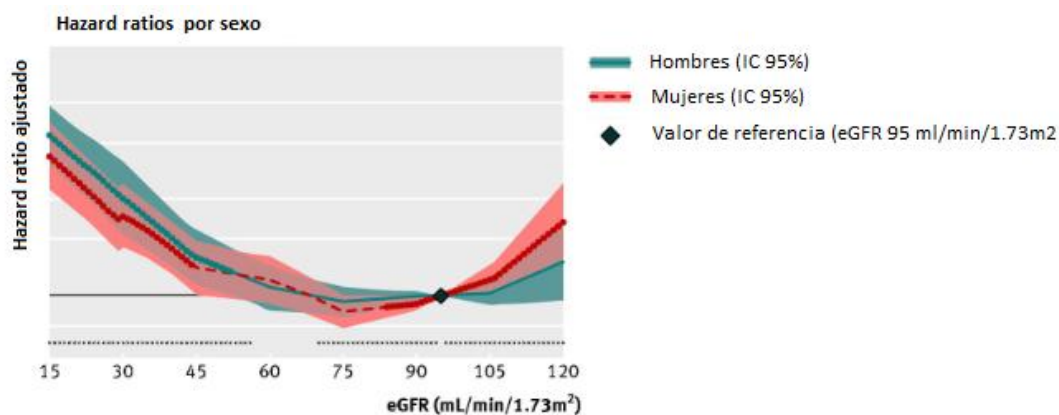
El FG, a pesar de sus limitaciones, es aceptado como el mejor parámetro para evaluar de la función renal, y su disminución se correlaciona con el aumento de la mortalidad por causa cardiovascular y general. Esto, queda reflejado en un amplio metanálisis del año 2013 que evaluó la relación de mortalidad con el filtrado glomerular y la albuminuria en más de 2 millones de participantes, de 46 cohortes de Europa, América, Asia y Australia. Ambos sexos presentaron un mayor riesgo de mortalidad por todas las causas y mortalidad cardiovascular, a medida que desciende el filtrado y se incrementa la albuminuria (Figura 1).(4) Es por ello que la ERC constituye un marcador de mal pronóstico en cualquier contexto clínico y se asocia a peores resultados en múltiples scores pronósticos.(2,4–7)

1.1 Clasificación de la ERC

El consorcio KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) publicó en 2013 una guía internacional sobre ERC donde clasifica a la ERC teniendo en cuenta el grado de disminución del filtrado glomerular y la

presencia creciente de albuminuria (Figura 2). Este sistema permite la clasificación pronóstica del paciente con ERC en riesgo moderado, alto o muy alto de presentar cinco eventos negativos (mortalidad global, mortalidad cardiovascular, fracaso renal tratado con diálisis o trasplante, fracaso renal agudo y progresión de la enfermedad renal), con respecto al riesgo de referencia de sujetos sin criterios analíticos de ERC.(2)

Figura 1. Mortalidad por filtrado glomerular estimado (eFGR)



* Modificado: Nitsch D, et al. Associations of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with mortality and renal failure by sex. A meta-analysis. *BMJ*. 2013; 346(7895):1-14. doi:10.1136/bmj.f324.

Figura 2. Categorías de ERC según KDIGO 2012

KDIGO 2012			Albuminuria		
			Categorías, descripción y rangos		
Filtrado glomerular Categorías, descripción y rangos (ml/min/1,73 m ²)			A1	A2	A3
			Normal a ligeramente elevada	Moderadamente elevada	Gravemente elevada
			< 30 mg/g ³	30-300 mg/g ³	> 300 mg/g ³
G1	Normal o elevado	≥ 90			
G2	Ligeramente disminuido	60-89			
G3a	Ligera a moderadamente disminuido	45-59			
G3b	Moderada a gravemente disminuido	30-44			
G4	Gravemente disminuido	15-29			
G5	Fallo renal	< 15			

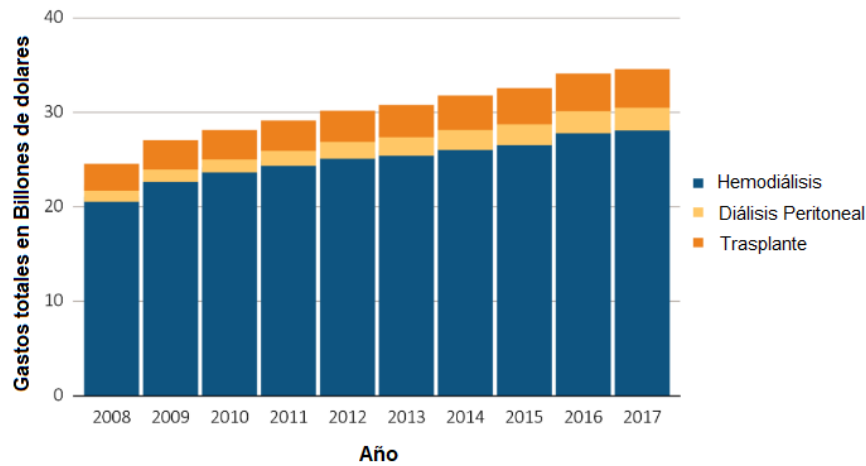
* Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, et al. Documento de la sociedad española de nefrología sobre las guías KDIGO para la evaluación y el tratamiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrología*. 2014;34(3):302-316.

1.2 Epidemiología e impacto de la ERC en el sistema sanitario

Aunque las causas de ERC son múltiples, y en ocasiones concomitantes en un mismo paciente, los registros confirman a la diabetes y la hipertensión arterial (HTA) como las causas más relevantes.(8–11)

En el reporte de 2019 del registro de Estados Unidos de Norteamérica, la diabetes representa la causa principal en el 30–50% de todos los pacientes con ERC, mientras que en Europa el registro anual ERA-EDTA 2017 reporta a la diabetes y la HTA como las causas de ERC en el 37% de los pacientes incidentes en terapia renal sustitutiva (TRS). Se espera que para el año 2030 la prevalencia de diabetes aumente en un 69% en los países de ingresos altos y en un 20% en los países de ingresos bajos y medios, así como un aumento global del 60% de la prevalencia de hipertensión para 2025.(8) Todo lo comentado, en conjunto con el envejecimiento poblacional, hace esperar una incidencia y prevalencia creciente de la ERC. Esto, se confirma en los datos recientes de registros europeos, norteamericanos, españoles y catalanes. (10,12,13) En España la prevalencia en 2017 era de 1191 por millón de habitantes (pmh) y mostro un crecimiento hasta 1322 pmh en datos del Registro Español de Enfermos Renales 2018. El crecimiento se ve especialmente en el segmento de pacientes mayores de 65 años. (10,12) La ERC constituye un problema sanitario importante con un coste económico elevado. En 2017 en España aproximadamente 4 millones de personas padecían ERC. De ellas, unas 50.000 estaban en tratamiento renal sustitutivo, la mitad en diálisis y el resto con un trasplante renal funcional.(12) Estos pacientes, en una gran parte, son pluripatológicos y complejos de manejar para el sistema sanitario. Se estima que la TRS consume en España entre el 2,5% y 3% del presupuesto del Sistema Nacional de Salud.(14,15) En EEUU, los datos del reporte 2019 del US Renal Data System confirman un aumento del gasto entre los períodos 2016-2017 del 1,3% para hemodiálisis (HD), del 3% para diálisis peritoneal (DP), y un 3,8% en el TR (Figura 3).(8)

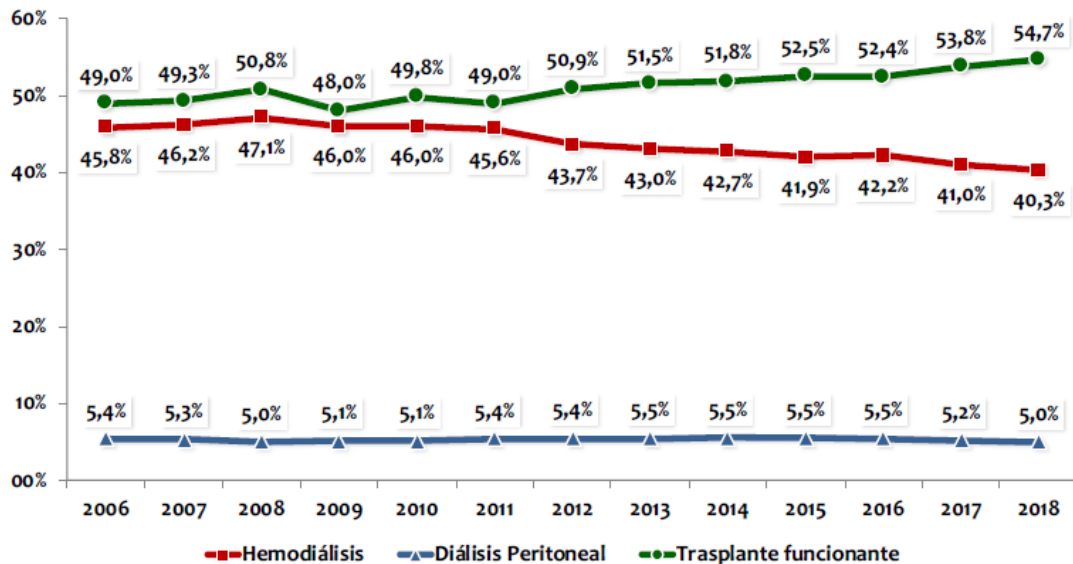
Figura 3: Gastos totales en billones de dólares por año, según las distintas modalidades de terapia renal sustitutiva, en Estados Unidos de Norteamérica



* Adaptado de: Saran R, Robinson B, Abbott KC, et al. US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2020;75(1):A6-A7. doi:10.1053/j.ajkd.2019.09.003

Respecto a la modalidad de TRS en España, en 2018 el 54,7% de los pacientes estaban trasplantados, la HD representaba el 40,3% y la DP se mantenía alrededor del 5 % (Figura 4).(10)

Figura 4: Prevalencia de la modalidad de terapia renal sustitutiva en España



* Sociedad Española de Nefrología (SEN), Registro Español de Enfermos Renales de las Comunidades autónomas, Organización nacional de trasplantes (ONT) R español de enfermos renales. Informe de diálisis y Trasplantes 2018 (datos preliminares). *Inf 2018 Congr la Soc Española Nefrol (SEN), 2019.* 2019;2018.

La prevalencia del trasplante sigue una línea ascendente desde 2011 con un descenso de la HD, y mantenimiento del la DP en torno al 5%.

La ERC en su fase terminal (pacientes que requieren un tratamiento renal sustitutivo), tiene un alto impacto en la calidad de vida, en la supervivencia y en el gasto económico.

2. Trasplante Renal

El trasplante renal, como terapia renal sustitutiva, ha tenido que superar tres problemas críticos para llegar a ser una opción terapéutica viable:

1.- La correcta sutura vascular que permitió la anastomosis del injerto. Este hito fue conseguido por primera vez en 1912 cuando el Dr. Alexis Carrel perfeccionó la técnica de anastomosis vascular.

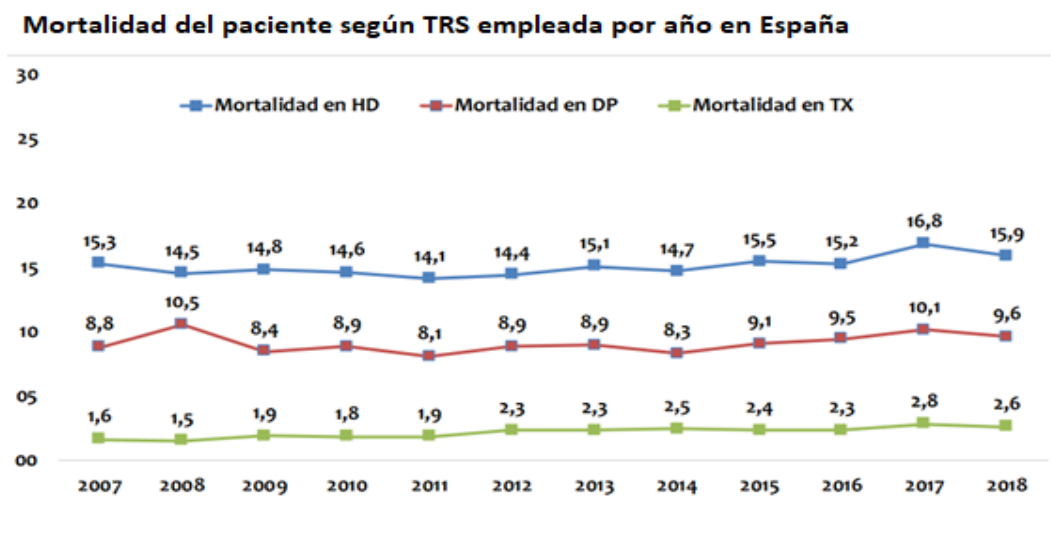
2.- La correcta selección y asignación del donante al receptor. En la superación de este reto han sido fundamentales dos circunstancias; la primera, el trabajo del Dr. Paul I. Terasaki en el estudio de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y su reconocimiento como parte necesaria en el proceso de tolerancia y alorrespuesta inmune. Su trabajo llevó al desarrollo de la prueba cruzada de linfocitotoxicidad y posteriormente al desarrollo de la técnica de antígeno aislado, con micro esferas cubiertas de antígenos HLA, para detectar anticuerpos anti-HLA mediante tecnología Luminex®. La segunda circunstancia, ha sido el establecimiento de adecuados sistemas de procuración y asignación de órganos regionales, nacionales e internacionales.

3.- Lograr un adecuado control de la alorrespuesta inmune con una inmunosupresión con efectos adversos asumibles. En la década de 1960 se inicio la inmunosupresión basada en corticoides y azatioprina y posteriormente se han añadido otros inmunosupresores como los inhibidores de la calcineurina (ICN), el micofenolato, los inhibidores de mTOR (ImTOR) y anticuerpos poli y monoclonales contra linfocitos o alguno de sus receptores (timoglobulina, ATG, Basiliximab).

2.1 Impacto del trasplante renal en el paciente con ERC terminal

En los últimos años se ha producido una significativa mejoría en la supervivencia de los pacientes que permanecen en diálisis. El reporte del registro enfermedad renal de EEUU en 2019 muestra una disminución en la tasa de mortalidad ajustada entre 2001 y 2017, del 28% para los pacientes en diálisis (27% en hemodiálisis y 42% en diálisis peritoneal).(8) Sin embargo, a pesar de dicha mejoría, la mortalidad en el TR se mantiene históricamente muy por debajo respecto a la diálisis, tanto en registros nacionales como internacionales (Figura 5 y 6). Y esta menor mortalidad relativa del TR se mantiene en todos los grupos etarios (Figura 7).(10)

Figura 5: Porcentaje de mortalidad por año según TRS en España



* Adaptado de: Sociedad Española de Nefrología (SEN), Registro Español de Enfermos Renales de las Comunidades autónomas, Organización nacional de trasplantes (ONT) R español de enfermos renales. Informe de diálisis y Trasplantes 2018

Figura 6. Sobrevida ajustada del paciente según técnica de diálisis y receptores de primer TR según donante (Europa).

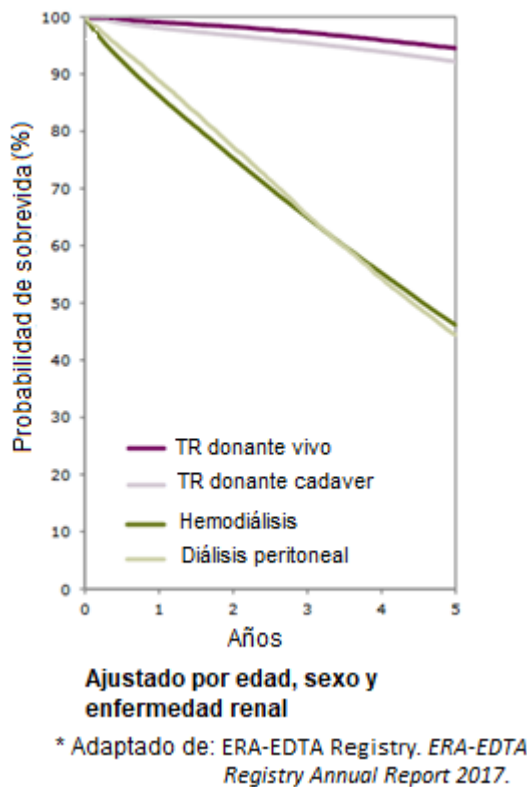
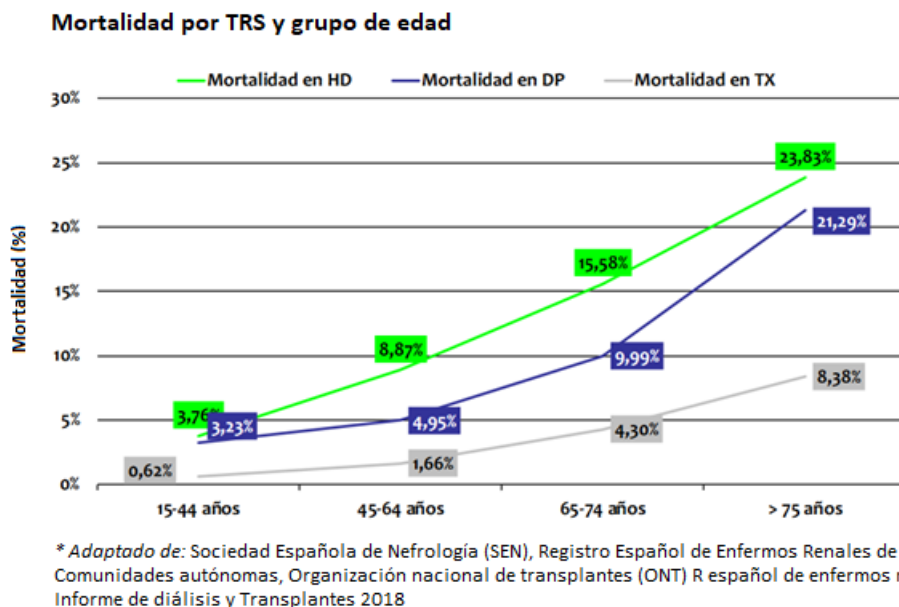


Figura 7: Mortalidad según modalidad de TRS y grupo etario en España

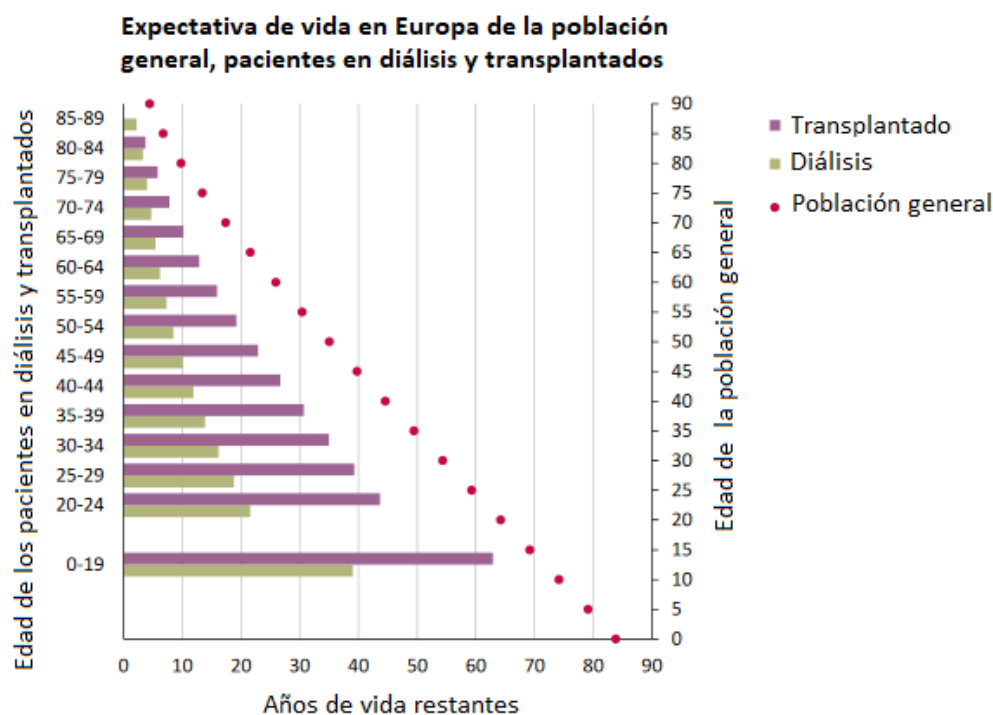


Por otro lado, desde el punto de vista económico, el TR es la TRS más costo-efectiva, aún en diferentes sistemas sanitarios. Datos del registro americano de 2017 evidencian un costo por paciente trasplantado y año de 35.817\$, frente a

78.159\$ de la DP y 91.795\$ de la HD. En España con datos publicados en 2010 se estimaba un costo promedio por paciente y año de 46.659€ en HD, 32.432€ en DP frente a los 46.659 € durante el primer año de trasplante y 6.477€ en los siguientes años.

Por todo lo dicho, el TR continúa siendo la mejor opción terapéutica para sustituir la función del riñón nativo. Sin embargo, a pesar del beneficio de supervivencia conferido por el trasplante, la mortalidad de los pacientes continúa siendo significativamente mayor comparada con la población general. La figura 8 muestra la expectativa de vida en Europa de la población general, los pacientes en diálisis y trasplantados(16). Las principales causas de mortalidad son las complicaciones cardiovasculares y neoplasias asociadas a la inmunosupresión.(17–19)

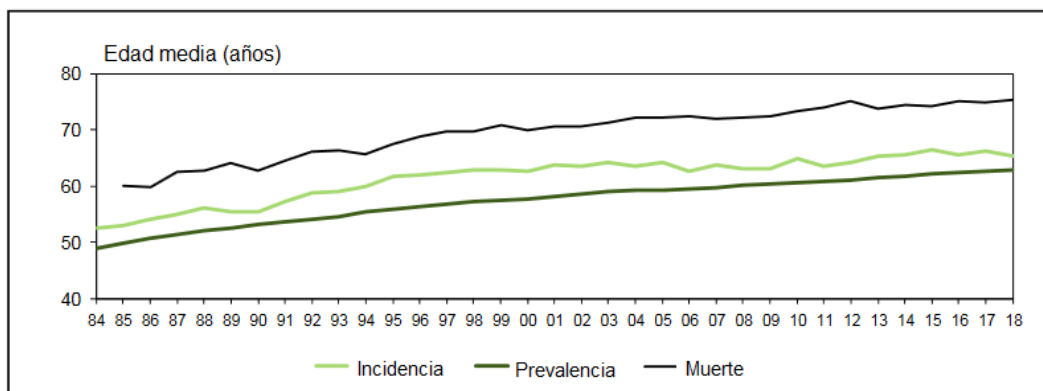
Figura 8: Expectativa de vida en Europa de la población general, pacientes en diálisis y trasplantados.



* Adaptado de: ERA-EDTA Registry. *ERA-EDTA Registry Annual Report 2017*; 2019.

Para finalizar esta sección, se debe destacar que de la mano de la mayor sobrevivencia de la población general, también se ha producido un envejecimiento de los pacientes en TRS. Esto produce un aumento continuo de la edad de los enfermos en el momento de recibir un trasplante. La evolución de este indicador puede observarse en la Figura 10.(13)

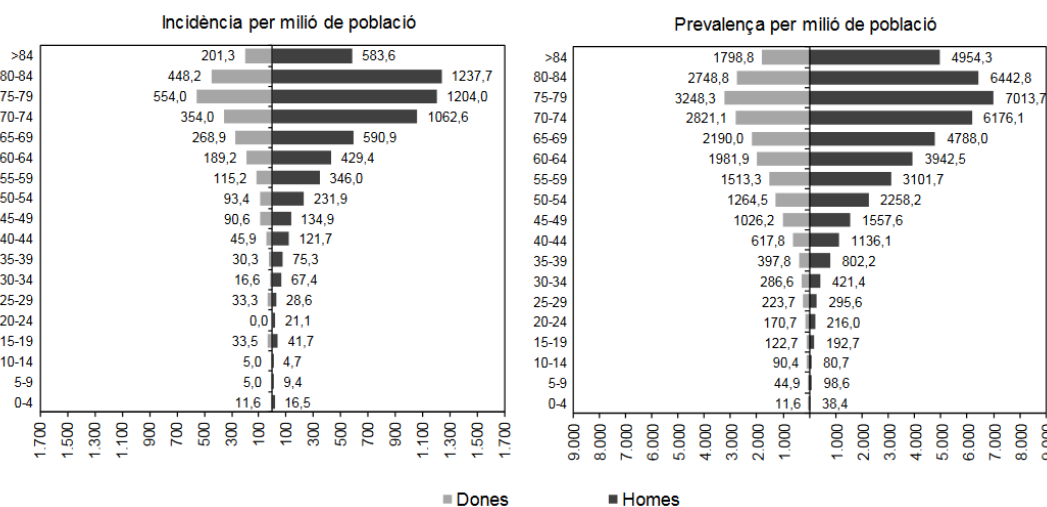
Figura 10: Evolución de la edad media al inicio del TRS en Catalunya. Período 1984-2018



* Adaptada de: Informe estadístic del Registre de Malalts Renals de Catalunya Any 2018. Volum 34.

Actualmente, en Catalunya la mayoría de los pacientes incidentes y prevalentes, que reciben o portan un trasplante renal, son mayores de 65 años, Figura 11.

Figura 11: Incidencia y prevalencia por edad de los pacientes trasplantados en Catalunya

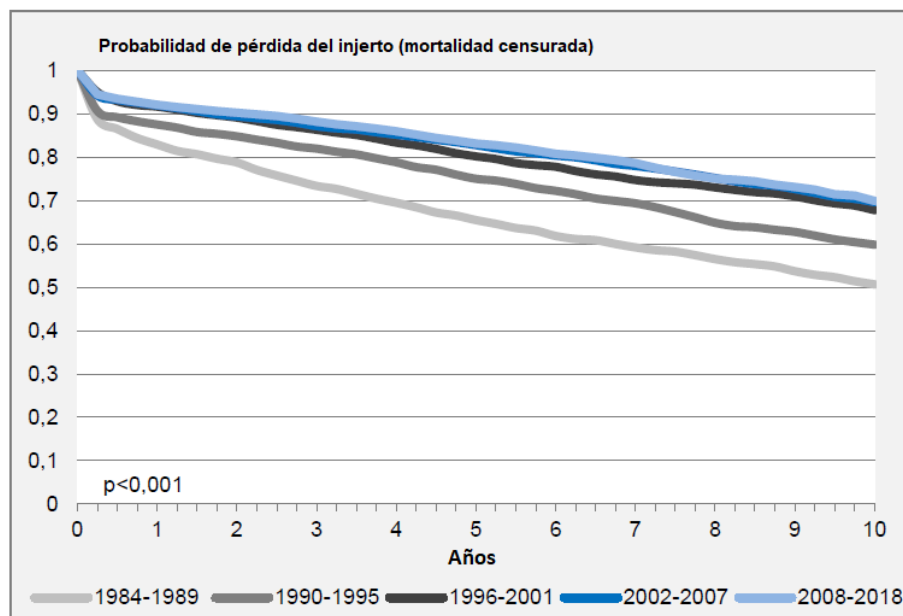


* Adaptada de: Informe estadístic del Registre de Malalts Renals de Catalunya Any 2018. Volum 34.

Tener en cuenta este contexto de donantes y receptores envejecidos es fundamental para entender los nuevos desafíos a los que se enfrenta el trasplante renal.

Respecto a la sobrevida del injerto, se constata una ausencia de mejoría durante los últimos 15-20 años. Esto, se demuestra en el registro Catalán de trasplante renal. La Figura 9 muestra la sobrevida del injerto con censura de la mortalidad en distintos períodos en Catalunya, evidenciando la ausencia de mejoría desde el período 1996-2001. (20)

Figura 9: sobrevida del injerto renal, con censura de la mortalidad, por períodos temporales en Catalunya



* Adaptado: Activitat de donació i trasplantament d'òrgans a Catalunya. Any 2019. Volum 17. Organització Catalana de Trasplantaments.

El daño inmunológico crónico es la causa más importante de pérdida del injerto renal. Sin embargo, su prevención y tratamiento, mediante la utilización de inmunosupresores, genera efectos secundarios como el aumento de infecciones, del riesgo cardiovascular y neoplásico, impactando negativamente en la sobrevida del paciente.(21,22)

Además, el deterioro de la función renal y la inflamación microvascular del injerto renal, inducida por la alorrespuesta inmune, han sido asociados como factores independientes de riesgo cardiovascular.(23–25)

2.2 Inmunología del trasplante renal

Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)

Los antígenos leucocitarios humanos (HLA, acrónimo en inglés) son un grupo de glicoproteínas de superficie de membrana, cuya función es el reconocimiento inmune de las células propias y la presentación de antígenos foráneos a los linfocitos T, permitiendo el inicio de la respuesta inmune. Los HLA se diferencian en dos tipos, los de clase I (A, B y C) y los de clase II (DR, DP y DQ). Los antígenos de clase I están presentes en todas las células nucleadas, mientras que los de clase II se encuentran mayormente en células presentadoras de antígeno (linfocitos B, macrófagos y células dendríticas). Los HLA de clase I presentan los péptidos antigénicos procesados a los linfocitos T CD8, mientras que los de clase II a los linfocitos T CD4.

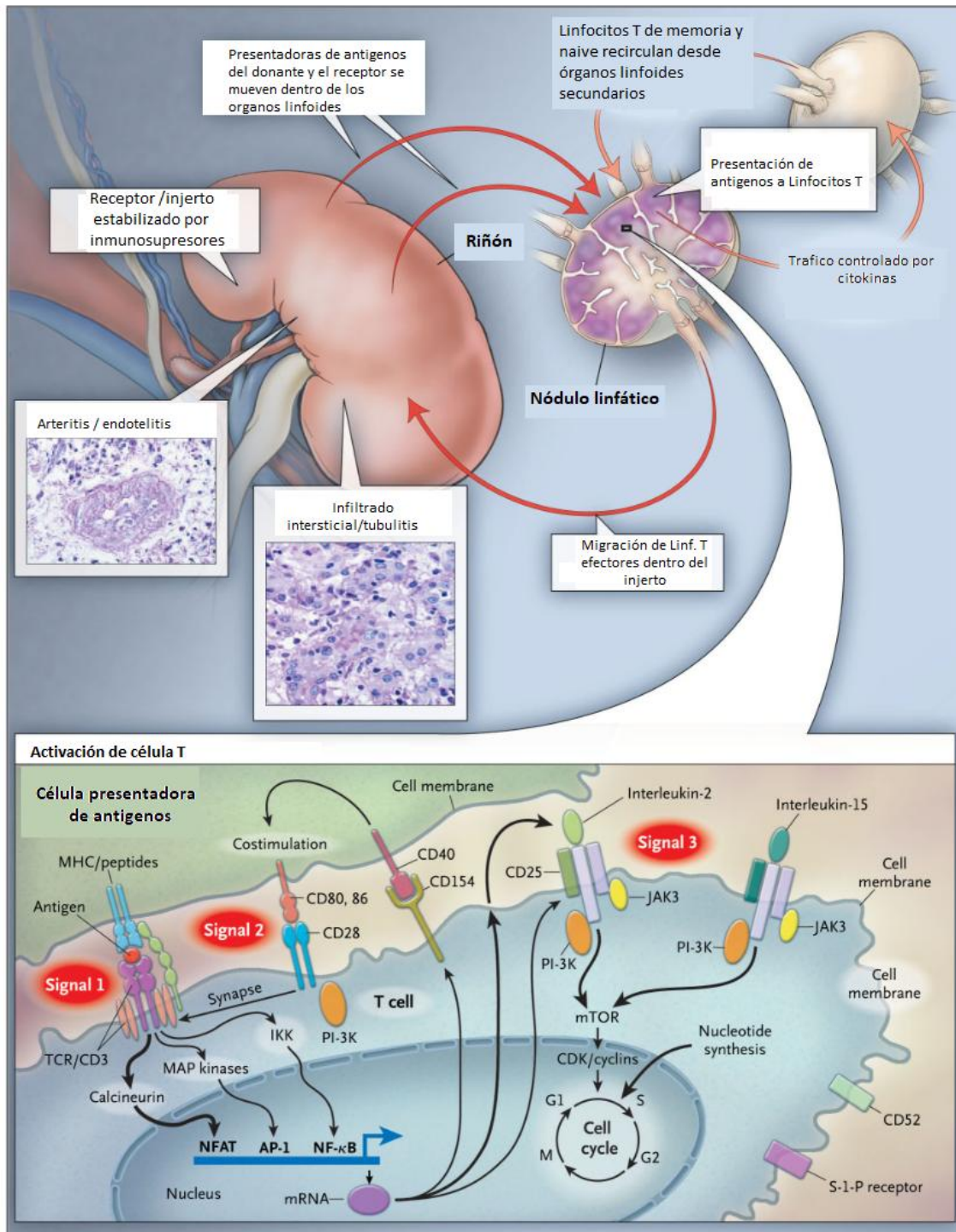
Aunque tradicionalmente se ha utiliza el sistema HLA para establecer el grado de compatibilidad entre donante y receptor, más recientemente se ha postulado que los antígenos verdaderamente inmunogénicos son los residuos polimórficos de aminoácidos en la superficie del HLA, los denominados eplets, siendo estos los epítomos reconocidos por los anticuerpos anti-HLA. (26–28)

La figura 12 resume los principales eventos involucrados en la alorrespuesta del trasplante renal.(29)

Una vez anastomosado el injerto renal, las células presentadoras de antígenos (APC) del donante son capaces de activar linfocitos (vía directa). Esta vía parece ser más importante en las etapas iniciales del trasplante.(30) Posteriormente, las APC del receptor adquieren y procesan los aloantígenos del donante ensamblándolos junto con las moléculas del CMH del receptor en la superficie celular para su presentación a los linfocitos T del receptor, que los reconoce mediante su receptor de células T. Las APC migran a los órganos linfoides secundarios, donde interactúan con células T *naïve* y células T de memoria central, produciendo su activación. Por otro lado, las células T de

memoria, ya sensibilizadas previamente contra antígenos del donante, pueden ser activadas directamente por células del endotelio del injerto.

Figura 12: alorrespuesta en el trasplante renal



* Adaptado de: Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351(6):2715-2729. doi:10.1097/01.ju.0000161309.14422.01

Para que la presentación de los antígenos del donante produzca una respuesta inmune eficaz, se requiere la acción concomitante de 3 señales (Figura 12). La primera señal es la activación de la célula T a través del complejo de receptor CD3. La segunda, es la señal de coestimulación, proporcionada también por las células presentadoras a través de los antígenos de superficie CD80 y CD86, que se acoplan a CD28 en la superficie de las células T. Estas dos señales activan tres vías de transducción: la vía calcio-calcineurina, la vía RAS activada por mitógenos (MAP) quinasa y la vía del factor nuclear- κ B. Estas señales activan factores de transcripción que desencadenan la expresión de interleuquina-2 (IL-2), CD154 y CD25. A su vez la IL-2 y otras citoquinas activan la vía mTOR, que constituye la tercera señal, que desencadena la proliferación celular alorreactiva. Esta última produce una gran cantidad de células T efectoras, que migran e infiltran el injerto, produciendo una respuesta inflamatoria que lleva al rechazo, con su consecuente disfunción orgánica. Además estas células T, en folículos linfoides, o en sitios extra foliculares como el bazo, presentan el antígeno a los linfocitos B activándolos.

Los linfocitos B activados se diferencian en células plasmáticas, las cuales producen autoanticuerpos contra los antígenos HLA del donante que se dirigen contra el endotelio del injerto y producen lesión por activación del complemento, activación de células Natural Killer (NK) y monocitos, los cuales secretan sustancias inflamatorias (IL-6, IL-1 y TNF), incrementando aún más la reacción inflamatoria.(29)

Según las condiciones locales y sistémicas del injerto y del receptor, la respuesta autoinmunitaria producirá un tipo predominante de respuesta T_{helper} CD4⁺. Si predomina la respuesta Th1 y Th17, caracterizadas por la secreción de interferón gamma (IFN γ) e IL-17 respectivamente, esto favorecerá la respuesta celular citotóxica. Si la respuesta Th2 es la predominante, definida por la secreción principalmente de IL-4, facilitará el rechazo humoral por anticuerpos donante-específico (DSA).(31)

3. Clasificación del rechazo renal

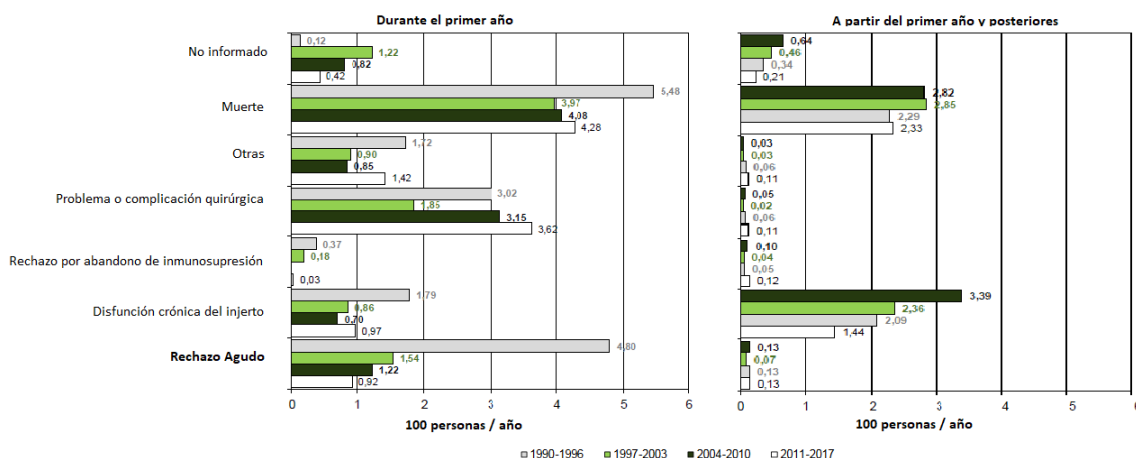
La clasificación de rechazo del injerto renal ha ido refinándose con el aumento en el conocimiento y de las técnicas disponibles para el diagnóstico.

Desde 1991 la clasificación de la Banff Foundation for Allograft Pathology, ha ido actualizando sus criterios con reuniones bianuales.(32) La última actualización es de 2019 y se resume en la Tabla 1.(33)

El rechazo se puede clasificar por sus hallazgos histológicos y su fisiopatogenia predominante en rechazo mediado por células T y en mediado por anticuerpos. A su vez en ambas categorías se pueden encontrar una forma aguda y otra crónica.

Actualmente se ha logrado un control medianamente adecuado de los episodios de rechazo agudo, siendo el daño aloimmune crónico, especialmente el mediado por anticuerpos, el desafío a superar para lograr una mayor supervivencia del injerto. Esto queda evidenciado en el reporte del Registro de Malalts Renals de Catalunya de 2018. En la Figura 13, en los distintos períodos temporales, se evidencia el peso decreciente del rechazo agudo como causa de pérdida del injerto renal durante el primer y posteriores años del trasplante.(13)

Figura 13: Evaluación por períodos temporales de las causas de pérdida de injerto renal en el primer año y posteriormente al primer año, registro catalán de trasplante



* Adaptado de: Organització Catalana de Trasplantaments (OCATT). Registre de malalts renals de Catalunya, informe estadístic 2018. Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, abril de 2020. Published online 2018.

Tabla1: Clasificación de Banff 2019

Actualizaciones de la clasificación de Banff 2019.
Todas las actualizaciones en negrita (ABMR, cambios Bordeline, TCMR y nefropatía por poliomavirus)

Category 1: Normal biopsy or nonspecific changes	C4d staining without evidence of rejection; all 4 features must be present for diagnosis ^c
Category 2: Antibody-mediated changes	
Active ABMR; all 3 criteria must be met for diagnosis	1. Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections)
1. Histologic evidence of acute tissue injury, including 1 or more of the following:	2. Criterion 1 for active or chronic active ABMR not met
<ul style="list-style-type: none"> Microvascular inflammation ($g > 0$ and/or $ptc > 0$), in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis, although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, $ptc \geq 1$ alone is not sufficient and g must be ≥ 1 Intimal or transmural arteritis ($v > 0$)^b Acute thrombotic microangiopathy, in the absence of any other cause Acute tubular injury, in the absence of any other apparent cause 	3. No molecular evidence for ABMR as in criterion 2 for active and chronic active ABMR
2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including 1 or more of the following:	4. No acute or chronic active TCMR, or borderline changes
<ul style="list-style-type: none"> Linear C4d staining in peritubular capillaries or medullary vasa recta (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections) At least moderate microvascular inflammation ($[g + ptc] \geq 2$) in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis, although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, $ptc \geq 2$ alone is not sufficient and g must be ≥ 1 Increased expression of gene transcripts/classifiers in the biopsy tissue strongly associated with ABMR, if thoroughly validated 	Category 3: Borderline (Suspicious) for acute TCMR
3. Serologic evidence of circulating donor-specific antibodies (DSA to HLA or other antigens). C4d staining or expression of validated transcripts/classifiers as noted above in criterion 2 may substitute for DSA; however thorough DSA testing, including testing for non-HLA antibodies if HLA antibody testing is negative, is strongly advised whenever criteria 1 and 2 are met	Foci of tubulitis (t1, t2, or t3) with mild interstitial inflammation (i1), or mild (t1) tubulitis with moderate-severe interstitial inflammation (i2 or i3)
Chronic active ABMR; all 3 criteria must be met for diagnosis	No intimal or transmural arteritis ($v = 0$)
1. Morphologic evidence of chronic tissue injury, including 1 or more of the following:	Category 4: TCMR
Transplant glomerulopathy ($cg > 0$) if no evidence of chronic TMA or chronic recurrent/de novo glomerulonephritis; includes changes evident by electron microscopy (EM) alone ($cg1a$)	Acute TCMR
Severe peritubular capillary basement membrane multilayering ($ptcml1$; requires EM)	Grade IA: Interstitial inflammation involving >25% of non-sclerotic cortical parenchyma (i2 or i3) with moderate tubulitis (t2) involving 1 or more tubules, not including tubules that are severely atrophic ^d
Arterial intimal fibrosis of new onset, excluding other causes; leukocytes within the sclerotic intima favor chronic ABMR if there is no prior history of TCMR, but are not required	Grade IB: Interstitial inflammation involving >25% of non-sclerotic cortical parenchyma (i2 or i3) with severe tubulitis (t3) involving 1 or more tubules, not including tubules that are severely atrophic ^d
2. Identical to criterion 2 for active ABMR, above	Grade IIA: Mild to moderate intimal arteritis (v1), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis
3. Identical to criterion 3 for active ABMR, above, including strong recommendation for DSA testing whenever criteria 1 and 2 are met. Biopsies meeting criterion 1 but not criterion 2 with current or prior evidence of DSA (posttransplant) may be stated as showing chronic ABMR, however remote DSA should not be considered for diagnosis of chronic active or active ABMR	Grade IIB: Severe intimal arteritis (v2), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis
Chronic (inactive) ABMR	Grade III: Transmural arteritis and/or arterial fibrinoid necrosis involving medial smooth muscle with accompanying mononuclear cell intimal arteritis (v3), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis
1. $cg > 0$ and/or severe $ptcml$ ($ptcml1$)	Chronic active TCMR ^e
2. Absence of criterion 2 of current/recent antibody interaction with the endothelium	Grade IA: Interstitial inflammation involving >25% of sclerotic cortical parenchyma (i-IFTA2 or i-IFTA3) AND > 25% of total cortical parenchyma (ti2 or ti3) with moderate tubulitis (t2 or t-IFTA2) involving 1 or more tubules, not including severely atrophic tubules ^d ; other known causes of i-IFTA should be ruled out
3. Prior documented diagnosis of active or chronic active ABMR and/or documented prior evidence of DSA	Grade IB: Interstitial inflammation involving >25% of sclerotic cortical parenchyma (i-IFTA2 or i-IFTA3) AND > 25% of total cortical parenchyma (ti2 or ti3) with severe tubulitis (t3 or t-IFTA3) involving 1 or more tubules, not including severely atrophic tubules ^d ; other known causes of i-IFTA should be ruled out
	Grade II: Chronic allograft arteriopathy (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell inflammation in fibrosis and formation of neointima). This may also be a manifestation of chronic active or chronic ABMR or mixed ABMR/TCMR
	Category 5: polyomavirus nephropathy ^f
	PVN Class 1
	pvl 1 and ci 0-1
	PVN Class 2
	pvl 1 and ci 2-3 OR
	pvl 2 and ci 0-3 OR
	pvl 3 and ci 0-1
	PVN Class 3
	pvl 3 and ci 2-3

* Adaptado de: Loupy A, Haas M, Roufosse C, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2020;20(9):2318-2331. doi:10.1111/ajt.15898

3.1. Rechazo celular o mediado por células T

En el rechazo mediado por células T, el injerto es infiltrado por células T efectoras, macrófagos activados, linfocitos B y células plasmáticas. Las lesiones diagnósticas del rechazo mediado por células T reflejan células mononucleares que invaden los túbulos renales (tubulitis), el espacio intersticial y la íntima de las arterias pequeñas (arteritis).(33,34)

En su forma aguda usualmente es sensible al tratamiento con corticoides y anticuerpos policlonales contra las células T (Timoglobulina®, ATG®), aunque se han reportado series con hasta el 20% de resistencia al tratamiento.(35)

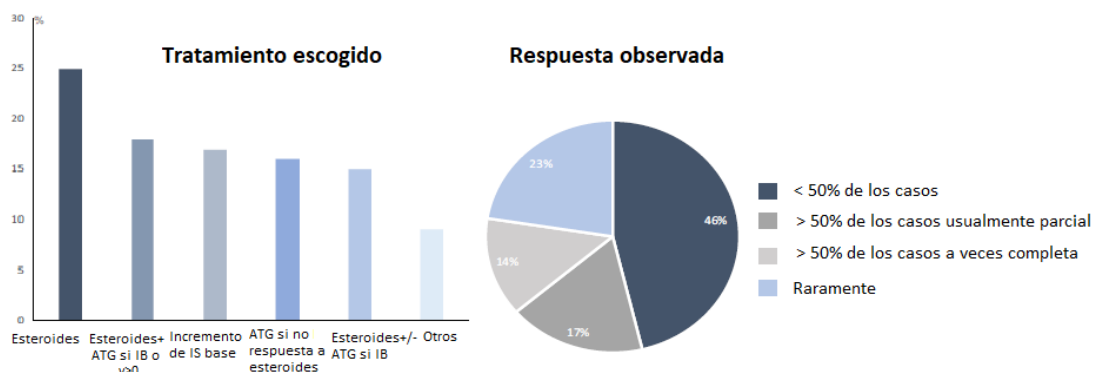
En 2017, la clasificación de Banff revisó los criterios diagnósticos y estableció la categoría de rechazo crónico activo mediado por células T (caTCMR). En su diagnóstico se toma en cuenta la presencia de inflamación en áreas de fibrosis de al menos el 25% (i-IFTA 2), acompañado de tubulitis moderada (t 2).(36) Este cambio, refleja el reconocimiento de la inflamación intersticial en áreas de fibrosis, como un marcador de mal pronóstico. En algunas series su presencia se ha asociado a mala adherencia al tratamiento inmunosupresor de mantenimiento.(36)

Se ha demostrado, que los pacientes que son tratados por un TCMR y presentan i-IFTA, tienen una progresión acelerada de fibrosis y atrofia, un mayor riesgo de desarrollar DSA *de novo* y una menor supervivencia del injerto en comparación con aquellos sin i-IFTA después del tratamiento.(37,38)

El tratamiento del caTCMR es controvertido, no hay evidencia significativa para aconsejar algún tratamiento en particular. Recientemente se ha reportado una serie de tres pacientes con mejoría histológica tras tratamiento intensivo con pulsos de corticoides y timoglobulina, seguido de incremento en la inmunosupresión de base.(39) Como dato sobre la conducta terapéutica actual el reporte 2019 de la Banff publica los datos de una encuesta a 128 profesionales (37% de Europa, 20% de Asia, 18% de Canadá y EEUU, 14% de Latinoamérica, 7% de Medio oriente y África, y 4% de Australia y Nueva Zelanda). En ella, el 36% de los encuestados lo tratan rutinariamente, 49%

dependiendo del grado de cronicidad/inflamación y 15% raramente lo tratan. La figura 14 muestra los tratamientos escogidos y el grado de respuesta reportado.(33)

Figura 14: Tratamiento de CA-TCMR reportado



* Adaptado de: Loupy A, Haas M, Roufosse C, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2020;20(9):2318-2331. doi:10.1111/ajt.15898

3.2. Rechazo mediado por anticuerpos

El rechazo mediado por anticuerpos (ABMR) se produce cuando los anticuerpos contra antígenos del donante se dirigen contra el endotelio capilar del injerto renal. La figura 15 muestra los mecanismo de lesión mediados por anticuerpos.(40)

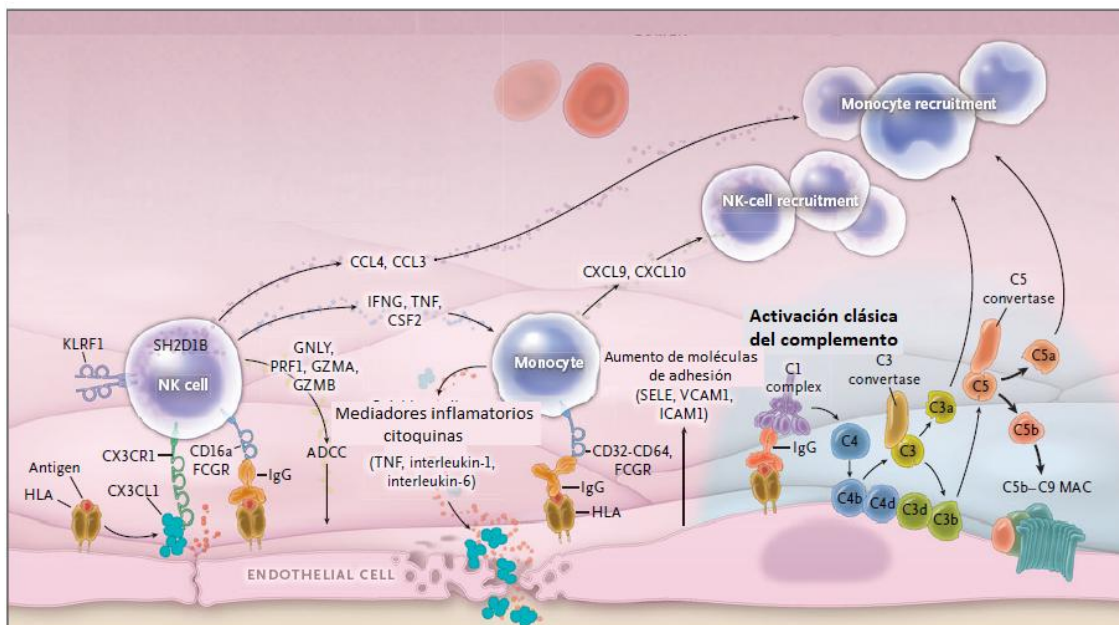
La activación de la vía clásica del complemento, mediada por anticuerpos, produce quimiotaxis y la formación del complejo de ataque de membrana (MAC), lo que lleva al reclutamiento de macrófagos y células NK y a la lesión endotelial directa.(40) También, La activación del complemento produce productos de su degradación (complement split products), los cuales amplifican la activación de células T.(41)

Recientemente se ha asociado la subclase de IgG3 con la capacidad de activación del complemento.(42,43) Esta capacidad de fijación del complemento se ha asociado a un daño histológico más severo y mayor riesgo de pérdida del injerto.(44–47) Es importante destacar que la capacidad de fijación del complemento se encuentra en relación con la concentración del

anticuerpo, es decir valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) elevados se asocian a mayor fijación del complemento.

Además de las lesiones mediadas por complemento, se reconoce que los mecanismos de lesión no mediados por complemento también son relevantes. Es por ello que la clasificación de Banff reconoce los ABMR con C4d (marcador de activación del complemento) negativos y también explica la falta de control histológico de los ensayos con bloqueo del complemento.(40) Los anticuerpos aloespecíficos contra el donante al unirse a las células endoteliales del injerto, estimulan vías de señalización que producen exocitosis rápida de la P-selectina y la producción de citoquinas, lo que en conjunto con los receptores Fc de los monocitos mejora su reclutamiento, conduciendo a la activación inflamatoria.(41)

Figura 15: Mecanismo de daño mediado por anticuerpos



* Adaptado de: Loupou A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med*. 2018;379(12):1150-1160. doi:10.1056/nejmra1802677

La mejora de la inmunosupresión ha reducido el impacto de TCMR provocando que ABMR, especialmente su forma crónica, haya ido aumentando como causa principal de pérdida tardía del injerto renal.(48,49)

La presencia de DSA se asocia a un incremento en el riesgo de ABMR. En los pacientes con DSA preformados el riesgo puede ser de hasta el 40% en los primeros dos años en algunas series.(50–54)

Los DSA preformados al momento del trasplante se asocian a rechazos tempranos, mientras que el desarrollo de DSA *de novo* suele manifestarse como rechazo subclínico y tardío.(55–57)

También, la clase de DSA presenta asociación temporal, presentando los DSA de clase I ABMR tempranos, mientras que los DSA clase II, especialmente DR y DQ, ABMR tardío.(56–58)

Entre otros factores de riesgo para el desarrollo de ABMR se encuentran, el número de incompatibilidades HLA, los episodios de rechazo celular previos, así como el número de trasplante previos.(52,59–61)

Otras técnicas en estudio para valorar el riesgo inmunológico, sobre todo en pacientes sin DSA, son la búsqueda de linfocitos B de memoria alorreactivos mediante ELISpot, y el DNA libre del donante.(62,63)

Diagnóstico y clasificación del ABMR

El diagnóstico de ABMR se basa en criterios definidos por la clasificación de Banff (Tabla 1).(33)

3.2.1. Rechazo Hiperagudo

Una forma especial y actualmente poco frecuente es el rechazo hiperagudo. Se produce por la presencia de sensibilización previa del receptor frente al donante, con presencia de anticuerpos con capacidad de activación de complemento. Produce una respuesta rápida y de gran envergadura que lleva a la pérdida irreversible del órgano trasplantado. Actualmente, no hay tratamiento

posible para el rechazo hiperagudo, por lo que las medidas pasan por prevenirlo. Desde la introducción de la prueba cruzada por el Dr Terasaki, se ha conseguido evitar los rechazos hiperagudos, ya que una prueba cruzada por citotoxicidad positiva contraindica la realización del trasplante.

3.2.2 Rechazo activo mediado por anticuerpos (aABMR)

Cabe destacar que el término rechazo agudo ha sido abandonado por el término activo.(33) Para el diagnóstico de un ABMR activo se deben reunir tres criterios que incluyen la presencia de daño tisular; inflamación microvascular (MVI), arteritis transmural, microangiopatía trombótica (MAT) y necrosis tubular aguda (NTA), evidencia de interacción reciente de anticuerpos con el endotelio vascular (C4d en capilares peritubulares), o incremento en la expresión de genes en la biopsia asociados con ABMR y evidencia serológica de presencia de DSA.

3.2.3 Rechazo crónico mediado por anticuerpos (cABMR)

Respecto a la forma cónica de ABMR, se puede clasificar en rechazo crónico activo o inactivo. La forma activa (caABMR) requiere la presencia de glomerulopatía del trasplante ($cg > 1$), o fibrosis intimal de nuevo origen, evidencia de interacción reciente de anticuerpos con el endotelio vascular y evidencia serológica con la presencia de DSA. Si la presencia de DSA no se puede demostrar en el momento del diagnóstico, se debe clasificar como un rechazo crónico inactivo mediado por anticuerpos.(33)

El ABMR crónico en general, se caracteriza por una actividad inmunológica de bajo grado, pero persistente en el tiempo, por lo cual los hallazgos histológicos demuestran un daño sostenido con fases de daño y recuperación a lo largo del tiempo. La glomerulopatía del trasplante (GT), es el resultado de procesos continuos de reparación y lesión endotelial, que conducen a la multilaminación patológica de la membrana basal glomerular. Su prevalencia aumenta con el tiempo de trasplante y se asocia a peores resultados en la supervivencia y función del injerto.(64–67)

Actualmente, el caABMR es una de las principales causas de fallo del aloinjerto renal en los trasplantes de riñón.(64,68)

4. Rechazo mediado por anticuerpos en el trasplante hepatorenal simultáneo

El trasplante hepatorenal simultáneo (THRS) es una opción terapéutica para los pacientes con enfermedad hepática y renal crónica. El daño mediado por anticuerpos en el THRS constituye una situación especial dentro del trasplante de órgano sólido.

El abordaje inmunológico difiere entre el THRS y el trasplante de riñón aislado. La presencia de alosensibilización contra el donante es una contraindicación relativa para el TR, pero no para el trasplante hepático y el THRS.

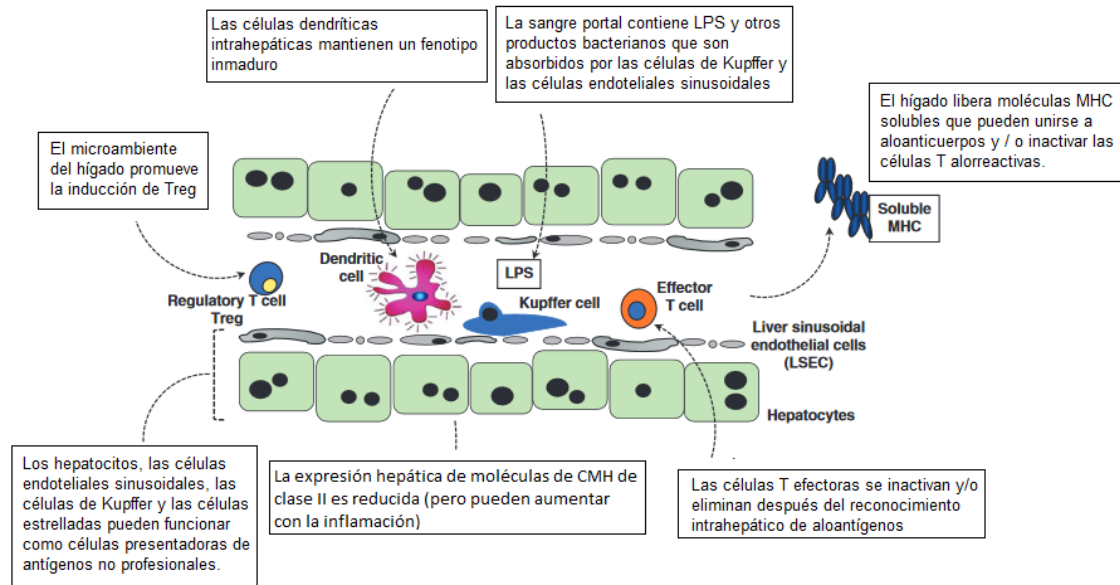
El impacto negativo de los DSA preformados en el TR aislado es bien conocido y el riesgo de rechazo hiperagudo del riñón es alto en presencia de una prueba cruzada de citotoxicidad dependiente de complemento positiva.(69–74)

Por el contrario, el injerto hepático muestra una mayor resistencia al ABMR, incluso en presencia de DSA preformados.(75–78) Varios reportes han descrito que esta resistencia podría extenderse al injerto renal en el caso de un THRS.(79–81) Este contraste inmunológico es conocido desde hace años. (79,82–84) Incluso, se ha reportado la utilización con éxito del trasplante hepático “auxiliar” simultáneo para proteger el injerto renal en pacientes con alto riesgo inmunológico.(85)

Algunos autores consideran que el hígado es un órgano inmunitario capaz de modificar el sistema inmune del receptor.(86–89) Sus propiedades inmunomoduladoras probablemente se basan en varios mecanismos dentro de los cuales podemos citar: la liberación por parte del injerto hepático de antígenos solubles de clase 1 y HLA - G, la eliminación de anticuerpos citotóxicos por las células de Kupffer y la regulación de la inmunidad innata y adaptativa por parte de las células dendríticas del hígado.(81,90–95) La figura

16 resume la los mecanismos propuestos de tolerancia en el trasplante hepático.

Figura 16: Mecanismos de tolerancia en el trasplante hepático



Adaptado de: Feng S, Sanchez-Fueyo A. Immune Tolerance After Liver Transplantation. In: D'Antiga L, ed. *Pediatric Hepatology and Liver Transplantation*. Springer International Publishing; 2019:625-652. doi:10.1007/978-3-319-96400-3_36

Recientemente, dos estudios de *Taner et al.* han arrojado luz sobre el mecanismo de tolerancia en el THRS.(96)(97) En biopsias renales de vigilancia al año post trasplante, los receptores de TR aislado con prueba cruzada por citometría positiva, tenían una mayor expresión de genes asociados con inflamación y activación de células endoteliales. Este hallazgo no se comprobó en receptores de THRS, a pesar de tener una prueba cruzada positiva. Además, los receptores de THRS, en general tuvieron una expresión aumentada de genes asociados con la integridad y metabolismo tisular no inflamatorio, independientemente del estado de la prueba cruzada.(96)

El trasplante hepático y el THRS parecen estar asociados con una disminución de la alorrespuesta hacia el donante, en comparación con los receptores de TR aislado. Esta situación es aloespecífica y la respuesta a células de terceros donantes no se ve alterada.

También se ha demostrado que los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ alorreactivos circulantes son menos frecuentes en el estado de THRS.(97) Estos estudios

demuestran que la capacidad inmunomoduladora del hígado puede extenderse más allá del microambiente local y que es aloespecífica.

Sin embargo, a pesar de este “beneficio inmunológico” respecto al trasplante renal aislado, otros autores han expresado su preocupación acerca de la alosensibilización en el THRS y su impacto negativo en la supervivencia del injerto y del paciente. En este sentido, en el trasplante hepático, también se ha reportado que los DSA preformados se relacionaron con una peor supervivencia del injerto hepático, con complicaciones biliares y con ductopenia.(98) Además, un estudio de registro de receptores de THRS informó una mortalidad más alta en los receptores sensibilizados (prueba cruzada por citotoxicidad pretrasplante positiva o panel de anticuerpos reactivos [PRA]> 10%). La sensibilización se relacionó con un aumento del 20% en la mortalidad y el 16% de pérdidas del injerto en comparación con los pacientes no sensibilizados (HR, 1,22). En este estudio, el tiempo en diálisis, la diabetes y el trasplante previo fueron significativamente más frecuentes en los pacientes sensibilizados.(99)

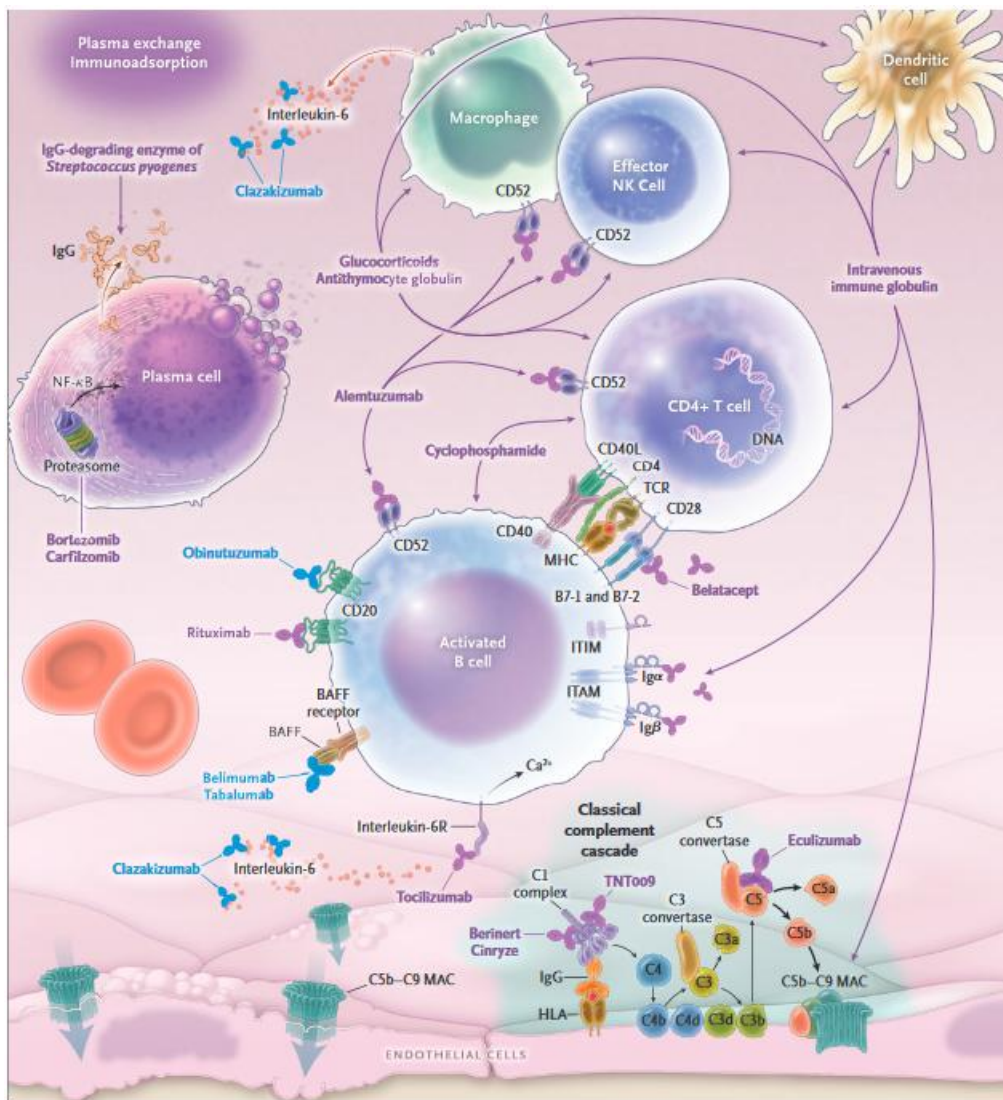
Por todo lo comentado en este apartado, el balance riesgo/beneficio en el THRS sensibilizado contra el donante es una cuestión pendiente de definir con mayor claridad.

5. Tratamiento del ABMR

Aunque no existen tratamientos aprobados por las agencias reguladoras americanas y europeas (FDA y EMA) para el rechazo mediado por anticuerpos, el “Expert consensus at the FDA Antibody-Mediated Rejection Workshop” y el “Expert Consensus 2019 de la Transplantation Society (TTS)” consideran que el tratamiento estándar para esta entidad debe incluir los recambios plasmáticos, inmunoglobulina intravenosa y corticoides.(100–102)

La figura 17 resume los principales sitios de acción de las estrategias probadas o en estudio para el tratamiento del ABMR.(40)

Figura 17: Principales tratamientos del ABMR y sitios de acción(40)



* Adaptado de: Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med.* 2018;379(12):1150-1160. doi:10.1056/nejmra1802677

5.1 Recambios plasmáticos (RP) e inmunoadsorción inespecífica (IA)

La remoción de los anticuerpos es una de las opciones terapéuticas más usadas. Su eficacia y uso en el trasplante renal ha sido reportado desde 1985.(103) El bajo grado de evidencia publicada, en su mayoría series de casos y ensayos clínicos con pocos pacientes, contrasta con el nivel de uso y recomendación de las diferentes revisiones.(104)

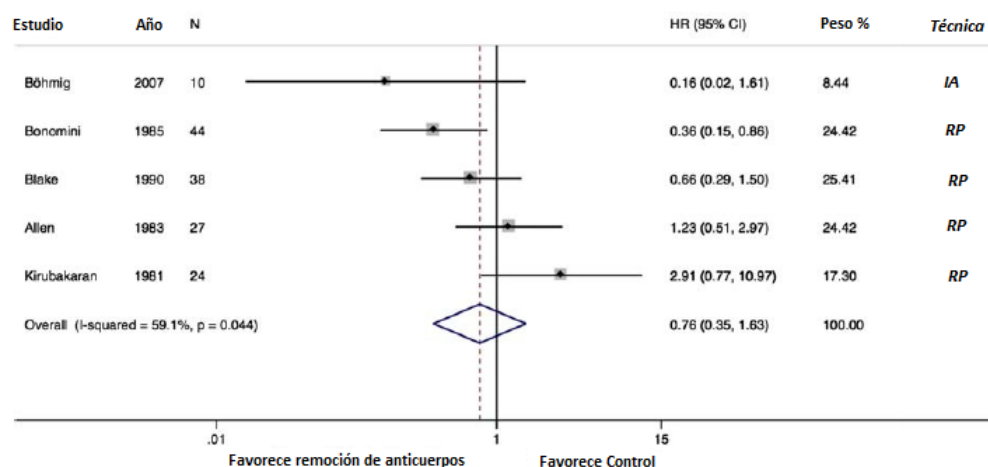
La base lógica de la eliminación de anticuerpos es conseguir una disminución del daño agudo endotelial, permitiendo un retorno a la “situación de equilibrio inmunológico” logrado con la inmunosupresión.

La IA se demostró superior, comparada con tratamiento estándar, en un pequeño ensayo clínico aleatorizado (5 pacientes por rama) y también ha sido usada con éxito en tratamientos de desensibilización pre-trasplante.(105)(106) Comparada con el recambio plasmático, tiene la ventaja de eliminar selectivamente las inmunoglobulinas, evitando los efectos de coagulopatía por pérdida de factores de la coagulación y los efectos adversos de la reposición con plasma o albúmina.(107)

El RP es considerado un tratamiento estándar del tratamiento del ABMR activo.(100–102) Recientemente, en un metanálisis se han evaluado cinco ensayos clínicos aleatorizados para definir el impacto de RP y IA sobre el tratamiento del ABMR, solo un estudio demostró eficacia, y el resultado global fue negativo (Figura 18).(108) El análisis de estos resultados, sin embargo, debe ser tomado con cautela ya que hay una gran heterogeneidad respecto al tratamiento y el seguimiento, tanto en la rama control como en la intervención de cada estudio. El resto de la información favorable proviene de series retrospectivas, donde también se asocia a mejores resultados combinado con inmunoglobulina endovenosa (IVIg).(109–111)

A pesar de este bajo nivel de evidencia, múltiples publicaciones lo consideran el tratamiento estándar del ABMR activo, dado su uso generalizado. (108,112–114)

Figura 18: Estimaciones individuales y agrupadas del efecto de la eliminación de anticuerpos en comparación con el control sobre la supervivencia del injerto.



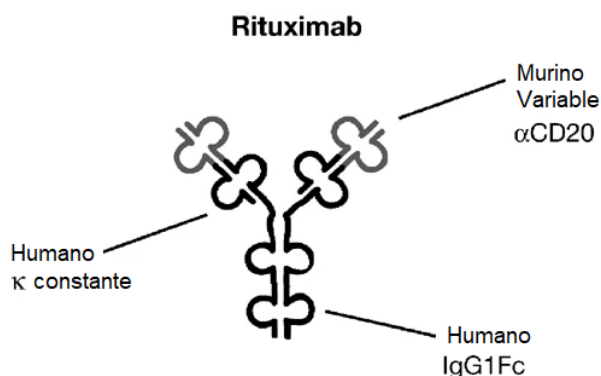
IA: inmunoadsorción; RP: recambio plasmático

* Adaptado de: Wan SS, Ying TD, Wyburn K, Roberts DM, Wyld M, Chadban SJ. The treatment of antibody-mediated rejection in kidney transplantation: An updated systematic review and meta-analysis. *Transplantation*. 2018;102(4):557-568. doi:10.1097/TP.0000000000002049

5.2 Anticuerpo anti-CD20, Rituximab:

El rituximab (RTX) es un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa quimérico murino y humano (20/80%), obtenido por ingeniería genética. Es una inmunoglobulina glicosilada, que consta de las regiones constantes Fc humanas y secuencias de región variables Fab murinas (tanto cadena ligera como pesada), con capacidad de unión a CD20, Figura 19. Se produce a partir de un cultivo en suspensión de células de mamífero (células de ovario de hámster chino).(115)

Figura 19: Estructura quimérica del Rituximab



Adaptado de: Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): Mechanisms of action and resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7359-7368. doi:10.1038/sj.onc.1206939

RTX se une específicamente al antígeno CD20, una fosfoproteína de transmembrana que se expresa en los linfocitos pre-B y B maduros. La unión de RTX al CD20, lleva a la lisis de los linfocitos B mediante varios mecanismos que incluyen la citotoxicidad por activación de complemento, apoptosis por la vía caspasa-3 y citotoxicidad celular por células efectoras que reconocen a la fracción FC de la molécula de RTX unida a las células.(116) Se produce así, una eliminación rápida y prolongada de linfocitos B circulantes. Esta depleción de linfocitos B suele mantenerse durante 6-12 meses.(115) Al ir dirigido contra los precursores de las células plasmáticas, el RTX puede agotar temporalmente el reservorio de células plasmáticas de vida media corta, pero no tiene un efecto directo sobre el subconjunto de células plasmáticas de vida media larga, que no poseen el antígeno CD20.

Las indicaciones actuales aprobadas por las agencias Española y Europea (AEMPS y EMA), son el linfoma no Hodgkin, la leucemia linfocítica crónica, la artritis reumatoide, la granulomatosis con poliangeítis y la poliangeítis microscópica.(117)(118) Por otro lado, RTX es un fármaco ampliamente utilizado en el ámbito del trasplante renal. Actualmente, el RTX forma parte del esquema de tratamiento habitual del ABMR en muchos centros y en el pasado incluso ha sido recomendado por guías clínicas internacionales.(119)

El fundamento de su uso se encuentra en el papel central de los linfocitos B como precursores de células plasmáticas, su acción como presentadoras de antígenos y su rol en la estimulación y activación de los linfocitos T.(120,121)

- Tratamiento con rituximab del ABMR activo

Su uso tiene la intención final de disminuir la generación de anticuerpos anti-ABO y anti-HLA. La evidencia reportada para sustentar el uso de RTX en el tratamiento del ABMR renal es escasa y con resultados contradictorios.

Desde un punto de vista fisiopatológico, dado que no expresan CD20, no se esperaría que las células plasmáticas sean afectadas directamente por su uso. Sin embargo, el RTX ha demostrado eficacia en otras patologías renales

dependientes de anticuerpos patológicos, lo que podría sugerir un mecanismo indirecto de control del daño humoral.(117)

Estudios a pequeña escala, inicialmente reportaron eficacia en el tratamiento del ABMR. También una revisión sistemática de estudios retrospectivos o no aleatorizados apuntó a un efecto beneficioso del tratamiento con RTX en el ABMR.(122)

El primer estudio controlado de RTX, comparó su uso en conjunto con IVIG y RP contra IVIG a altas dosis, si bien el resultado fue favorable, a la rama RTX, no puede descartarse que el efecto se debió en realidad a los RP.(111)

El ensayo RITUX ERAH, aleatorizado, doble ciego y multicéntrico, comparó RP, IgIV y corticoides con y sin rituximab en 38 pacientes con ABMR. El uso de RTX no mostro ningún beneficio a un año de seguimiento en la función renal, ni en el nivel de DSA.(111) Si bien el estudio no tuvo la potencia estadística necesaria.

Finalmente, dos revisiones sistemáticas recientes no han encontrado beneficio en la adición de RTX al tratamiento de ABMR con RP e IVIg.(108,123)

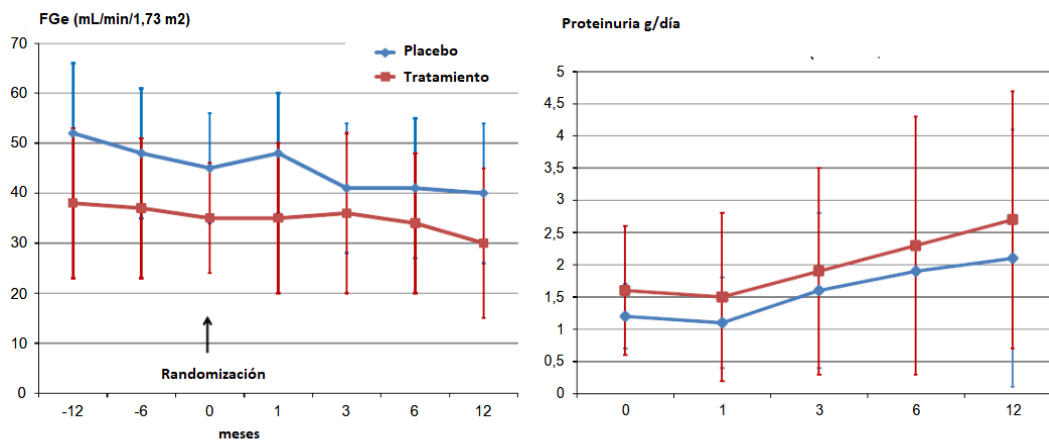
- Tratamiento con rituximab del caABMR

A pesar de su importancia clínica, la evidencia disponible sobre el tratamiento de caABMR es escasa. De manera similar al tratamiento del ABMR activo, muchos centros utilizan combinaciones de RP, IVIg y RTX. Este era el caso del Hospital Clínic de Barcelona al momento de inicio de la presente tesis. El tratamiento habitual del caABMR se realizaba con una combinación de 5-6 sesiones de RP, IVIg a bajas dosis (200 mg/kg) cada dos RP y una dosis de RTX de 400 mg al inicio y final del ciclo de recambios.

La evidencia publicada inicialmente en series pequeñas y retrospectivas señalaba una ligera mejoría de la supervivencia y función renal bajo tratamiento con IgIV y RTX.(124–127) Al contrario, dos series recientes no observaron mejoras en la supervivencia del injerto comparando con no tratamiento, pero si una mayor incidencia de complicaciones y efectos adversos en la rama de tratamiento.(128,129) El estudio TRITON, multicéntrico y aleatorizado, sobre el

tratamiento de caABMR ha sido publicado recientemente por un grupo Español. Moreso et al. compararon el tratamiento con RTX e IVIg frente a placebo en 24 pacientes con GT y DSA, sin lograr evidenciar diferencias en la disminución del FGe, o el MFI de DSA a los 12 meses, Figura 20.

Figura 20: Evolución del filtrado glomerular y la proteinuria en los pacientes del estudio Triton



* Adaptado de: Moreso F, Crespo M, Ruiz JC, et al. Treatment of chronic antibody mediated rejection with intravenous immunoglobulins and rituximab: A multicenter, prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Am J Transplant.* 2018;18(4):927-935. doi:10.1111/ajt.14520

El estudio incluyó 25 pacientes (12 en la rama tratamiento), pero dada una baja tasa de inclusión no logró llegar al número de pacientes calculados para lograr poder estadístico suficiente.(130) Esto, pone de relieve la dificultad de realizar estudios en este grupo de trasplantados. Se requiere un tiempo prolongado de inclusión y seguimiento para lograr evidenciar diferencias clínicas relevantes. Otro ejemplo reciente es el estudio RituxiCAN-C4, se trata de un ensayo abierto aleatorizado y controlado, que se realizó en 7 centros del Reino Unido. La intención del estudio fue valorar la estabilización de la función renal en pacientes con caABMR tratados con RTX. El estudio tuvo que ser detenido tras un análisis interino que descubrió la poca potencia estadística del mismo. Sin embargo, este estudio también nos brinda información muy interesante. Un reporte de los hallazgos en 23 pacientes, valora la interacción de la respuesta B y T con el rituximab y la inmunosupresión de base. El hallazgo, es muy interesante desde el punto de vista fisiopatológico. Los linfocitos B promueven la producción de IFN γ por células T CD4⁺ alorreactivas, lo cual se asocia a peores resultados clínicos. Este mecanismo fue inhibido por la optimización de la inmunosupresión de base, pero no por el uso de RTX. Aun más, la supresión

de la producción de IFN γ se asoció con un mayor número de linfocitos B de transición y con una disminución más lenta de la función renal. Esta acción supresiva en la secreción de IFN γ se ve abolida por el RTX que elimina las células B de transición durante períodos prolongados.(131)

- Uso de Rituximab en la desensibilización y prevención del ABMR

El RTX se ha usado ampliamente como tratamiento para eliminar previo al trasplante anticuerpos preformados contra el donante. Esto ocurre en casos de trasplante con grupo sanguíneo ABO incompatible (isoaglutininas) y en pacientes con sensibilización anti-HLA contra el donante. Recientemente una revisión sistemática valoró el uso de RTX en ambos contextos.(132) Respecto al uso de RTX en el TR ABOi, no hay evidencia sólida que apoye resultados superiores frente a la esplenectomía, aunque el uso de una terapia médica obviamente evita los efectos adversos de la esplenectomía (complicaciones quirúrgicas, malestar postoperatorio y un riesgo de por vida de sepsis por gérmenes capsulados).

En el caso de receptores altamente sensibilizados (presencia de DSA o *crossmatch* positivo previo), aunque con variabilidad en los otros componentes de las estrategias de desensibilización, hay evidencia de un beneficio al añadir RTX a los RP e IVIg. Este beneficio puede explicarse con el trabajo de Zachary *et al*, donde se demuestra que el tratamiento con RTX en pacientes con un nivel alto de linfocitos B alorreactivos evita la producción de anticuerpos frenando una respuesta de memoria.(133)

Hay poca información sobre la dosis o el número de dosis, sin embargo, la información existente apunta a que la dosis más usada, 375 mg/m² basada en el tratamiento del linfoma, probablemente sea superior a la requerida.(132)

Un dato importante a valorar es el posible beneficio en la supervivencia del paciente que aporta el trasplante renal tras un tratamiento de desensibilización. Recientemente, esto fue evaluado en dos estudios multicéntricos, uno con pacientes de EEUU y otro de Reino Unido, comparando cohortes retrospectivas con casos y controles. La cohorte de EEUU mostró un beneficio significativo en

la supervivencia, mientras que los pacientes provenientes de Reino Unido no tuvieron un impacto positivo en la supervivencia respecto a continuar en diálisis.(134,135) Posiblemente esta discrepancia se deba a diferencias basales de los pacientes de ambas cohortes, así como también a diferencias en el tratamiento de diálisis.

5.3. Bortezomib:

El bortezomib es un inhibidor reversible del proteosoma, que lleva a la apoptosis de las células plasmáticas que producen anticuerpos.

El proteosoma es un complejo proteico presente en el citoplasma de todas las células, que se encarga de la degradación de restos de proteínas no necesarias marcadas con ubiquitina.

Bortezomib se une específicamente a la subunidad 26S del proteosoma y esto evita la proteólisis dirigida afectando a múltiples cascadas de señalización intracelulares, lo que provoca la detención del ciclo celular y lleva a la apoptosis.(136)

El uso de este fármaco ha sido aprobado para el tratamiento del mieloma y el linfoma de células del manto. En el trasplante renal se ha reportado, su efecto beneficioso, en estudios a pequeña escala y series de casos, como tratamiento inicial y de rescate del ABMR. (137–141) Sin embargo, el grado de contribución del bortezomib a la eficacia de dichos tratamientos no está claro, ya que se ha usado en combinación con múltiples esquemas de RP, IVIg y RTX.

El estudio BORTEJECT, doble ciego y unicéntrico, estudió el bortezomib en monoterapia como tratamiento del ABMR tardío versus placebo. No hubo diferencias en la velocidad de disminución de la función renal a los dos años, ni tampoco en la mediana de fluorescencia (MFI) de los DSA, ni en los resultados histológicos y moleculares de las biopsias de control a los 24 meses. Como nota, debe decirse que el deterioro de la función renal fue menor al esperado en el grupo control y el estudio no tuvo, entonces, la potencia estadística necesaria para encontrar diferencias. Sin embargo, la rama bortezomib se asoció a efectos adversos más severos, en particular a nivel hematológico y gastrointestinal.(142)

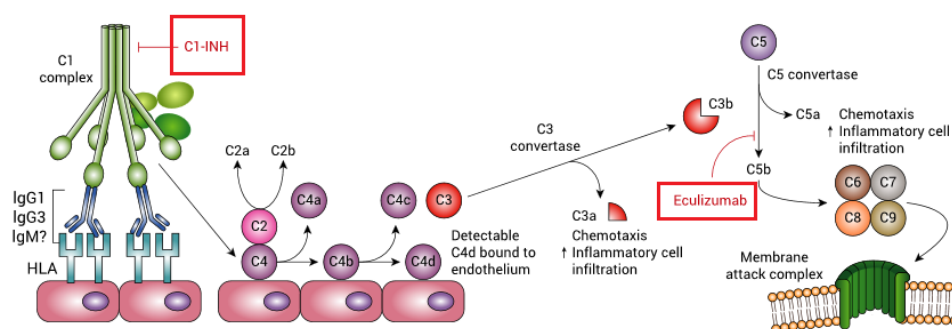
Su uso en combinación con RTX, RP e IVIg para el tratamiento de caABMR en un estudio observacional, tampoco ha sido efectivo. Se mostro eficaz en el control de los episodios de ABMR tempranos, pero no en los episodios tardíos.(139)

Algunos autores, sugieren que la pérdida de eficacia del bortezomib en el ABMR se debe a un rebote humoral tras la inhibición inicial y plantean la posibilidad de vencer dicha situación con el uso combinado con bloqueadores de la coestimulación o inhibidores del proteosoma irreversibles como el carfilzomib.(49)

5.4 Inhibidores del complemento:

En los últimos 8 años, se ha observado un interés creciente en el sistema de complemento como mecanismo de daño y diana terapéutica en el ABMR. Y existe evidencia suficiente que demuestra la implicación del complemento en el rechazo crónico humoral y la pérdida del injerto mediado por activación de la vía clásica del complemento.(41,143–145) En la figura 15, se ha comentado la implicación del sistema del complemento en el desarrollo de ABMR, pero a continuación se detalla más específicamente la activación del sistema del complemento y los posibles puntos de inhibición (Figura 21).

Figura 21: complemento y sitios de inhibición



Adaptado de

* Adaptado de: Montgomery RA, Loupy A, Segev DL. Antibody-mediated rejection: New approaches in prevention and management. *Am J Transplant.* 2018;18:3-17. doi:10.1111/ajt.14584

- Eculizumab es un anticuerpo IgG monoclonal humanizado, producido mediante tecnología de ADN recombinante. Se encuentra aprobado para el

tratamiento de la Hemoglobinuria paroxística nocturna, el síndrome hemolítico urémico atípico, la miastenia gravis generalizada refractaria con anticuerpos positivos frente a receptores de la acetilcolina y los trastornos del espectro de neuromielitis óptica con anticuerpos positivos frente a acuaporina-4 (AQP4).

Su acción se lleva a cabo mediante la unión a la proteína del complemento C5, inhibiendo la activación del complemento terminal.(146)

El grupo de Stegall *et al* ha publicado un estudio sobre el uso de Eculizumab en combinación con RP en pacientes con CF-CM positivo y comparado con una cohorte histórica. Con dos años de seguimiento, el uso de Eculizumab disminuyó significativamente los episodios de ABMR (6,7% vs 44%). Pero, a pesar de continuar el tratamiento en aquellos pacientes que mantenían elevados los DSA, no consiguió evitar la aparición de caABMR.(147,148)

Un estudio piloto ha evaluado el uso de Eculizumab en 10 pacientes con cAMBR durante 6 meses vs observación en un grupo control de 5 pacientes. Al año de seguimiento, en las biopsias de control, no se produjo una reducción de la expresión de genes asociados a células endoteliales (ENDATs). Pero, los pacientes en el grupo de tratamiento, tuvieron una pendiente de deterioro del FGe menos acusada comparada con el grupo de observación. Al suspender el tratamiento a los 6 meses, la mitad de los pacientes presentó un deterioro de la pendiente de FGe, sugiriendo que el tratamiento debe ser continuado.(149)

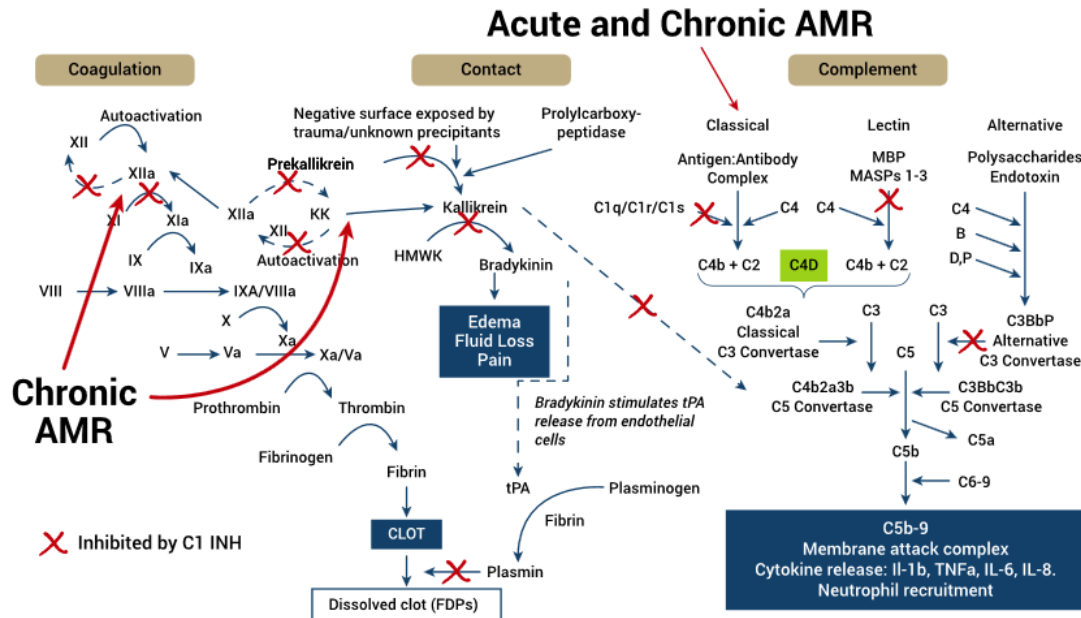
Más recientemente, un estudio multicéntrico aleatorizado y abierto, con 102 pacientes con CDC-CM, o CF-CM positivo, evaluó el uso de Eculizumab por 9 semanas + RP + IVIg, versus desensibilización con RP + IVIg. Con resultados concordantes con los estudios previos, no hubo diferencias en la supervivencia del injerto entre ambos grupos, pero sí una disminución significativa de los episodios de ABMR tempranos.(150) Tampoco hubo diferencias en los eventos adversos entre ambos grupos.

- Inhibición proximal del complemento C1

El C1-inhibidor (C1-inh) es una enzima que se caracteriza por ser el principal regulador de los pasos de la activación temprana de la vía clásica del complemento. Además tiene otras funciones como regular la activación de

kalicreína, la plasmina, la activación del factor XI y del factor XIIIa en la cascada de la coagulación.(151)

Figura 22: sitios de acción del C1-inhibidor.



* Adaptado de: Montgomery RA, Loupy A, Segev DL. Antibody-mediated rejection: New approaches in prevention and management. *Am J Transplant.* 2018;18:3-17. doi:10.1111/ajt.14584

Recientemente se han publicado 4 estudios sobre el uso de C1-inh en pacientes con ABMR refractario y en la prevención del ABMR en pacientes sensibilizados.

Un estudio piloto fase 2b, multicéntrico, doble ciego y aleatorizado evaluó el uso de C1-inh añadido a la terapia habitual (IVIg + RP), para el tratamiento de ABMR. Incluyó 18 pacientes, 9 C1-inh por dos semanas y 9 placebo. No se demostraron diferencias en la supervivencia, pero si menos incidencia de glomerulopatía a los 6 meses del estudio (0/7 frente a 3/7).(152)

Un estudio piloto prospectivo de un solo brazo con 6 pacientes, evaluó el uso de C1-INH (Berinert) añadido a dosis altas de IVIg para el tratamiento del ABMR refractario a terapia convencional. Todos los pacientes mostraron una mejora significativa en el FGe, pero sin ningún cambio en las características histológicas, excepto una disminución en la positividad del C4d.(153)

Un estudio de fase II, controlado contra placebo, de C1-Inh para la prevención del ABMR en 28 pacientes altamente sensibilizados con tratamiento de

desensibilización (IVIg+ RP+ RTX), demostró seguridad y disminución de los DSA fijadores de complemento, pero sin diferencias significativas en la incidencia de ABMR. (154)

Finalmente, un ensayo clínico fase I en 10 pacientes con ABMR tardío, con el anticuerpo anti-C1s (BIVV009), no demostró cambios histológicos, de expresión génica, en el nivel de DSA o en la función renal. Pero si un buen perfil de seguridad.(155)

5.5. Bloqueo de Interleuquina 6

Por último, el bloqueo de la Interleuquina 6 (L-6) ha arrojado datos prometedores. Tocilizumab, un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6, demostró estabilización de la función renal en una pequeña serie de pacientes con caABMR y GT.(156) Más recientemente, Clazakizumab, un anticuerpo monoclonal contra la IL-6, ha demostrado mejorar el declive en el FGe e incluso lograr mejoría histológica y molecular en las biopsias de seguimiento en un estudio aleatorizado de fase 2. Sin embargo el 25% de los pacientes presentaron eventos adversos graves.(157) Esta línea de tratamiento parece interesante aunque no exenta de riesgos, actualmente se encuentra en desarrollo un estudio aleatorizado de fase 3 que planea incluir 350 pacientes con diagnóstico de cABMR(158)

6. Nuevas estrategias posibles en el manejo del rechazo mediado por anticuerpos

6.1 IdeS

Recientemente se ha planteado el uso de la endopeptidasa de Streptococcus pyogenes (IdeS, imlifidasa). La enzima es una proteasa que produce una degradación masiva de las IgG del receptor. Normalmente la enzima inactiva los anticuerpos IgG opsonizantes unido a la superficie bacteriana. IdeS escinde específicamente moléculas de IgG en la región bisagra inferior de la cadena

pesada en un proceso de varios pasos. También lleva a la escisión del receptor de células B de tipo IgG en células de memoria B CD19⁺.(159)

Una semana tras la administración de IdeS se inicia una recuperación de los niveles de IgG y se detectan niveles elevados de anticuerpos anti-IdeS que impide su uso continuado.

Ha sido probado en una serie de 25 pacientes fuertemente sensibilizados contra el receptor. Su limitación es la recuperación posterior de los niveles de IgG con una 40% de ABMR. Y la imposibilidad por el momento de tratar en repetidas ocasiones.(159,160)

6.2 Fotoaféresis extracorpórea

El envejecimiento poblacional supone un aumento en la prevalencia de la enfermedad renal crónica y en las comorbilidades de los receptores de trasplantes. En este contexto, la búsqueda de tratamientos eficaces y con mayor seguridad que los inmunosupresores convencionales, ha promovido la investigación en terapias celulares. Dichas terapias, como las células T reguladoras (Tregs), los macrófagos reguladores (Mregs), las células dendríticas tolerogénicas (ToIDC) o las células estromales mesenquimales (MSC), podrían ser una opción adecuada proporcionando control de la aloinmunidad sin incrementar la inmunosupresión.(161–163)

La fotoaféresis extracorpórea (ECP) es una terapia celular inmunomoduladora que se basa en la administración endovenosa de productos celulares autólogos expuestos a luz ultravioleta A (UV-A), en presencia del fotosensibilizador 8-metoxipsoraleno (8-MOP). El producto celular se obtiene a través de leucoaféresis y su posterior exposición a 8-MOP e iluminación con luz UV-A, Figura 23.(164)

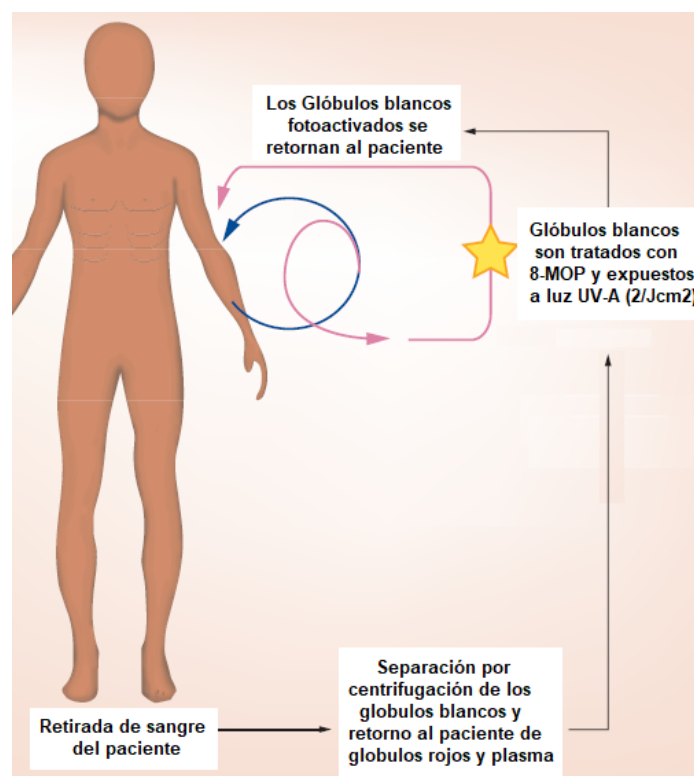
Actualmente, las dos indicaciones principales de la terapia con ECP son el linfoma cutáneo de células T (CTCL) y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), en el trasplante de progenitores hematopoyéticos.(165–167) La ECP también ha demostrado su eficacia en los trasplantes de pulmón y corazón,

donde se ha utilizado para el tratamiento y prevención del rechazo, con buenos resultados clínicos.(168–177)

La ECP ha demostrado inducir tolerancia inmunoespecífica sin incrementar la inmunosupresión general y por lo tanto, sin un aumento de las infecciones.(178–180) Esto, hace que la ECP sea un enfoque muy atractivo para tratar de forma segura una gran variedad de patologías inmunes.

En el ámbito del trasplante renal, la mayor parte de la información proviene de reportes de casos, de pequeñas series retrospectivas y un estudio de corto seguimiento.(169,181–186) Es esta falta de evidencia lo que hace controvertido el uso de la ECP en el trasplante renal fuera de estudios experimentales.(186)

Figura 23: Diagrama de la técnica de fotoaféresis extracorpórea



Adaptado de: Markus J Barten, Maja-Theresa Dieterlen. Extracorporeal photopheresis after heart *Immunotherapy* (2014) 6(8), 927–944

Mecanismo de acción:

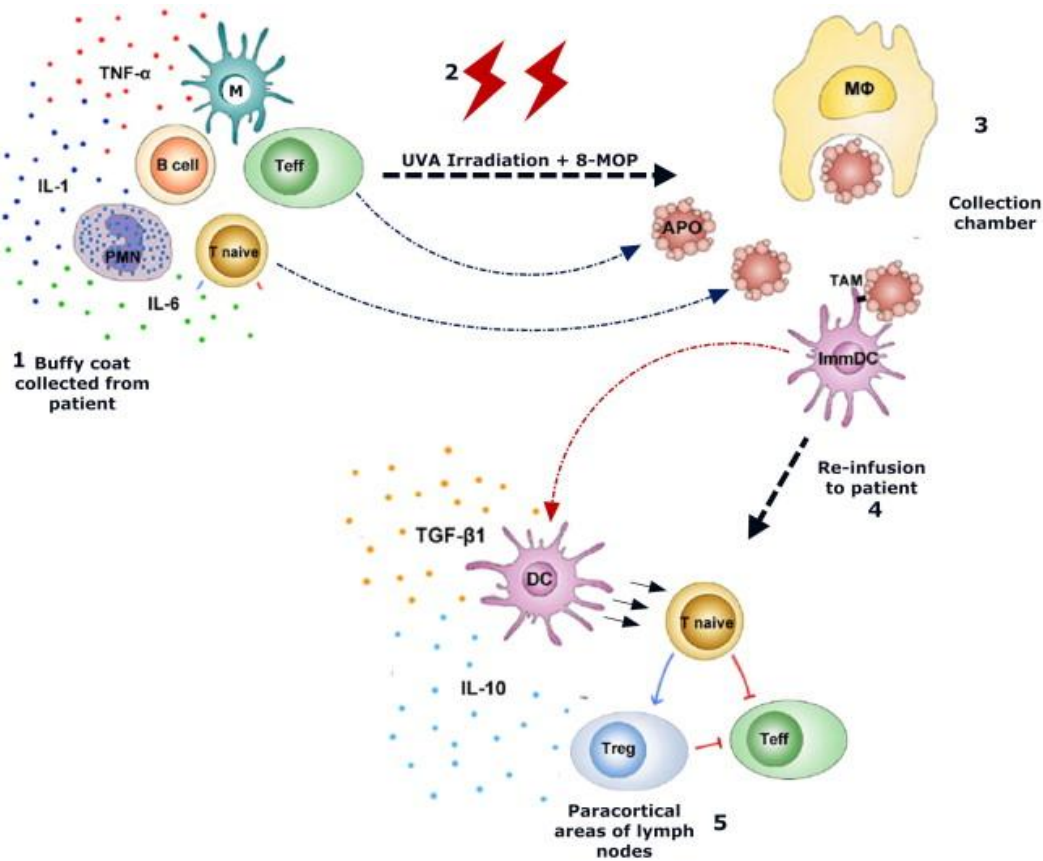
Explicar el mecanismo de la ECP entraña la dificultad de una terapia que produce, según el contexto, una respuesta inmunogénica o de inmunotolerancia. Aunque se considera que el mecanismo de la ECP no se conoce en su totalidad, hay suficiente evidencia científica para afirmar que el mecanismo es multifactorial, complejo y dependiente también de la situación en la que se practica la terapia, Figura 24. Entre los mecanismos de acción implicados se incluyen al menos la apoptosis de linfocitos y monocitos expuestos a la iluminación y los efectos posteriores que estos desencadenan, como la producción de citoquinas inmunomoduladoras, generación de células T reguladoras y complejas interacciones con las células dendríticas y otros presentadores de antígeno.(164),(187–189)

La exposición a radiación UV-A (2J/cm²), en combinación con el fotosensibilizador 8-MOP, lleva a la unión covalente del metoxipsoraleno al ADN y da como resultado la formación de enlaces cruzados entre las bases de pirimidina. Produce uniones en proteínas citosólicas, daños en la membrana celular con algunas modificaciones antigénicas y finalmente la muerte celular apoptótica.(190) La apoptosis rápida de los linfocitos, el 90% dentro de las 48 horas, lleva a la liberación de cuerpos apoptóticos, mientras que los monocitos se diferencian a células dendríticas inmaduras de vida más larga (se ha comprobado su viabilidad a la semana del procedimiento). Las acciones de la ECP van más allá del efecto citolítico, ya que solo un 10% aproximadamente de los leucocitos totales del paciente se ven expuestos. Las células dendríticas fagocitan y exponen los antígenos de los cuerpos apoptóticos. Estas células, fenotípicamente, se caracterizan por bajos niveles de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) y marcadores de maduración negativos (CD83). (188)

Una vez reinfundidas, las células dendríticas migran a los ganglios linfáticos y presentan los antígenos adquiridos de los cuerpos apoptóticos a los linfocitos T naïve. Secretan cantidades significativas de citoquinas antiinflamatorias, como interleuquina-10 (IL-10) y factor de crecimiento transformante beta (TFG-β1).

Esto da lugar a la generación de células T reguladoras, en lugar de activar las células T naïve a T efectores.(191)

Figura 24: Mecanismo de acción de la ECP.



Adaptado de: Goussetis E, Varela I, Tsigiotis P. Update on the mechanism of action and on clinical efficacy of extracorporeal photopheresis in the treatment of acute and chronic graft versus host disease in children. *Transfus Apher Sci.* 2012;46(2):203-209. doi:10.1016/j.transci.2011.10.017

Justificación

La mejora en el control del daño mediado por anticuerpos constituye un aspecto crucial para extender la sobrevida del injerto renal. Actualmente, se desconoce de manera completa el grado de respuesta del rechazo mediado por anticuerpos a los tratamientos aceptados como habituales (recambios plasmáticos, IVIG y rituximab). Los resultados de dichas estrategias terapéuticas son controvertidos, especialmente en el caso del rechazo crónico activo medido por anticuerpos.

Por otro lado, la población en terapia renal sustitutiva ha mejorado progresivamente su sobrevida, lo que conlleva envejecimiento y aumento de los segundos trasplantes. Esto, condiciona una creciente sensibilización y fragilidad de los receptores, que hacen necesarias nuevas estrategias no basadas en un incremento de la inmunosupresión para el control del daño humoral.

El trasplante hepatorrenal simultáneo, en comparación con el trasplante renal aislado, se asocia en series históricas a un menor riesgo de daño crónico mediado por anticuerpos. Sin embargo, actualmente, la mayoría de las series publicadas, describen una mayor mortalidad en los pacientes con sensibilización contra el donante. Es pertinente estudiar el impacto del daño mediado por anticuerpos en la sobrevida del injerto y el paciente con trasplante hepatorrenal simultáneo, dado que el mismo o variantes basadas en su fisiopatología inmune, podrían constituir en un futuro, una alternativa terapéutica en el manejo del rechazo mediado por anticuerpos.

La fotoaféresis extracorpórea ha demostrado, con un grado variable de evidencia, su efectividad en el manejo del rechazo del injerto de pulmón y corazón. La misma no se asocia a mayor inmunosupresión o a un incremento del riesgo de infecciones o tumores, lo cual la hace, una terapia atractiva a valorar en el trasplante renal. Sin embargo, hasta el momento, no hay datos sobre su efectividad en el contexto del daño mediado por anticuerpos en el injerto renal.

Hipótesis de trabajo

- 1) La eficacia del tratamiento del rechazo activo mediado por anticuerpos con recambios plasmáticos, IVIg y rituximab podría variar según el tiempo transcurrido entre el trasplante y el diagnóstico del rechazo activo mediado por anticuerpos. La persistencia de la actividad inflamatoria en las biopsias de control tras el rechazo podría asociarse a una peor sobrevida del injerto renal.

- 2) El tratamiento del rechazo renal crónico activo mediado por anticuerpos con recambios plasmáticos, IVIg y rituximab, podría no ser una terapia eficaz.

- 3) El trasplante hepatorenal simultáneo podría brindar al injerto renal una mayor tolerancia al daño mediado por anticuerpos. La mayor mortalidad histórica de los pacientes sensibilizados podría explicarse por otros factores diferentes a la alosensibilización.

- 4) La fotoaféresis extracorpórea podría disminuir la progresión de la disfunción del aloinjerto renal mediada por anticuerpos en un modelo animal en rata.

OBJETIVOS

- **Objetivo 1:** Caracterizar la eficacia y factores pronósticos del tratamiento con Rituximab, IVIG y recambios plasmáticos en el rechazo renal activo mediado por anticuerpos, en una cohorte de pacientes del Hospital Clínic de Barcelona.
 - a. Valorar la eficacia del tratamiento del rechazo activo mediado por anticuerpos e identificar aquellos pacientes en los que el tratamiento es más efectivo.
 - b. Describir las complicaciones infecciosas en el post tratamiento.
 - c. Valorar la respuesta al tratamiento en las biopsias de control
 - d. Identificar en las biopsias de control marcadores que definan el devenir del injerto renal.

- **Objetivo 2:** Caracterizar la eficacia y factores pronósticos del tratamiento con Rituximab, IVIG y recambios plasmáticos en el rechazo renal crónico activo mediado por anticuerpos, en una cohorte de pacientes del Hospital Clínic de Barcelona.
 - a. Valorar la eficacia del tratamiento.
 - b. Analizar las complicaciones infecciosas tras el tratamiento.
 - c. Identificar factores pronóstico en la sobrevida del injerto.

- **Objetivo 3:** Evaluar el impacto del daño mediado por anticuerpos en la supervivencia del injerto renal y del paciente, en la cohorte de trasplante hepatorenal simultáneo del Hospital Clínic de Barcelona.

- **Objetivo 4:** Valorar la eficacia de la fotoaféresis extracorpórea para el manejo del rechazo del injerto renal mediado por anticuerpo.
 - a. Desarrollar un modelo experimental en rata de rechazo de injerto renal mediado por anticuerpos.
 - b. Desarrollar un modelo de fotoaféresis extracorpórea en rata.
 - c. Evaluar el impacto de la fotoaféresis extracorpórea en un modelo de rechazo mediado por anticuerpos.

Objetivo 1

Caracterizar la eficacia y factores pronósticos del tratamiento con Rituximab, IVIG y recambios plasmáticos en el rechazo renal activo mediado por anticuerpos (aABMR). Valorar la respuesta en las biopsias de control y describir las complicaciones infecciosas en el post tratamiento.

1. Justificación del objetivo:

La mejora en la inmunosupresión ha provocado que el rechazo celular agudo disminuya su importancia como causa de pérdida del injerto. Actualmente el ABMR, ha ido aumentando como la principal causa de insuficiencia tardía del injerto renal. (48,49)

El aABMR se ha relacionado con peores resultados y supervivencia de los pacientes.(192–194). No existen tratamientos específicos para el aABMR aprobados por las agencias reguladoras gubernamentales (FDA o la EMA). Los recambios plasmáticos (RP), la inmunoglobulina intravenosa (IVIg) y los corticoides constituyen el estándar de tratamiento, siendo el rituximab también ampliamente usado, aún sin evidencia clara de eficacia. (100–102,195) La evidencia sobre la eficacia del tratamiento de aABMR es escasa y hay pocos datos disponibles sobre complicaciones relacionadas con el tratamiento.

Al momento del inicio de la presente tesis en el Hospital Clínic de Barcelona, el tratamiento del ABMR tanto en su forma activa, como crónica activa, se realizaba con la combinación de corticoides, RP, IVIg y rituximab.

2. Material y Métodos

2.1. Diseño del estudio y población de pacientes

Estudio retrospectivo longitudinal unicéntrico.

Criterios de inclusión:

- a) Pacientes receptores de riñón diagnosticados con rechazo agudo activo mediado por anticuerpos (ABMR) desde el 1 de enero de 2004 hasta el 31 de diciembre de 2019.
- b) Tratamiento con una combinación de RP, IVIg y rituximab.

Criterios de exclusión:

- a) Trasplante multivisceral
- b) Glomerulopatía del trasplante (GT) en la biopsia inicial, cg \geq 1 en la clasificación histopatológica de Banff.(196)

Variables del estudio

Variable principal:

Supervivencia del injerto censurada por muerte.

Variables secundarias:

Se incluyeron datos demográficos, clínicos e índice de comorbilidad de Charlson (ICC) al momento del diagnóstico.(7) Se recogieron los valores de Creatinina, filtrado glomerular y proteinuria al momento del diagnóstico, a los 6 meses, al año y al fin de seguimiento. Las características histológicas de las biopsias renales fueron registradas según criterios de Banff 2017.

El HLA tanto del donante como del receptor, así como la presencia de DSA al momento del trasplante y diagnóstico de aABMR, fueron recogidos.

El tipo de donante, la inmunosupresión y tratamiento del rechazo se analizaron al momento del diagnóstico de aABMR y en el período de seguimiento.

Se registraron las infecciones que requirieron hospitalización al menos por 48 horas durante el primer año tras el diagnóstico de ABMR.

2.2. Diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos y biopsias de seguimiento

Las decisiones de realizar una biopsia renal diagnóstica y de control, así como el tratamiento del paciente se basaron en el juicio clínico del médico tratante al momento del diagnóstico del aABMR.

El diagnóstico de aABMR se estableció siguiendo los criterios de Banff de 2017.(196)

La fecha en la que se realizó la biopsia diagnóstica se consideró como la fecha de diagnóstico del rechazo.

La presencia de DSA se probó mediante la prueba de antígeno aislado (LIFECODES® Single Antigen, Immucor, Georgia, EE. UU.). Un alelo se consideró positivo si el MFI era superior a 1500 y 4 veces mayor que el antígeno reactivo más bajo del mismo locus.

2.3. Definición de resultados

El resultado primario fue la supervivencia del injerto renal censurada por muerte al año y en el período de seguimiento, entre pacientes con y sin inflamación persistente en la biopsia de control, tanto microvascular (MVI, definida como $g + ptc \geq 1$) o como tubular ($t \geq 1$), definido por criterios de Banff.

Los resultados secundarios se definieron como la función del injerto renal a los seis meses y en el seguimiento después del rechazo.

La función del injerto se evaluó mediante la creatinina sérica, y el filtrado glomerular estimado (FGe), según la ecuación CKD-EPI.(197) Se utilizó la relación proteína/creatinina en muestra puntual de orina (UPCR) para evaluar la presencia de proteinuria.(198)

La supervivencia del paciente se definió como el último día de seguimiento o la fecha de fallecimiento. La falla del injerto renal se describió como un regreso a la diálisis o un nuevo trasplante.

La respuesta al tratamiento se definió como una mejora o estabilización del FGe a los seis meses, con respecto al momento del diagnóstico de aABMR.

2.4. Descripción del tratamiento

Los recambios plasmáticos (RP) se realizaron en separadores Cobe Spectra o Spectra Optia (Terumo BCT, Lakewood, CO, EE. UU.) Utilizando albúmina al 5% (Albutein® 5%, Grífols, España) como solución de reemplazo. En cada sesión se intercambió un volumen de plasma, como se ha reportado previamente.(199) Cada dos RP se administró una dosis de IVIg de 200 mg/kg.

La dosis y el número de administraciones de rituximab y corticoides fueron decididas por el médico tratante al momento del diagnóstico de aABMR.

2.4. Análisis Estadístico

Los datos se presentan como media (desviación estándar, DE) para las variables paramétricas y mediana (rango intercuartílico [IQR]) para las no paramétricas. Las pruebas correspondientes utilizadas fueron la prueba t, prueba de McNemar, prueba de Wilcoxon, Chi-Cuadrado y ANOVA según correspondiera. Se utilizó Kaplan-Meier para estimar la supervivencia del injerto y se comparó mediante la prueba de Log-Rank. Se realizó una regresión proporcional de Cox para evaluar los riesgos de pérdida del injerto. El análisis estadístico se realizó utilizando el software IBM SPSS Statistics 26.0 (SPSS, Inc; Chicago, Illinois), para Windows. Todas las pruebas fueron bilaterales y el nivel de significancia se definió como un valor de $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Características basales del donante y del receptor

Desde enero de 2004 hasta diciembre de 2019, 116 receptores de trasplante de renal fueron diagnosticados de ABMR. En la Tabla 1 se resumen los datos demográficos y clínicos en el momento del diagnóstico y la figura 1 muestra el diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio. La mayoría de pacientes incluidos fueron hombres (59,5%), con una edad media al rechazo de $50,8 \pm 14$ años y una mediana de seguimiento desde el diagnóstico de ABMR de 33,5 [62,7] meses. El tiempo mediano en diálisis fue de 4 años.

El 76% de los donantes fueron cadavéricos. Hasta el 48% de los pacientes habían recibido un trasplante renal previo, y un 14% presento una prueba cruzada por citometría positiva al momento del trasplante.

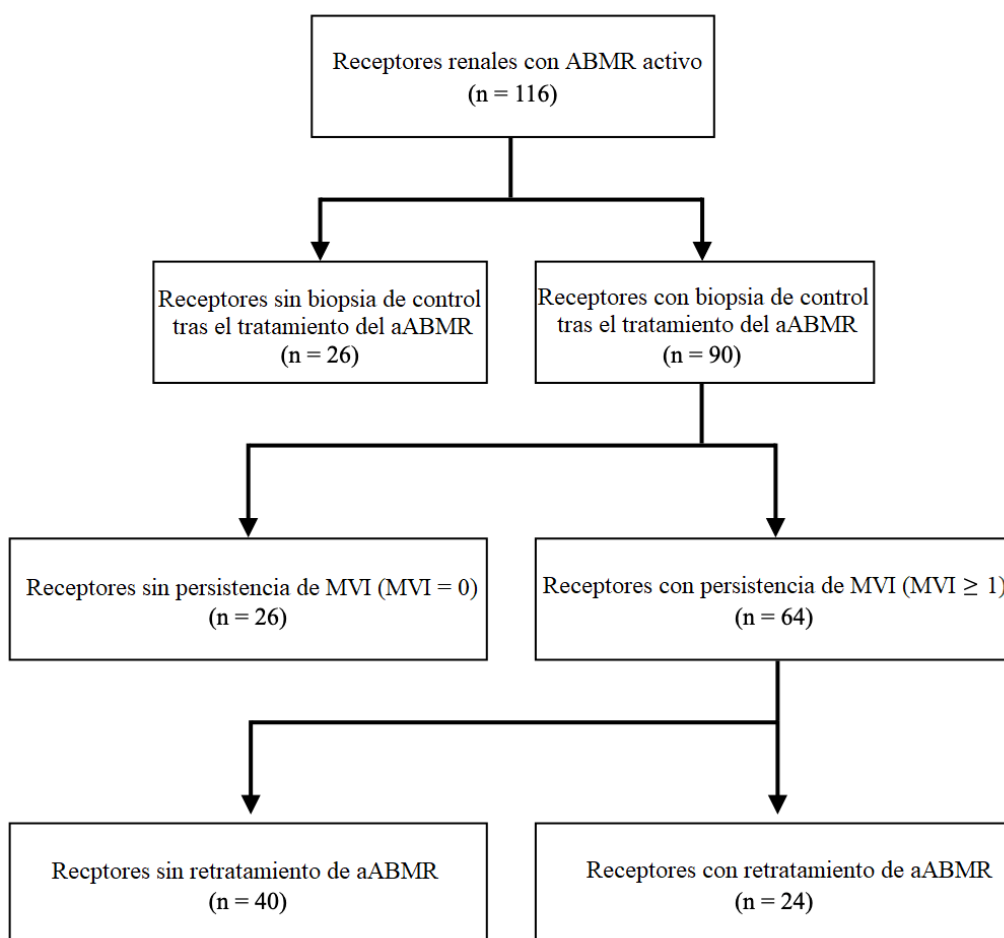


Figura 1. Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio

Al momento del diagnóstico del rechazo, 27 pacientes requirieron diálisis. En cuanto a las características del rechazo (Tabla 1), la mediana del tiempo desde el trasplante hasta diagnóstico fue de 27,5 [287,7] días, siendo el 70,7% (n 82) de los episodios diagnosticados dentro de los 6 meses posteriores al trasplante; estos episodios se consideraron rechazos tempranos y tuvieron una mediana de 16 [21,5] días desde el trasplante al diagnóstico de aABMR.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas en el momento del diagnóstico de ABMR

	Pacientes (n = 116)
Donante	
Edad (años)	54,67 ± 14,29
Genero (hombre)	59 (50,9)
DDKT	83 (71,6)
DCD	12 (10,3)
Receptor	
Edad del receptor (años)	50,8 ± 14
Genero del receptor (hombre)	69 (59,5%)
Tiempo en diálisis (años)	4 [4]
Modalidad de diálisis	
Pre diálisis	19 (16,4)
Hemodiálisis	88 (75,9)
Diálisis Peritoneal	9 (7,7)
Hipertensión (si)	88 (75,9)
DM (si)	20 (17,2)
Vasculopatía (si)	19 (16,4)
VHC (si)	29 (25)
ESRD etiología	
ADPKD	17 (14,7)
Urológica	29 (25)
Glomerulonefritis	26 (22,4)
Nefropatía diabética	12 (10,3)
Nefroangioesclerosis	7 (6)
Desconocida	25 (21,6)
TR previo	56 (48,3)
HLA mismatch	4,1 ± 1,55
ABO incompatibilidad (si)	16 (13,8)

DSAs pretrasplante (si)	30 (25,8)
DSAs al diagnóstico de ABMR (si)	73 (62,9)
cPRA > 50% (si)	18 (15,5)
CF-CM al TR (positivo)	17 (14,65)
Luminex al TR (positivo)	
Clase I	39 (33,6)
Clase II	44 (37,9)
Inmunosupresión de inducción (si)	112 (96,6)
Basiliximab	39 (33,6)
Rituximab	22 (18,9)
Timoglobulina	68 (58,6)
Inmunosupresión de mantenimiento	
Tacrolimus	79 (68,1)
mTORi	38(32,8)
Micofenolato	89 (76,7)
Corticoides	97(83,6)
Características del rechazo al diagnóstico de ABMR	
Rechazo celular	16 (13,8)
Tiempo desde el TR hasta el ABMR (días)	27,5 [287,7]
ABMR < 6meses después del TR (si)	82 (70,69)
Necesidad de diálisis al ABMR (si)	32 (27,6)
Tratamiento del ABMR al diagnóstico (si)	116 (100)
Recambio plasmático	111 (95,7)
IVIg	111 (95,7)
Rituximab	101 (87,1)
Corticoides	116 (100)

Los datos son media \pm Desviación estándar, mediana [IQR] o N (%), a menos que se especifique lo contrario. ABMR, rechazo mediado por anticuerpos; TR, trasplante de riñón; VHC, virus de la hepatitis C; DM, diabetes mellitus; ESRD, enfermedad renal en etapa terminal; ADPKD, enfermedad renal poliquística autosómica dominante; HLA, antígeno leucocitario humano; DSA, anticuerpos donante específicos; PRA, panel reactive antibodies; CF-CM, Crossmatch de citometría de flujo; mTORi, inhibidores de mTOR; DDKT, trasplante de riñón de donante fallecido; DCD, donante tras muerte cardíaca; IgIV, inmunoglobulina intravenosa

3.2 Respuesta al tratamiento y supervivencia

Todos los pacientes recibieron tratamiento para el ABMR con una combinación de corticoides (100%), PE e IgIV (95,7%) y rituximab (87,1%). Se intercambiaron volúmenes de plasma en cada sesión con una mediana de 5 [1] sesiones.

La respuesta global al tratamiento fue del 54,3%, con un aumento significativo del FGe a los 6 meses después del tratamiento, la tabla 2 resume los cambios en el FGe.

Los pacientes con un rechazo temprano (<6 meses desde el trasplante, mediana 16 [21,5] días) tuvieron una mejor respuesta que aquellos con un rechazo tardío (mediana 25,9 [40] meses), respuesta del 67% frente a 23,5% para rechazo temprano y tardío respectivamente, OR 0,15 [IC 95% 0,06 – 0,38], $P < 0,001$.

Tabla 2. Creatinina, filtrado glomerular estimado y proteinuria tras el diagnóstico de ABMR.

	Al diagnóstico aABMR (N =116)	A los 6 meses (N = 98)	Al seguimiento (N = 63)	<i>P</i> *
Cr (mg/dL)	3,67 ± 1,97	2,31 ± 1,49	2,3 ± 1,14	<0,001
FGe (mL/min)	25,21 ± 16,3	37,63 ± 18,9	36,9 ± 20	0,003
Proteinuria (mg/g)	585 [980,5]	482 [1070]	437 [1194,5]	0,69

* Respecto a la línea de base. aABMR, rechazo activo mediado por anticuerpos; Cr, creatinina sérica; eGFR, filtrado glomerular estimado.

La pérdida del injerto global al año del rechazo y durante todo el seguimiento fue del 32,8% y del 38,8%, respectivamente y el fracaso del injerto censurado por mortalidad para los mismos puntos de tiempo fue del 25,9% y el 31% respectivamente.

La presencia de DSA en el momento del diagnóstico no se asoció con una peor supervivencia del injerto ($p = 0,15$).

Los hallazgos histopatológicos al momento del diagnóstico de ABMR y en las biopsias de seguimiento se resumen y comparan en la Tabla 3.

Tabla 3. Hallazgos histopatológicos según clasificación de Banff en biopsias de diagnóstico y control.

	At diagnosis (n = 116)	Control Biopsy (n = 90)	P
g	0,84 ± 0,95	0,88 ± 1,06	0,98
ptc	1,43 ± 0,94	0,99 ± 1,01	0,001
MVI (g+ptc)	2,27 ± 1,35	1,87 ± 1,78	0,02
t	0,45 ± 0,82	0,24 ± 0,57	0,03
i	0,68 ± 0,91	0,46 ± 0,77	0,01
ti	0,53 ± 0,8	0,53 ± 0,78	0,4
v	0,2 ± 0,56	0,03 ± 0,23	0,002
mm	0,09 ± 0,31	0,2 ± 0,56	0,075
ah	0,31 ± 0,7	0,42 ± 0,72	0,21
cg	0	0,19 ± 0,47	<0,001
ci	0,65 ± 0,76	1,07 ± 0,88	<0,001
ct	0,59 ± 0,73	1,06 ± 0,83	<0,001
cv	0,61 ± 0,75	0,81 ± 0,85	0,16
C4d	95 (82)	65 (56)	<0,001
IFTA	0,54 ± 0,69	0,81 ± 0,98	0,009

Los resultados se muestran como media ± DE o frecuencias absolutas (%) para las variables cuantitativas y cualitativas, respectivamente. g, glomerulitis; ptc, capilaritis peritubular; t, tubulitis; i, inflamación intersticial; ah, hialinosis arterial; cg, glomerulopatía por trasplante; ci, fibrosis intersticial; ct, atrofia tubular; IFTA, fibrosis intersticial + atrofia tubular; cv, engrosamiento de la íntima fibrosa vascular.

La Tabla 4 resume las asociaciones de las características histológicas al diagnóstico y en la biopsia de seguimiento con la pérdida del injerto al año y durante el seguimiento.

La presencia de tubulitis al momento del diagnóstico del rechazo se asoció con un mayor riesgo de pérdida del injerto al año (OR 1,79 [IC 95% 1,05 - 3,06], P = 0,03) y en el seguimiento (HR 2,10 [IC 95% 1,04 - 4,26], P = 0,04).

La combinación de fibrosis intersticial y atrofia tubular (IFTA) y la coexistencia de un rechazo mediado por células T (TCMR) se asociaron con un mayor riesgo de pérdida del injerto durante el seguimiento (HR 1,62 [95% 1,09 - 2,40], P = 0,02 y HR 2,48 [IC 95% 1,07 - 5,76], P = 0,03 para IFTA y TCMR, respectivamente).

Tabla 4. Criterios de Banff en relación al fracaso del injerto censurado por muerte

Pérdida del injerto censurada por mortalidad				
Biopsia diagnóstico aABMR (n = 116)	A un año de seguimiento		Seguimiento total	
	OR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p-valor
Glomerulitis ≥ 1	0,73 (0,39 - 1,36)	0,31	0,92 (0,64 - 1,34)	0,68
Capilaritis peritubular ≥ 1	1,84 (1,01 - 3,35)	0,047	1,76 (0,68 - 4,56)	0,25
MVI ≥ 1	2,04 (0,54 - 7,66)	0,29	1,19 (0,93 - 1,51)	0,16
Tubulitis ≥ 1	1,79 (1,05 - 3,06)	0,03	2,10 (1,04 - 4,26)	0,04
Inflamación vascular ≥ 1	0,72 (0,22 - 2,32)	0,57	,76 (0,23 - 2,50)	0,65
TMA ≥ 1	1,27 (0,14 - 11,60)	0,83	,82 (0,11 - 6,02)	0,85
Inflamación total ≥ 1	1,32 (0,46 - 3,85)	0,6	1,07 (0,66 - 1,74)	0,78
NTA (si)	0,49 (0,13- 1,84)	0,29	0,80 (0,38- 1,67)	0,55
C4d positivo(si)	0,95 (0,25 - 3,69)	0,94	1,23 (0,42 - 3,57)	0,71
IFTA (si)	3,10 (1 - 9,64)	0,05	1,62 (1,09 - 2,40)	0,02
DSA positivo	0,68 (9,2 - 2,3)	0,53	0,74 (0,36 - 1,5)	0,4
Rechazo celular (si)	1,5 (0,39 - 6,2)	0,46	2,48 (1,07 - 5,76)	0,03
Pérdida del injerto censurada por mortalidad				
Biopsia de seguimiento (n = 90)	A un año de seguimiento		Seguimiento total	
	OR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p-valor
Glomerulitis ≥ 1	1,20 (0,37 - 3,89)	0,76	2,54 (1,17 - 5,49)	0,02
Capilaritis peritubular ≥ 1	4,83 (1,00- 23,25)	0,049	2,99 (1,27 - 7,07)	0,01
MVI ≥ 1	1,73 (0,52 - 5,76)	0,37	4,50 (1,35 - 14,96)	0,01
Tubulitis ≥ 1	1,85 (0,79 - 4,31)	0,15	2,88 (1,24 - 6,69)	0,01
Inflamación vascular ≥ 1	1,09 (0,21 - 5,60)	0,99	0,85 (0,26- 2,83)	0,79
TMA ≥ 1	11,41 (2,54 - 51,31)	0,001	3,70 (1,50 - 9,15)	0,005
Inflamación total ≥ 1	3,14 (0,93 - 10,56)	0,06	4,56 (1,53 - 13,56)	0,006
NTA (si)	8,11 (1,72 - 38,19)	0,008	4,56 (1,53 - 13,56)	0,006
C4d positivo(si)	2,34 (0,48 - 11,42)	0,29	1,77 (0,60 - 5,19)	0,29
GT (si)	4,72 (1,27 - 17,61)	0,02	2,24 (1,33 - 3,77)	0,002
IFTA (si)	1,43 (0,81 - 2,52)	0,21	1,62 (1,14 - 2,32)	0,008
DSA positivo	0,63 (0,16 - 2,47)	0,75	0,72 (0,32 - 1,62)	0,43
Rechazo celular (si)	1,6 (0,22 - 3)	0,63	3 (1,06 - 8,8)	0,039

Los resultados se muestran como media \pm DE. MVI Inflamación microvascular, MAT microangiopatía trombótica, NTA necrosis tubular aguda, GT glomerulopatía del trasplante, IFTA: fibrosis intersticial y atrofia tubular, DSA Anticuerpos donante específicos.

3.3. Impacto de la inflamación persistente en biopsias de control

Se realizó una biopsia de seguimiento después del tratamiento del aABMR en 90 pacientes (77,6%), con una mediana de tiempo desde el tratamiento de 2 [4] meses. En general, hubo una disminución significativa de la inflamación y un aumento de los parámetros de cronicidad entre la biopsia inicial y la de seguimiento, Tabla 3.

De los 90 pacientes re-biopsiados, el 51% (n = 46) presento respuesta clínica al tratamiento del ABMR, con mejoría o estabilización de la función renal, aunque el 71% (n = 64) persistió con un MVI ≥ 1 y el 50% (n = 45) con un MVI ≥ 2 . De los 46 pacientes con mejoría en la función del injerto, el 56% (n = 26) tuvieron persistencia de un MVI ≥ 1 . No hubo diferencias estadísticamente significativas en las características basales entre los pacientes con y sin MVI persistente (Tabla 5). El tiempo entre el trasplante de riñón y la biopsia del injerto fue similar entre los pacientes con y sin persistencia de la inflamación en las biopsias de seguimiento (p = 0,23) también la presencia de DSA fue similar entre los dos grupos (P = 0.09).

La supervivencia del injerto renal, censurado por muerte, fue significativamente menor en los casos de inflamación microvascular persistente, Log-Rank 0,002, Figura 2A-C. En el análisis de regresión de Cox, la persistencia de lesiones inflamatorias agudas en las biopsias de seguimiento (glomerulitis, capilaritis peritubular, MVI, tubulitis, necrosis tubular aguda y microangiopática trombótica), aumentó significativamente el riesgo de pérdida del injerto renal a lo largo del seguimiento (Tabla 4). Además, la presencia de necrosis tubular aguda y microangiopática trombótica se asociaron con pérdida del injerto al año del tratamiento del ABMR.

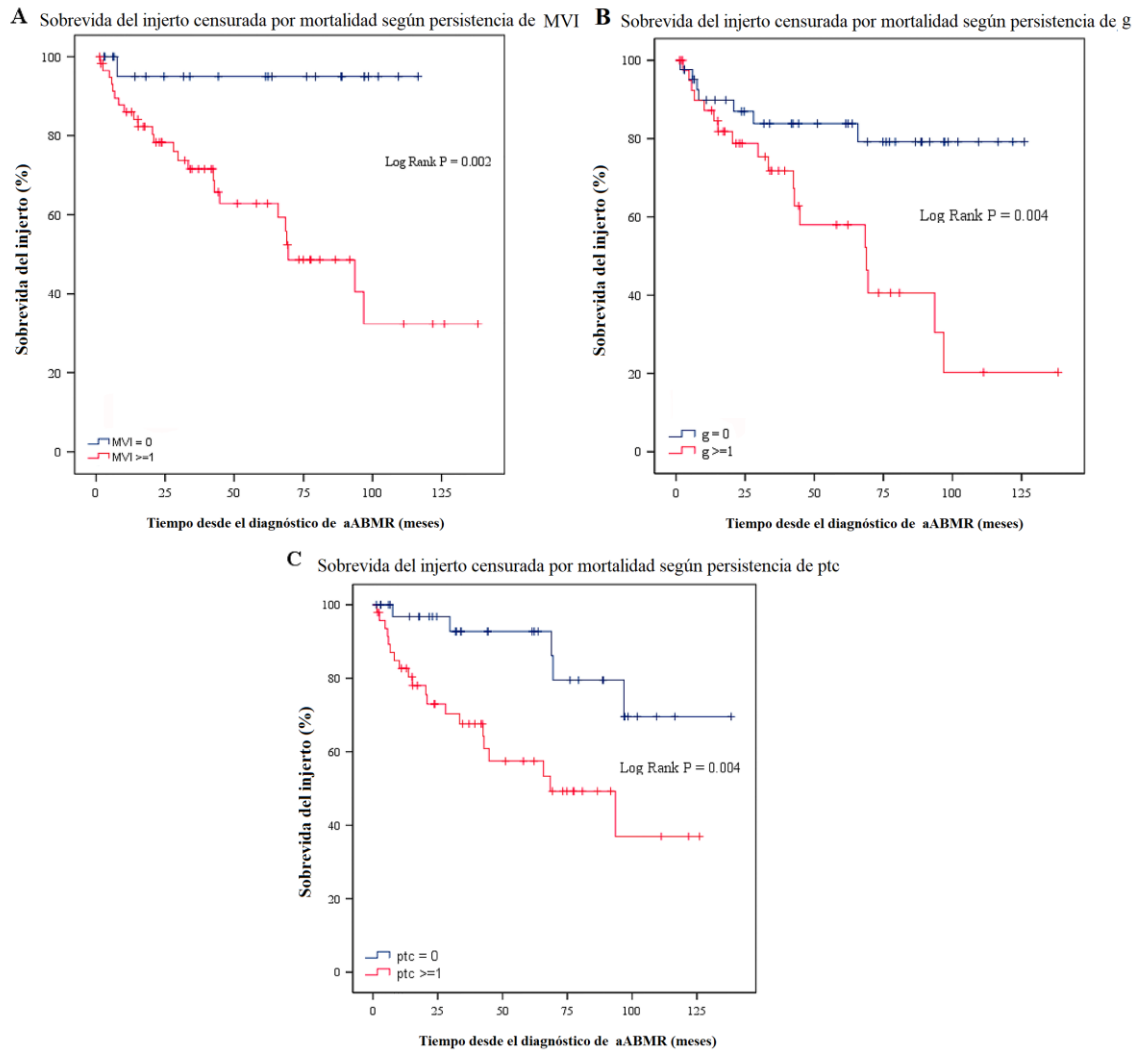


Figura 2. Supervivencia del injerto, censurada por mortalidad, en relación a la inflamación microvascular. MVI inflamación microvascular, g glomerulitis, ptc capilaritis peritubular.

De los 64 pacientes con MVI persistente, 24 (37,5%) fueron tratados nuevamente con una combinación de rituximab (n = 5) y RP (n = 19). La supervivencia del injerto renal, censurada por mortalidad, fue significativamente mayor para los pacientes con MVI persistente en la biopsia de control que fueron re-tratados (95%, 73% vs 75%, 50%, a 1, y 5 años después del re-tratamiento), P = 0,04, Figura 3. También en el análisis de Cox, el re-tratamiento para aquellos pacientes con MVI persistente se asoció con un

menor riesgo de pérdida del injerto (HR 0,40 [IC del 95%: 0,16 - 0,99]), $P = 0,048$.

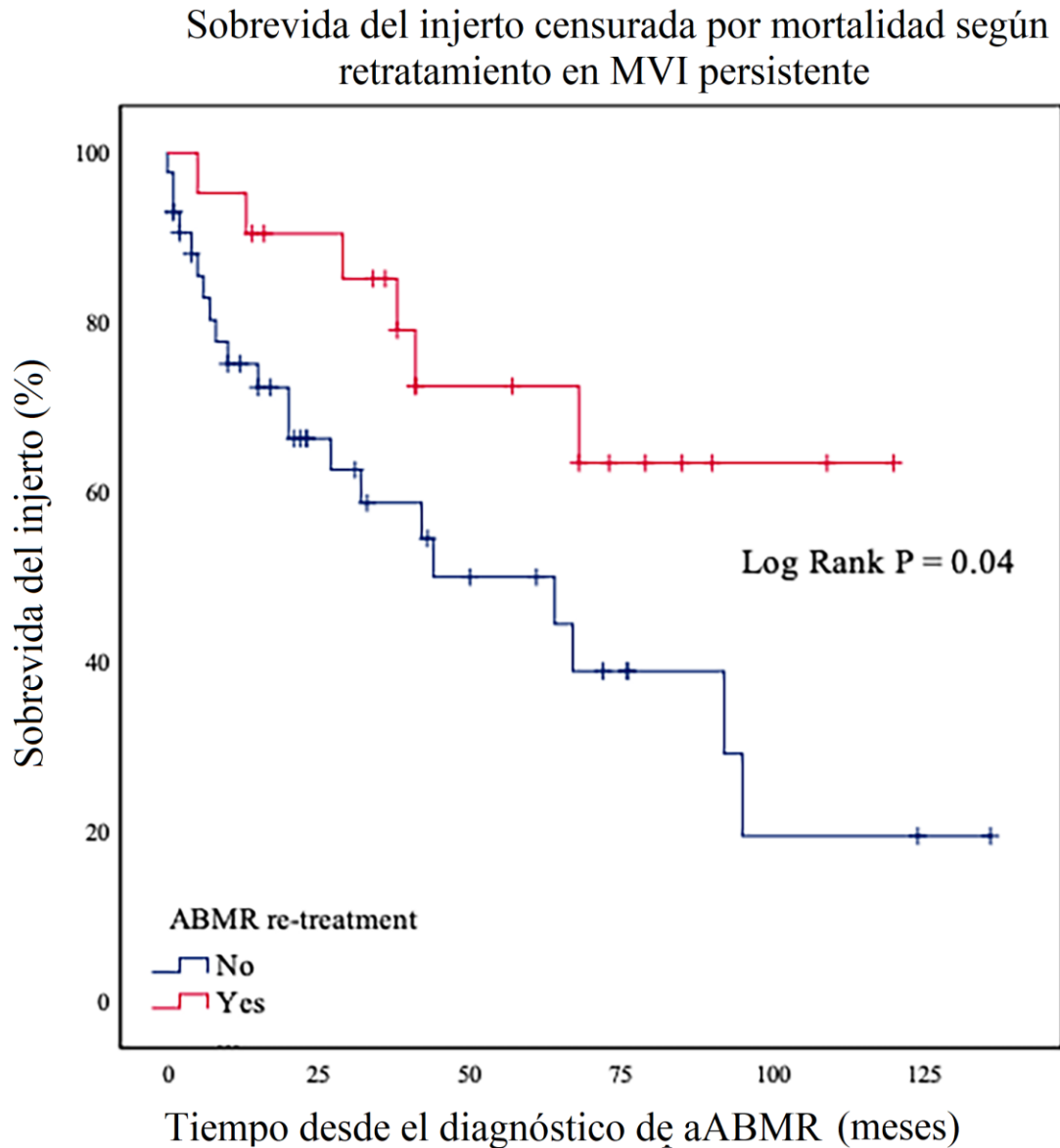


Figura 3. Supervivencia del injerto, censurada por mortalidad, en los pacientes con persistencia de MVI con y sin retratamiento

Se observó tubulitis en el 19% ($n = 17$) de las biopsias de control, de las cuales 13 no cumplían criterios de diagnóstico de TCMR activo o crónico. Los pacientes con $t \geq 1$ en las biopsias de control presentaron peor supervivencia del injerto renal al año (66% y 44%, $p = 0,02$) (Figura 4). Además, la persistencia de la tubulitis en las biopsias de control aumentó significativamente

el riesgo de pérdida del injerto renal (HR 2,88 IC del 95% [1,24 - 6,69], $P = 0,01$), Tabla 4.

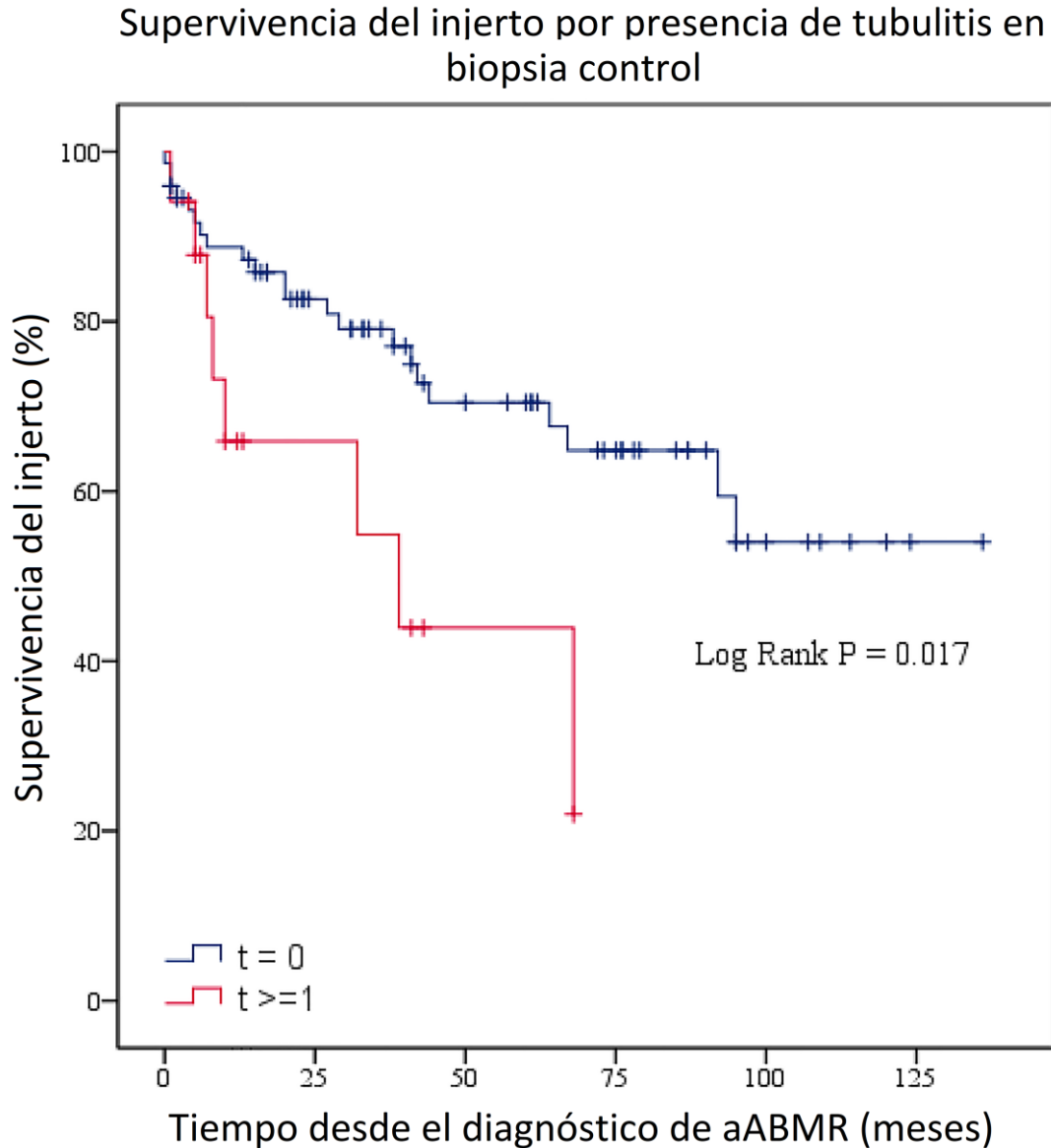


Figura 4. Supervivencia del injerto, censurada por mortalidad, en relación a la presencia de tubulitis en la biopsia de control.

3.4. Lesiones crónicas en biopsias de control

El presencia de glomerulopatía de trasplante (GT) (HR 2,24 [IC 95% 1,33 - 3,77], $P = 0,002$), e IFTA (HR 1,62 [IC 95% 1,14 - 2,32], $P = 0,008$) en biopsias de control se asociaron con un aumento del riesgo de fallo del injerto renal

durante el seguimiento. La GT también se asoció con un mayor riesgo de pérdida del injerto durante el primer año tras el tratamiento (OR 4,72 [IC del 95%: 1,27 - 17,61], P = 0,02), Tabla 4.

3.5 Complicaciones infecciosas

Durante el año años siguientes al tratamiento con ABMR, 101 infecciones requirieron ingreso hospitalario al menos 48 horas en 57 pacientes, lo que supuso una tasa de infección de 0,87 infecciones / paciente tratado.

La presencia de comorbilidades se asoció al desarrollo de complicaciones infecciosas que requirieron ingreso hospitalario. Un ICC ≥ 4 se asoció con un mayor riesgo de infecciones, OR = 4,2 (IC95% 1,79 - 9,81, p = 0,01).

Dado que la historia de inmunosupresión recibida puede relacionarse con el desarrollo de infecciones intentamos encontrar una asociación entre ellas. Los siguientes ítems no se asociaron con el desarrollo de infecciones; el tiempo transcurrido desde el trasplante hasta el tratamiento del rechazo (p = 0,72), la inducción con timoglobulina (p = 0,31), la inducción con rituximab (p = 0,7), la historia de trasplante renal previo (p = 0,58), ni tampoco la realización de un retratamiento del ABMR (p = 0,31).

4. Comunicaciones surgidas de este objetivo:

Presentaciones a congresos:

- Retrospective analysis of kidney transplant recipients with antibody-mediated rejection. Piñeiro GJ, De Sousa E, Rovira J, Villarreal J, Lozano M, Cid J, Solé M, Jimenez M, Oppenheimer F, Diekmann F. 2017 BANFF - SCT Joint Scientific Meeting (Poster communication).
- Retrospective Analysis of Kidney Transplant Recipients with Antibody-Mediated Rejection. G. Piñeiro, E. Desousa, J. Villarreal, M. Lozano, J. Cid, M. Sole, F. Oppenheimer, F. Diekmann. 2017 American Transplant Congress Abstract number: B71

5. Conclusión

El tratamiento para ABMR tiene una eficacia relativamente baja; sólo el 54,3% de los pacientes presentó una estabilización o mejoría en la función del injerto renal a los seis meses del ABMR. La efectividad del tratamiento varía según el tiempo de presentación entre el trasplante y el rechazo; 67% vs. 23% en ABMR temprano vs. tardío, respectivamente.

El 64 (71%) de los pacientes con biopsias de seguimiento persistían con inflamación microvascular y 17 (19%) con tubulitis.

La supervivencia del injerto censurada por muerte fue significativamente menor en los pacientes con MVI y tubulitis persistente.

La persistencia de inflamación en las biopsias de seguimiento después del tratamiento del ABMR se asocia con un mayor riesgo de pérdida del injerto.

Los pacientes presentaron una tasa elevada de infecciones que requirieron tratamiento hospitalario, 0,87 infecciones / paciente tratado.

La presencia de comorbilidades se asocio al desarrollo de complicaciones infecciosas. Un ICC ≥ 4 se asoció con un mayor riesgo de infecciones.

Objetivo 2

Caracterizar la eficacia y factores pronósticos del tratamiento con Rituximab, IVIG y recambios plasmáticos en el rechazo renal crónico activo mediado por anticuerpos. Describir las complicaciones infecciosas en el post tratamiento.

1. Justificación del objetivo:

El rechazo crónico activo mediado por anticuerpos (caABMR) es una de las principales causas de fallo del aloinjerto renal en trasplantes de riñón.(64,68) A pesar de su importancia clínica, la evidencia disponible sobre el tratamiento del caABMR es escasa. De forma similar al tratamiento del ABMR, muchos centros utilizan combinaciones de RP, IVIg y rituximab para su tratamiento. Pero la evidencia actual es contradictoria.(124–127,130) Por otro lado, las complicaciones infecciosas asociadas al tratamiento son un aspecto a tener en cuenta.

2. Material y Métodos

2.1. Diseño del estudio y población de pacientes

Estudio retrospectivo longitudinal unicéntrico.

Criterios de inclusión:

- a) Pacientes receptores de riñón diagnosticados con rechazo crónico activo mediado por anticuerpos (caABMR) desde el 1 de enero de 2006 hasta el 31 de diciembre de 2015.
- b) Presencia de TG ($cg \geq 1$ en la clasificación histopatológica de Banff) coexistiendo con lesión microvascular (MVI) ≥ 2 ($g + ptc \geq 2$), con tinción positiva de C4d o negativa en capilares peritubulares y anticuerpos donante específicos (DSA) positivos o negativos.(196)

Grupo tratamiento: Todos los pacientes que recibieron tratamiento con RP, IBIg y rituximab se incluyeron en el grupo de tratamiento.

Grupo control: Los pacientes que no recibieron RP, IVIg o rituximab, ya sea de forma aislada o en combinación, se incluyeron en el grupo control.

VARIABLES DEL ESTUDIO

Variable principal:

Supervivencia del injerto censurada por mortalidad.

VARIABLES SECUNDARIAS:

Se incluyeron datos demográficos, clínicos y índice de comorbilidad de Charlson (ICC) al momento del diagnóstico.(7) De acuerdo con otros grupos, el ICC no se ajustó por edad, y la puntuación mínima de nuestros pacientes fue 0 (no se agregaron 2 puntos por insuficiencia renal).(200,201)

Se evaluó la función renal y la proteinuria al diagnóstico de c-aABMR, 6 meses antes del mismo y 6, 12, 24 meses después del diagnóstico y al final del seguimiento. La función renal se determinó mediante la creatinina sérica y el FGe. La proteinuria se evaluó mediante el índice de proteinuria/creatinina.¹⁴ Se analizaron las infecciones que requirieron hospitalización al menos 48 h

durante el primer año tras el diagnóstico de c-aABMR. Se registraron todos los eventos adversos inmediatos, después de la infusión de IVIG, RP y Rituximab.

2.2. Diagnóstico de rechazo crónico mediado por anticuerpos:

Las decisiones de realizar una biopsia renal diagnóstica y de control, así como el tratamiento del paciente se basaron en el juicio clínico al momento del diagnóstico de caABMR.

El diagnóstico de caABMR se estableció siguiendo los criterios de Banff de 2017.(196)

La fecha en la que se realizó la biopsia diagnóstica se consideró como la fecha de diagnóstico del caABMR.

La presencia de DSA se probó mediante la prueba de microesferas de antígeno aislado (LIFECODES® Single Antigen, Immucor, Georgia, EE. UU.). Un alelo se consideró positivo si el MFI era superior a 1500 y 4 veces mayor que el antígeno reactivo más bajo del mismo locus.

2.3. Definición de resultados

Nuestro resultado primario fue la supervivencia del injerto renal censurada por muerte entre pacientes tratados con RP, IVIg y rituximab (grupo tratamiento) y el grupo control.

Los resultados secundarios se definieron como la función del injerto renal a los seis meses y el seguimiento después del tratamiento con ABMR.

La función del injerto se evaluó mediante la creatinina sérica, y el filtrado glomerular estimado (FGe), según la ecuación la fórmula Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) y la relación proteína/creatinina en muestra puntual de orina (UPCR).(198)

La supervivencia del paciente se definió como el último día de seguimiento o la fecha de muerte. La falla del injerto renal se describió como un regreso a la diálisis o un nuevo trasplante.

2.4. Descripción del tratamiento

Los recambios plasmáticos (RP) se realizaron en separadores Cobe Spectra o Spectra Optia (Terumo BCT, Lakewood, CO, EE. UU.) Utilizando albúmina al

5% (Albutein® 5%, Grífols, España) como solución de reemplazo. En cada sesión se intercambió un volumen de plasma, como se ha reportado previamente.(199) Cada dos RP se administró una dosis de IVIg de 200 mg/kg. La dosis y el número de administraciones de rituximab y corticoides fue decidido por el médico tratante al momento del diagnóstico de ABMR.

2.5 Análisis estadístico

Los datos se describieron como media con desviación estándar (DE) o error estándar de la media (SEM), en el caso de presentación gráfica para variables cuantitativas y como frecuencias absolutas y relativas (%) para variables cualitativas. Las comparaciones entre el grupo tratado y control se hicieron mediante la prueba t, exacta de Fisher, o la prueba U de Mann-Whitney para grupos independientes. Se utilizó Kaplan-Meier y la prueba Log-Rank para analizar la supervivencia y comparar ambos grupos.

Realizamos una estimación cruda del efecto del tratamiento sobre la evolución del FGe mediante el modelo de ecuación de estimación generalizada (GEE) utilizando una matriz AR (1) para estimar la correlación intraindividual. Estos modelos incluyeron el efecto del tratamiento, el tiempo de seguimiento y su interacción con el tratamiento. Los modelos GEE del efecto del tratamiento se ajustaron para factores confusionales dentro de los cuales se incluyeron a las complicaciones infecciosas.

Se evaluó el poder predictivo de los cambios de FGe (Δ de cambio) entre 6 meses antes del diagnóstico y el momento del diagnóstico. Se definió un punto de corte utilizando el Cociente de probabilidad (LR +) definido como relación sensibilidad / (1-especificidad) de una curva ROC [22]. Se realizó una estimación del riesgo de pérdida del injerto a los 24 meses debido al tratamiento o a un alto delta de cambio en el FGe calculando los odds ratios (OR) y sus intervalos de confianza al 95% a partir de modelos de regresión logística. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics V20.0 (IBM Corp, Armonk, NY, EE. UU. Todas las pruebas fueron de bilaterales y el nivel de significancia se definió como un valor de P <0,05.

3. Resultados

La triple terapia, RP, IVIg y rituximab, no confiere protección a los pacientes que presentan caABMR. Concretamente, no hubo diferencias significativas en la supervivencia del injerto entre los dos grupos. El número de pérdidas del injerto a los 12 y 24 meses y la disminución de la FGe no fueron diferentes ni independientes del tratamiento.

Las infecciones que requirieron hospitalización durante el primer año después del diagnóstico de caABMR fueron significativamente más frecuentes en los pacientes tratados (OR = 4,22; P = 0,013), con una relación infección / paciente-año de 0,65 y 0,20 respectivamente.

Se identificó un marcador pronóstico para la pérdida del injerto, independientemente de la actuación médica tras el diagnóstico caABMR. Aquellos pacientes que presentaban una disminución de la FGe ≥ 13 ml / min entre los 6 meses previos y el diagnóstico de caABMR, tenían mayor riesgo de pérdida del injerto a los 24 meses (OR = 5; P = 0,01).

4. Comunicaciones surgidas de este objetivo:

Presentaciones a congreso:

- Piñeiro GJ, Rovira J, De Sousa-Amorim E, Solé M, Revuelta I, Cid J, Lozano M, Palou E, Campistol JM, Oppenheimer F, Diekmann F. Treatment of active chronic antibody-mediated rejection: dangerous and useless? 2017 ESOT congress.
- Piñeiro G., Rovira J., De Sousa-Amorim E., Villarreal J., Sole M., Revuelta I., Lozano M., Palou E., Oppenheimer F., Campistol J., Diekmann F. Treatment of Active Chronic Antibody-Mediated Rejection with Rituximab, IVIG and Plasma Exchange 2018 American Transplant Congress (Oral presentation). Am J Transplant. 2018;18 (suppl 4).

Rituximab, plasma exchange and immunoglobulins: an ineffective treatment for chronic active antibody-mediated rejection.

Gastón J Piñeiro, Erika De Sousa-Amorim, Manel Solé, José Ríos, Miguel Lozano, Frederic Cofán, Pedro Ventura-Aguiar, David Cucchiari, Ignacio Revuelta, Joan Cid, Eduard Palou, Josep M Campistol, Federico Oppenheimer, Jordi Rovira & Fritz Diekmann.

***BMC Nephrol* 19, 261 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12882-018-1057-4>**

5. Conclusiones

El tratamiento del caABMR, con RP, IVIg y rituximab, no mejoró la supervivencia del injerto y se asoció con un aumento significativo de complicaciones infecciosas graves.


📖 “Piñeiro, G.J., De Sousa-Amorim, E., Solé, M. *et al.* Rituximab, plasma exchange and immunoglobulins: an ineffective treatment for chronic active antibody-mediated rejection. *BMC Nephrol* 19, 261 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12882-018-1057-4>”.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Rituximab, plasma exchange and immunoglobulins: an ineffective treatment for chronic active antibody-mediated rejection

Gastón J Piñero^{1,2}, Erika De Sousa-Amorim¹, Manel Solé³, José Ríos^{4,5}, Miguel Lozano⁶, Frederic Cofán¹, Pedro Ventura-Aguiar^{1,2}, David Cucchiari^{1,2}, Ignacio Revuelta^{1,2,7}, Joan Cid⁶, Eduard Palou⁸, Josep M Campistol^{1,7}, Federico Oppenheimer¹, Jordi Rovira^{2,7*†}  and Fritz Diekmann^{1,2,7*†}

Abstract

Background: Chronic active antibody-mediated rejection (c-aABMR) is an important cause of allograft failure and graft loss in long-term kidney transplants.

Methods: To determine the efficacy and safety of combined therapy with rituximab, plasma exchange (PE) and intravenous immunoglobulins (IVIG), a cohort of patients with transplant glomerulopathy (TG) that met criteria of active cABMR, according to BANFF'17 classification, was identified.

Results: We identified 62 patients with active c-aABMR and TG ($cg \geq 1$). Twenty-three patients were treated with the combination therapy and, 39 patients did not receive treatment and were considered the control group. There were no significant differences in the graft survival between the two groups. The number of graft losses at 12 and 24 months and the decline of eGFR were not different and independent of the treatment. A decrease of eGFR ≥ 13 ml/min between 6 months before and c-aABMR diagnosis, was an independent risk factor for graft loss at 24 months (OR = 5; $P = 0.01$). Infections that required hospitalization during the first year after c-aABMR diagnosis were significantly more frequent in treated patients (OR = 4.22; $P = 0.013$), with a ratio infection/patient-year of 0.65 and 0.20 respectively.

Conclusions: Treatment with rituximab, PE, and IVIG in kidney transplants with c-aABMR did not improve graft survival and was associated with a significant increase in severe infectious complications.

Trial registration: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS): 14566/RG 24161. Study code: UTR-INM-2017-01.

Keywords: Kidney transplantation, Transplant glomerulopathy, Chronic active antibody-mediated rejection, Rituximab, Infections

Background

Chronic active antibody-mediated rejection (c-aABMR) is a major cause of renal allograft failure in kidney transplants [1, 2]. Transplant glomerulopathy (TG), one of the histological features of c-aABMR, results from continuous

endothelial injury and repair processes, leading to pathological multi-layering of the glomerular basement membrane [3]. The prevalence of TG increases over time after transplantation and has been associated with reduced allograft outcomes, with a mean allograft survival of 2 years after diagnosis [2, 4–6].

Despite its clinical significance the available evidence on treatment of c-aABMR with TG is scarce. Similar to the treatment of active antibody-mediated rejection, many centers use combinations of plasma exchange (PE), immunoglobulin (IVIG) and rituximab (RTX)

* Correspondence: jrovira1@clinic.cat; fdiekman@clinic.cat

[†]Jordi Rovira and Fritz Diekmann contributed equally to this work.

²Laboratori Experimental de Nefrologia i Trasplantament (LENIT), IDIBAPS, Barcelona, Spain

¹Department of Nephrology and Renal Transplantation, ICNU, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



therapy for c-aABMR. Small and retrospective series of cases reported a slight improvement in patients with c-aABMR under IVIG and rituximab treatment [7–10]. In contrast, in two recent patients series, improvements of graft survival were not observed when comparing untreated with treated patients, whereas treated patients suffered a higher incidence of complications and adverse effects [11, 12]. However, untreated groups were small in both studies.

Recently in a randomized trial, the efficacy of rituximab and IVIG vs. placebo was tested in 24 patients with TG and DSA. There was no difference in eGFR decline. Unfortunately the study was underpowered, because the recruitment was stopped early due to low inclusion rate [13].

In the present study, we retrospectively reviewed 62 patients with c-aABMR and TG to determine the efficacy and safety of the combined therapy of RTX, PE, and IVIG.

Methods

Study population

We retrospectively reviewed our pathology database between 2006 and 2015, identified all patients with TG ($cg \geq 1$ in the Banff histopathological classification) and re-evaluated them according to Banff 2017 classification criteria [3].

The inclusion criteria were the coexistence of c-aABMR TG with microvascular injury (MVI) ≥ 2 ($g + ptc \geq 2$), with positive or negative C4d staining in peritubular capillaries and positive donor-specific antibodies (DSA). The patients with compatible histology, but negative DSA were included in the analysis as suspicious of c-aABMR. Also, TG plus positive C4d or TG with MVI = 1 plus positive DSA were included. The presence of concomitant cellular rejection required at least g of 1.

The decisions to perform a renal biopsy and patient treatment were based on the clinical judgment at c-aABMR diagnosis.

Every patient who received treatment with RTX, IVIG, and PE after diagnosis of c-aABMR was included in the treatment group. Patients who did not receive RTX, IVIG neither PE, alone or in combination, were included in the control group.

PE was performed in Cobe Spectra or Spectra Optia separators (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA) using 5% albumin (Albutein® 5%, Grifols, Spain) as a replacement solution. One plasma volume was exchanged in each session as previously reported [14].

The primary endpoint was graft survival. Secondary endpoints were the evolution of glomerular filtration rate and complications related to treatment.

The Institutional Ethics Committee approved the study. The registration number was 14,566/RG 24161

(Agencia Española del Medicamento y Producto Sanitario, AEMPS).

Clinical data

The clinical characteristics, immunosuppression, and treatment were analyzed at the time of c-aABMR diagnosis and in the follow-up period. We assessed Charlson comorbidity index (CCI) at diagnosis of c-aABMR [15]. In accordance with other groups, CCI was unadjusted for age, and the minimum score of our patients was 0 (2 points for renal insufficiency were not added) [16–19].

We assessed renal function and proteinuria at c-aABMR diagnosis, 6 months before and 6, 12, 24 months after diagnosis and at the end of follow-up. Renal function was determined by serum creatinine and by estimated glomerular filtration rate (eGFR) using the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formula [20]. Proteinuria was evaluated using the proteinuria/creatinine index [21].

Serum samples obtained at the moment of transplantation and rejection were screened for HLA class I and II antibodies using the Lifecodes LifeScreen Deluxe flow bead assay (Immucor, Stamford, CT, USA). Antibody specificities were determined using the Lifecodes Single Antigen bead assay (Immucor, Stamford, CT, USA) in patients with positive HLA antibodies.

Infections that required hospitalization at least 48 h during the first year after c-aABMR diagnosis were analyzed. All immediate adverse events (AE), after IVIG, PE and RTX infusion were registered.

Statistical analysis

Data were described as mean with standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM), in case of graphical presentation for quantitative variables and as absolute and relative (%) frequencies for qualitative variables. Group comparisons between patients with or without the intake of rituximab were made by Fisher's exact, t-test or Mann Whitney U test for independent groups. Kaplan-Meier and comparison between both groups were made using Log-Rank test, considering non-related death as censure. We performed a crude estimation of the effect of treatment on the evolution of eGFR by generalized estimating equation (GEE) model using an AR(1) matrix to estimate the intra-subject correlation. These models included treatment effect, time of follow-up and their interaction with treatment. GEE models of treatment effect were adjusted for confounding factors including infectious disease. As a useful clinical evaluation of prediction values of change of eGFR (Δ of change) from 6 months before to rejection, we proposed a cut-off using the Likelihood Ratio (LR^+) defined as ratio

sensitivity/(1-specificity) from a ROC curve [22]. Estimation of risk of graft loss at 24 months due to treatment or a high delta of change of eGFR was performed calculating odds ratios (OR) and their confidence intervals at 95% (CI 95%) from logistic regression models. All statistical analyses were performed using IBM SPSS statistics V20.0 software (IBM Corp, Armonk, NY, USA). Two-sided *P*-values < 0.05 were used to indicate statistical significance.

Results

Sixty-two patients with TG ($cg \geq 1$) and diagnosis of active c-aABMR according to Banff 2017 classification, were retrospectively identified and included in the study. Twenty-three received treatment with RTX, IVIG, and PE, whereas 39 did not receive additional treatment and were considered the control group. The median length of follow-up was 27 months.

In all patients but one, the indication of graft biopsy was in the context of deterioration of renal function or proteinuria (> 1 g/day). In the remaining patient, the biopsy was performed as follow-up biopsy after borderline rejection.

Table 1 summarized the demographic and clinical characteristics at the time of c-aABMR diagnosis. At the time of c-aABMR diagnosis, treated patients were significantly younger than those not treated 43.6 ± 13.2 vs. 53.6 ± 16.1 years ($P = 0.008$). However, CCI was not different between groups. In the two groups, the immunosuppressive regimens were similar (Table 1).

Type of donor and prior kidney transplants were not statistically different between both groups (Table 1). Mean donor age was lower in the treated group 43.05 ± 15.69 vs. 50.89 ± 11.99 years ($P = 0.035$).

Treatment

In all treated patients RTX was initiated between one and 3 weeks after c-aABMR diagnosis. 82.6% of patients treated with RTX received two doses with a mean cumulative dose of 1008 ± 342 mg.

The mean number of PE sessions was 5.8 ± 0.38 , and mean total processed volume was 24.2 ± 5.4 L. The dose of IVIG was 200 mg/kg, after every second PE.

In the control group, six patients presented concomitant acute cellular rejection and were treated with corticoids.

Graft survival censoring death was not different between both groups (Fig. 1), Log Rank $P = 0.92$. The proportion of graft loss at 12 and 24 months after c-aABMR diagnosis in treated and control groups was not statistically significant, 7 patients (30%) vs. 8 patients (34.7%) and 8 (34.7%) vs. 13 (33.3%) respectively.

Patient survival

Four patients died in the treated group, two of sepsis (10 and 45 months after the initiation of treatment) and two of sudden death at home (3 and 64 months after c-aABMR treatment). None of the patients in the control group died.

Kidney function, proteinuria, and presence of DSA

The mean eGFR at diagnosis of c-aABMR and 6 months before was not different between groups (Table 1 and Fig. 2a). Also, proteinuria at diagnosis was similar in both groups (Table 1).

The mean eGFR at 6, 12 and 24 months in treated and control patients was not different (Fig. 2a). Even if we split according to graft outcome eGFR follow-up was similar between treated and control patient. (Figs 2b and Additional file 1: Figure S1).

An elevated $\Delta eGFR$ (eGFR 6 months before diagnosis – eGFR at diagnosis of cABMR) was related to graft loss during the first 24 months after diagnosis. A proposed cut of 13 ml/min in $\Delta eGFR$ was obtained from ROC analysis with $LR^+ = 3.34$. A decrease of eGFR of 13 ml/min or more was an independent indicator of graft loss in the first 24 months with $OR = 5$ (95% CI = 1.5–16.9; $P = 0.01$). The impact of $\Delta eGFR$ was influenced neither in magnitude or statistical significance in a multivariate approach, adjusted by treatment (Table 2). Also proteinuria higher than 2.5 g/day ($LR^+ = 3.6$), adjusted for treatment, was associated with loss of graft at 24 months in both groups ($OR = 3$; 95% CI = 1.22–7.37; $P = 0.016$).

We have evaluated the impact of treatment on the deterioration of renal function in a longitudinal model analysis (Fig. 3), showing that the impairment of eGFR is independent of the treatment in a crude estimation model. Also, we evaluated the impact of treatment adjusted by possible confounding factors such as age, Charlson's index, graft loss, IFTA, microvascular inflammation (MVI), transplant glomerulopathy (TG), glomerulitis and peritubular capillaritis scores, proteinuria or presence of infections. However, the decrease in eGFR remains independent of the treatment (Fig. 3).

Proteinuria was not different in both groups at 6 and 12 months, mean 1.8 ± 1.2 vs. 1.7 ± 1.5 and 1.7 ± 1 vs. 1.8 ± 1.8 g/g ($P = 0.9$) creatinine respectively.

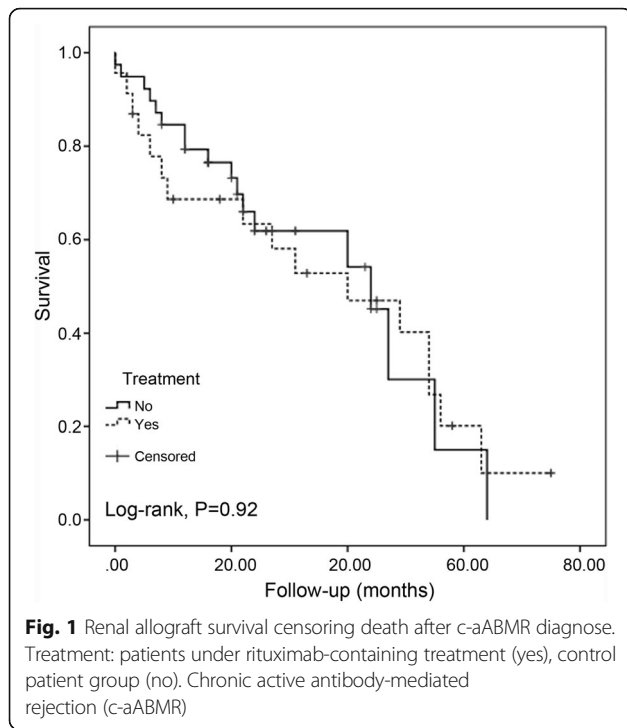
Anti-HLA antibodies were more prevalent in the treated patients, but no difference was observed in de novo DSA prevalence ($P = 0.03$ and 0.17 respectively). Regarding the DSA class, 22% were class II, 33,3% class I and, 44,4% class I and II.

The positivity of DSA and anti-HLA antibodies were not associated with worse graft survival at 24 months in our series ($P = 0.06$ and 0.65 respectively).

Table 1 Demographic and clinical characteristics

	Treatment (N = 23)	Control (N = 39)	P value
Dialysis vintage (months)	32.6 ± 24.2	41.3 ± 38.7	0.37
Donor Age	43.05 ± 15.69	50.89 ± 11.99	0.008
Donor type (Living donor)	9 (39.1%)	12 (30.7%)	0.5
First kidney transplant	13 (56.5%)	27 (69.2%)	0.31
HLA mismatch (A, B, DR)	3.27 ± 1.1	3.8 ± 1.5	0.12
Desensitization (PE + RTX)	1 (4.34%)	1 (2.56%)	0.7
Induction (Yes)	16 (69.56%)	30 (76.92%)	0.52
Thymoglobulin / ATG	10 (43.48%)	15 (38.46%)	0.7
Basiliximab	3 (13.04%)	13 (33.3%)	0.8
Other	3 (13.04%)	2 (5.12%)	0.3
IS at time of transplantation n (%)			
Tacrolimus + MMF/MPA + PDN	12 (52.2%)	24 (58.9%)	
Cyclosporine + MMF/MPA + PDN	3 (13.04%)	5 (12.82%)	
Cyclosporine + PDN	5 (21.74%)	3 (7.69%)	
mTORi + MMF/MPA + PDN	1 (4.35%)	5 (12.82%)	
Tacrolimus + mTORi + PDN	1 (4.35%)	1 (2.56%)	
Cyclosporine + mTORi + PDN		1 (2.56%)	
Cyclosporine + Azathioprine + PDN	1 (4.35%)		
Previous treated rejections of this allograft			
Cellular rejection	6 (26.1%)	10 (25%)	0.97
Humoral rejection	7 (30.4%)	6 (15.38%)	0.26
At the time of c-aABMR diagnosis			
Sex (Female/Male)	8/15	14/25	0.92
Age (years)	43.59 ± 13.2	53.6 ± 16.1	0.013
Charlson comorbidity index (CCI)	0.83 ± 1.1	0.97 ± 1.27	0.7
Time KT to active c-aABMR (months)	92.2 ± 75	93.3 ± 55.1	0.67
eGFR (mL/min) at c-aABMR diagnosis	30.9 ± 13.5	33.4 ± 11.6	0.45
eGFR (mL/min) 6 months before cABMR	40 ± 11	42.9 ± 10.2	0.3
Proteinuria (mg/g) at c-aABMR diagnosis	2286 ± 2248	1763 ± 1427	0.31
DSA (+)	6 / 9	3 / 11	0.17
Anti-HLA Antibodies (+)	13 / 16	19 / 37	0.041
IS at time of c-aABMR diagnosis n (%)			
PDN + other IS	17 (73.9%)	22 (55%)	
Tacrolimus + MMF/MPA ± PDN	9 (39.1%)	17 (42.5%)	
mTORi + MMF/MPA ± PDN	2 (8.69%)	7 (17.5%)	
Cyclosporine + MMF/MPA ± PDN	4 (17.39%)	6 (15%)	
Tacrolimus + PDN	3 (13.04%)	4 (10%)	
MMF/MPA + PDN	1 (4.34%)	3 (7.5%)	
Cyclosporine ± PDN	2 (8.69%)	2 (5%)	
Tacrolimus + mTORi ± PDN	1 (4.34%)	1 (2.5%)	
Cyclosporine + mTORi	1 (4.34%)		

Results are shown as mean ± SD or absolute frequencies (%) for quantitative and qualitative variables respectively. GFR glomerular filtrate rate, KT kidney transplant, IS immunosuppression, mTORi mammalian target of rapamycin inhibitor, MMF/MPA mycophenolate mofetil or mycophenolic acid, cABMR chronic antibody-mediated rejection; PDN, prednisone, RTX Rituximab



Histological features

The time between renal transplantation and graft biopsy was similar in treated and control patients, 92.2 ± 75 and 93.3 ± 55 months respectively ($P = 0.94$).

At diagnosis, histologically acute inflammatory and chronic lesions related to c-aABMR and TG were similar in both groups (Table 3). Transplant glomerulopathy and IFTA were similar in treated and control patients, 1.74 ± 0.83 vs. 1.83 ± 0.77 ($P = 0.54$) and 1.61 ± 0.78 vs. 1.83 ± 0.84 ($P = 0.27$) respectively. The presence of IFTA \geq two was associated with graft loss at 24 months, (OR = 4.7; 1.19–18.5; $P = 0.02$).

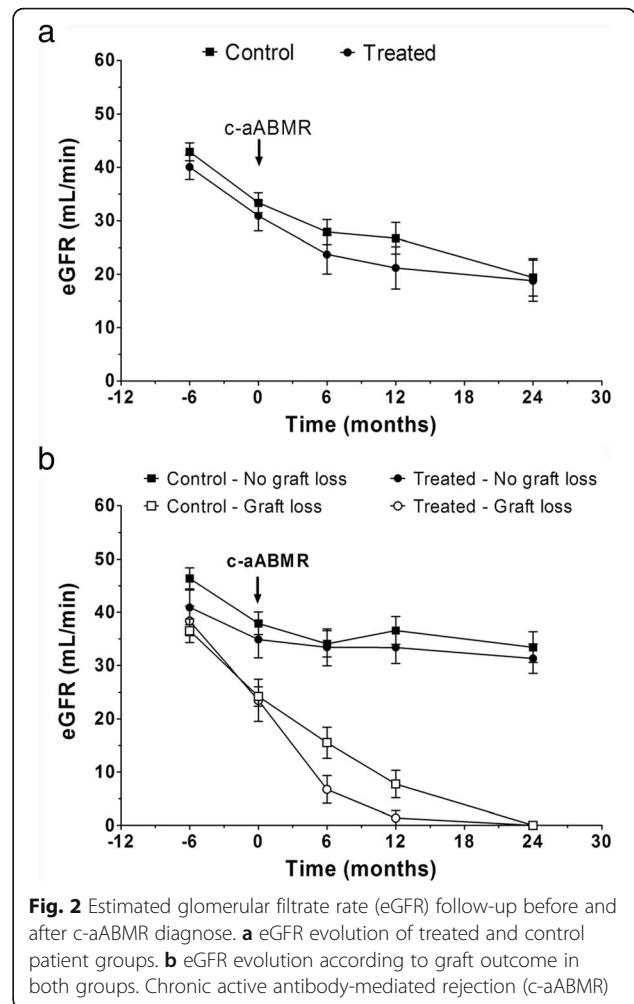
C4d deposition was more frequent in treated patients 19 (82.6%) vs. 17 (43.6%) ($P = 0.001$). The positivity of C4d, the severity of MVI (g + ptc) and TG degree were not associated with graft loss or worse survival.

Ten of the 23 treated patients had post-treatment follow-up biopsies within the first year after treatment with persisting active c-aABMR in all ten biopsies.

Adverse events

Infections that required hospitalization at least 48 h were more common in treated than non-treated patients during the first year after c-aABMR diagnosis, 15 vs. 8 (OR = 4.22; 95% CI = 1.37–13.1; $P = 0.012$), this reflects a ratio of infection/patient per year of 0.65 and 0.25 in treated and control patients respectively.

Infections were respiratory (8), urinary tract (6), cutaneous and mucosal (3), abdominal (4), disseminated zoster (1), and sepsis (1). The microbiological isolation was



negative in 12 cases, 3 *Pseudomonas aeruginosa*, 2 *Cytomegalovirus*, 1 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Escherichia coli*, 1 *Enterococcus faecalis*, 1 *Campylobacter jejuni* and 1 *Herpes Zoster virus*.

A CCI of 3 was associated with more infectious complications in the control group (OR = 8.7; 95% CI = 1.15–65.9; $P = 0.036$), but not in the treated patients ($P = 0.16$). Related to adverse reactions in PE sessions or RTX infusion, only one patient developed tetany related to hypocalcemia.

Table 2 Risk of graft loss at 24 months according to Δ eGFR and treatment

	OR & (95% CI)	P value	Model
Change in Δ eGFR > 13 ml/min	5 (1.5 – 16.9)	0.006	Univariate
Treatment	1.2 (0.4 - 3.5)	0.736	Univariate
Change in Δ eGFR > 13 ml/min	5 (1.5 – 16.9)	0.006	Multivariate
Treatment	1.1 (0.3 - 3.4)	0.897	Multivariate

Δ eGFR eGFR six months before diagnosis - eGFR at diagnosis of c-aABMR

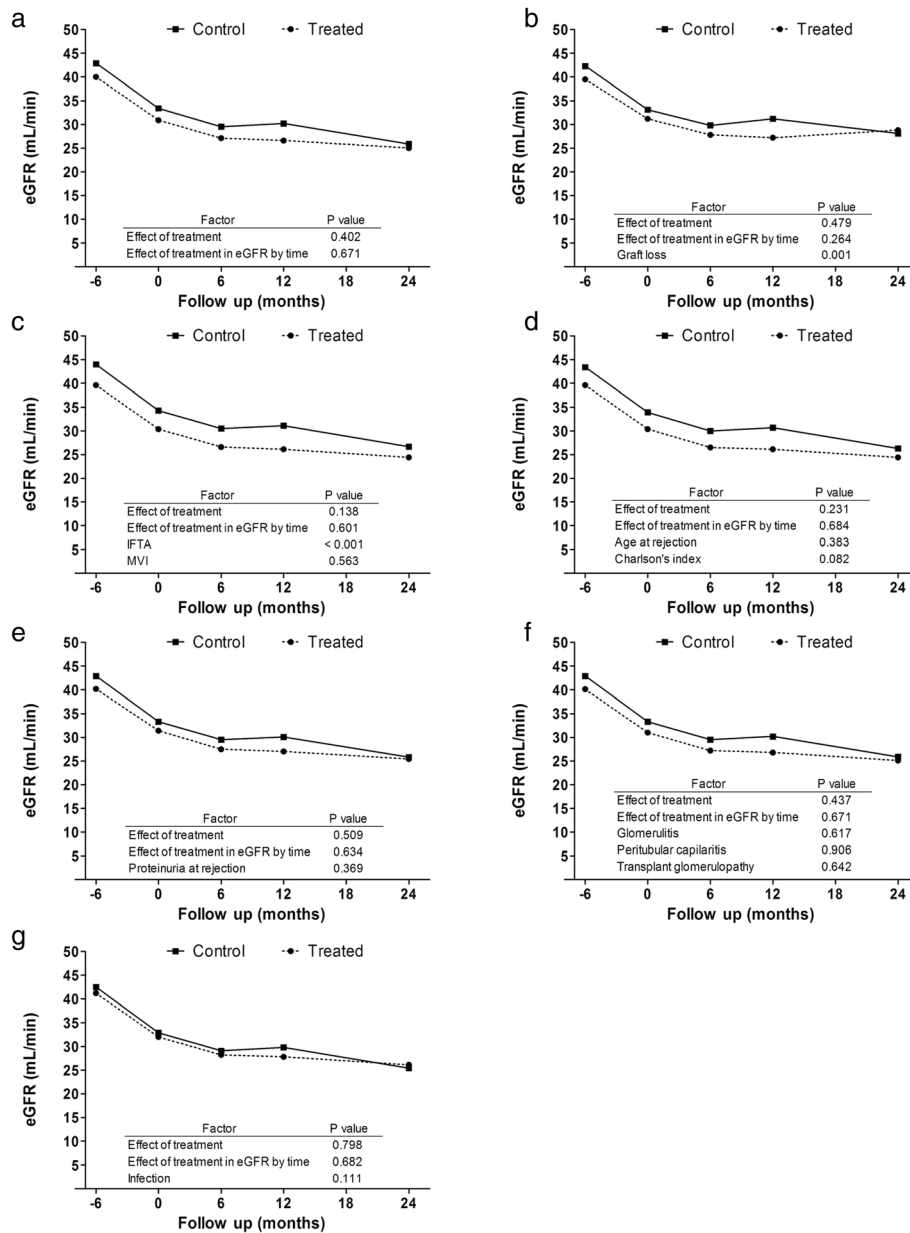


Fig. 3 Crude and adjusted estimation of eGFR according to GEE longitudinal models. Crude model (**a**); adjusted by graft loss (**b**); adjusted by IFTA (interstitial fibrosis and tubular atrophy) and MVI (microvascular inflammation) (**c**); adjusted by age and Charlson comorbidity index (**d**); adjusted by proteinuria (**e**); adjusted by glomerulitis, capillaritis and transplant glomerulopathy (**f**); adjusted by infection disease complications in the follow-up (**g**). Estimated glomerular filtrate rate (eGFR)

Discussion

In this study, treatment with rituximab + IVIG and PE was not associated with improved graft survival when compared with the control group. On the other hand, the incidence of infections requiring hospitalization within 1 year after treatment was more than doubled in the treated group.

Chronic antibody-mediated damage is the main limitation for long-term graft survival, but currently, only scarce data are available about the treatment of active

c-aABMR with TG. In small retrospective series of cases, the partial effectiveness of RTX and IVIG has been reported [7–10]. Rostaing et al. reported 14 patients with TG treated with RTX and steroids showing stabilization or improvement of renal function in seven patients. Four patients (28.5%) presented severe infections in the first year after treatment [23].

A prospective study in 20 pediatric patients with c-aABMR treated with one dose of RTX and a high dose of IVIG reported good response in all the patients

Table 3 Banff histopathological features at diagnosis of cABMR

	Treatment (N=23)	Control (N=39)	P value
MVI (g+tc)	2.78 ± 1.35	2.87 ± 1.36	0.67
i	0.6 ± 0.78	0.56 ± 0.65	0.95
t	0.17 ± 0.49	0.25 ± 0.69	0.97
g	1.52 ± 0.94	1.4 ± 0.94	0.63
ptc	1.26 ± 0.86	1.4 ± 0.79	0.4
ah	1.43 ± 1.04	1.38 ± 1.1	0.91
cg	1.74 ± 0.83	1.83 ± 0.77	0.54
ci	1.52 ± 0.79	1.83 ± 0.88	0.17
ct	1.56 ± 0.73	1.67 ± 0.89	0.62
IFTA	1.61 ± 0.78	1.83 ± 0.84	0.27
cv	1.17 ± 0.83	1.39 ± 0.87	0.46
C4d deposition	19 (82.6%)	17 (43.6%)	0.01
acute cellular rejection	0	6	0.05

Results are shown as mean ± SD or absolute frequencies (%) for quantitative and qualitative variables respectively. *i* interstitial inflammation, *t* tubulitis, *g* glomerulitis, *ptc* peritubular capillaritis, *ah* arterial hyalinosis, *cg* transplant glomerulopathy, *ci* interstitial fibrosis, *ct* tubular atrophy, *IFTA* interstitial fibrosis + tubular atrophy, *cv* vascular fibrous intimal thickening

without TG, but only in 45% of the patients with TG [10]. The response was defined as a reduction in the decline of GFR of 30%.

In another retrospective series of 31 patients with c-aABMR and TG treated with RTX ($n = 14$) vs. no treatment ($n = 17$), only eight patients responded to treatment [24]. The response was defined as a decline or stabilization of serum creatinine for at least 1 year.

These studies highlight the importance of TG as a marker of chronic damage and a poor prognosis. On the other hand, efficacy was based on graft function stabilization, which is difficult to distinguish from the natural history of the disease in the absence of an untreated control group. Indeed, in our control group, some patients stabilized their renal function. As in other reported series, the evolution of these patients is heterogeneous in both groups, which highlights the importance of having a control group in future studies.

Other recent studies reported that RTX treatment did not improve graft survival compared to an untreated group. Moreover, a higher incidence of adverse effects was detected in the treatment groups [11, 12]. However, the untreated groups were small in both studies, and they did not evaluate the combination of RTX, PE, and IVIG.

We performed the analysis using two comparable cohorts. Also, c-aABMR treatment was homogeneous.

The decision to treat was based on individual clinical judgment and seems to be influenced by the perception of a better performance status of the patient, younger age, younger donor and less risk of infections. However,

even with this potential positive selection bias, severe infections were more frequent in treated patients than in the older control group. In fact, the CCI was similar in both groups but was only associated with more infections in the control patients.

On the contrary with results presented in other studies [10], the severity of transplant glomerulopathy, (cg) score, was not associated with worse survival or loss of the graft at 24 months. Probably TG indicates a late non-reversible manifestation of antibody-mediated processes. Ten patients had a control biopsy after treatment, none presented improvement of TG.

In contrast with our data Kahwaji et al. suggest that patients with a high ptc and MVI scores may benefit from treatment with IVIG and RTX. But this was a trend that was not statistically significant [12]. Similar to our findings the authors did not find C4d positivity to be associated with worse graft outcomes, which is in contrast to the previous reports [5, 25–29].

A low eGFR at diagnosis is associated with graft loss at 24 months [11, 12]. We postulate that Δ eGFR, between 6 months before rejection and the time of diagnosis of rejection, ≥ 13 ml/min is more helpful to identify the patients with worse graft survival at 24 months.

In an observational study, 114 consecutive kidney transplant patients with c-ABMR were treated with steroids and IVIG. Three-fourths of patients lost their kidney grafts with a median survival of 1.9 years. The addition of rituximab or thymoglobulin in 40% of patients did not improve graft survival [30].

Recently a Spanish multicenter randomized trial has been performed in order to analyze the efficacy of rituximab and IVIG vs. placebo in 24 patients with TG and DSA positivity (12 placebos vs. 12 treatments) [13]. The primary outcome was the difference in the decline of eGFR at 12 months. In concordance with our study, there was no difference in eGFR decline. Unfortunately, the study was stopped, after recruiting only 50% of the minimal sample calculated, due to low inclusion rate, and was underpowered, thus, highlighting the difficulty for prospective studies in this area.

Another strategy includes the use of bortezomib, a proteasome inhibitor. Recently a randomized trial has been presented comparing bortezomib treatment vs. placebo in late ABMR, which included 28 patients with cABMR. Bortezomib treatment failed to induce a reversal in decline of eGFR, DSA changes or morphologic and molecular features of disease activity in follow-up biopsies. In this trial, treatment was associated with substantial toxicity [31].

Given the poor results and the higher incidence of infectious complications, the unmet need is to improve diagnosis and enhance treatment options. Use of electron microscopy to detect early forms of TG (cg = 1a) or

increased expression of gene transcripts indicative of endothelial injury might be helpful to improve graft survival.

New therapeutic options with more potent and less toxic immunosuppressive drugs or alternative immunological interventions are required. In this regard, two small prospective studies evaluated the complement system blockade at different levels in the treatment and prevention of c-aABMR and TG, without changes in long-term outcomes [32, 33].

In another recent report, Tocilizumab (Anti-IL6 receptor monoclonal antibody) showed promising results with stabilization of renal function in a small series of patients with c-aABMR and TG [34].

A significant cause of DSA and c-aABMR development is non-adherence to immunosuppression therapy. In this context, it seems to be more efficient and less dangerous to focus on promoting immunosuppressant therapy adherence rather than treating c-aABMR with TG aggressively.

This study presents a large group of patients with uniform pathology and treatment. However, the retrospective nature of the study is a limitation. DSA, and anti-HLA description is incomplete, hypogammaglobulinemia was not recorded and the dose of IVIG was low. In spite of the impossibility to assess the presence of DSA in all patients, the failure to demonstrate DSA does not rule out its existence [35]. The Banff'17 classification recognizes the fact that current DSA testing methods do not detect all antibodies that are potentially injurious to the allograft, and recommends the use of alternative markers that are not available in our center [3]. Recently, Sablik et al. analyzed whether cases suspicious for c-aABMR (DSA negative, $n = 24$) differ from cases of c-aABMR (DSA positive, $n = 17$) with respect to renal histology, allograft function and long-term graft survival [36]. There were no statistically significant differences on the decline of allograft function and renal allograft survival in cases with or without DSAs.

On the other hand, a strength of this study is that it shows a realistic incidence of serious infectious complications after treatment that should be taken into account in the therapeutic decision.

Conclusions

In summary, the rapid decline in GFR between 6 months before rejection diagnosis and the time of diagnosis is associated with poor prognosis. Treatment with RTX, PE, and IVIG in patients with active c-aABMR with TG was not associated with better graft survival, but a significant increase in serious infectious complications was observed.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Individual eGFR follow-up. **(a-b)** eGFR evolution of control and treated patients without graft loss. **(c-d)** eGFR evolution of control and treated patients with graft loss. eGFR, estimated glomerular filtrate rate; c-aABMR, chronic active antibody-mediated rejection (DOCX 444 kb)

Abbreviations

c-aABMR: Chronic active antibody-mediated rejection; CCI: Charlson comorbidity index; DSA: Donor specific antibodies; eGFR: Estimated glomerular filtrate rate; IFTA: Interstitial fibrosis and tubular atrophy; IVIG: Intravenous immunoglobulin; MMF/MPA: Mycophenolate mofetil or mycophenolic acid; MVI: Microvascular inflammation; PDN: Prednisone; PE: Plasma exchange; RTX: Rituximab; TG: Transplant glomerulopathy

Funding

This study has been funded by "Premio fin de residencia Emili Letang 2016" by Hospital Clínic de Barcelona and REDINREN (RD12/0021/0028 and RD16/0009/0023) by ISCIII-Subdirección General de Evaluación.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its Additional file].

Authors' contributions

GJP participated in research design, performance of research, data analysis and writing of the paper. EDS-A, MS, JRíos, IR, ML, PV-A, DC, JC, FC and EP participated in data analysis, performance of research. JMC and FO participated in research design and performed critical revision of the manuscript for important intellectual content. JRovira and FD participated in research design, performance of research, data analysis and writing of the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The ethics committee of the Hospital Clínic of Barcelona approved the study and the committee's reference number is 2017-0157. All patients included have signed individual consent in accordance with the guidelines of the ethical committee. Trial registration: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS): 14566/RG 24161. Study code: UTR-INM-2017-01.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of Nephrology and Renal Transplantation, ICNU, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. ²Laboratori Experimental de Nefrologia i Trasplantament (LENIT), IDIBAPS, Barcelona, Spain. ³Department of Pathology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. ⁴Medical Statistics Core Facility, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. ⁵Biostatistics Unit, Faculty of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁶Apheresis Unit, Department of Hemotherapy and Hemostasis, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. ⁷Red de Investigación Renal (REDinREN), Madrid, Spain. ⁸Department of Immunology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain.

Received: 25 June 2018 Accepted: 24 September 2018

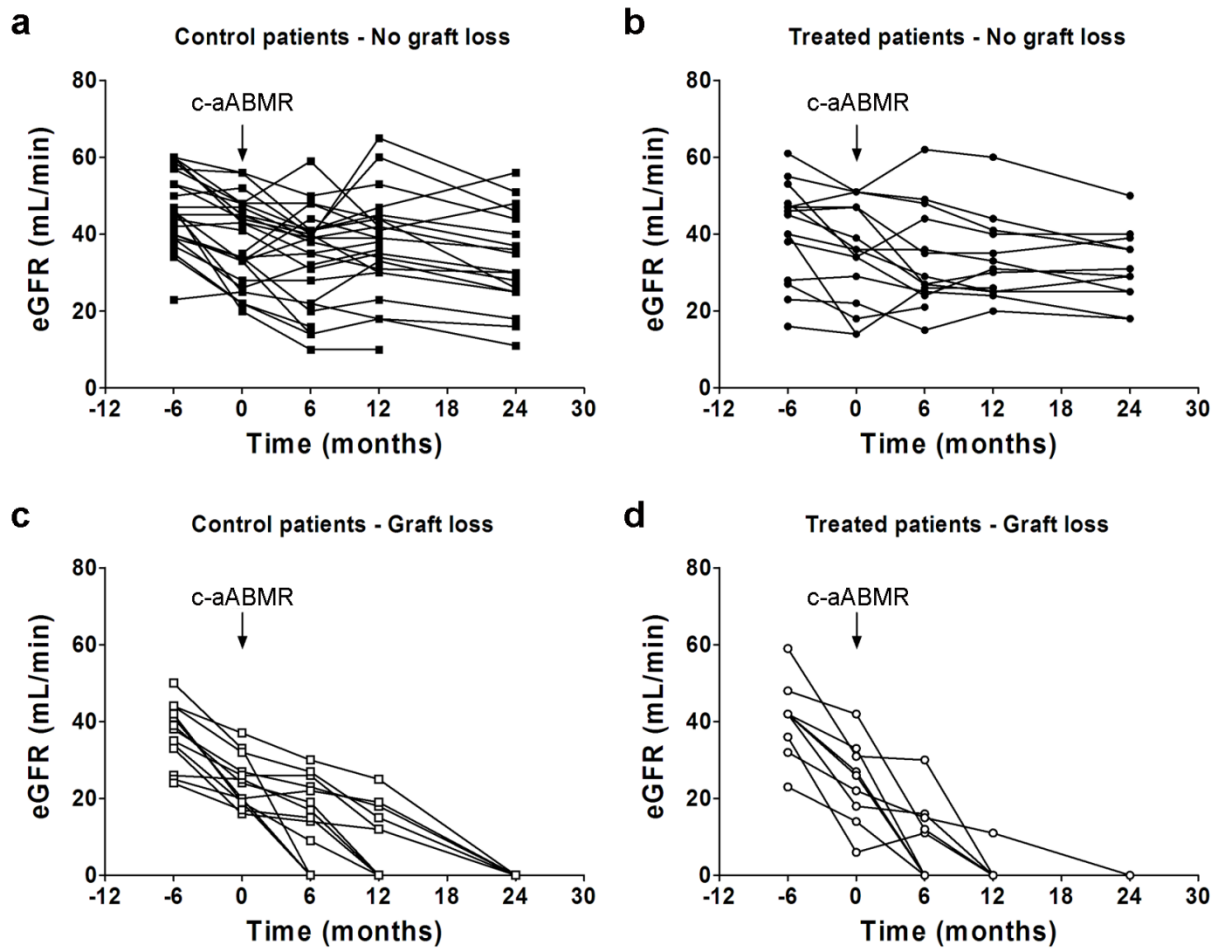
Published online: 11 October 2018

References

1. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, Cosio FG. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant.* 2009;9(3):527–35.

2. Naesens M, Kuypers DR, De Vusser K, Evenepoel P, Claes K, Bammens B, Meijers B, Sprangers B, Pirenne J, Monbaliu D et al: The histology of kidney transplant failure: a long-term follow-up study. *Transplantation* 2014, 98(4):427–435.
3. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, Nankivell BJ, Halloran PF, Colvin RB, Alakin E, et al. The Banff 2017 kidney meeting report: revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant*. 2018;18(2):293–307.
4. Rempfort A, Ivanyi B, Mathe Z, Tinckam K, Mucsi I, Molnar MZ. Better understanding of transplant glomerulopathy secondary to chronic antibody-mediated rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(11):1825–33.
5. John R, Konvalinka A, Tobar A, Kim SJ, Reich HN, Herzenberg AM. Determinants of long-term graft outcome in transplant glomerulopathy. *Transplantation*. 2010;90(7):757–64.
6. Lopez Jimenez V, Fuentes L, Jimenez T, Leon M, Garcia I, Sola E, Cabello M, Gutierrez C, Burgos D, Ruiz P, et al. Transplant glomerulopathy: clinical course and factors relating to graft survival. *Transplant Proc*. 2012;44(9):2599–600.
7. Billing H, Rieger S, Ovens J, Susal C, Melk A, Waldherr R, Opelz G, Tonshoff B. Successful treatment of chronic antibody-mediated rejection with IMG and rituximab in pediatric renal transplant recipients. *Transplantation*. 2008;86(9):1214–21.
8. Fehr T, Rusi B, Fischer A, Hopfer H, Wuthrich RP, Gaspert A. Rituximab and intravenous immunoglobulin treatment of chronic antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transplantation*. 2009;87(12):1837–41.
9. Hong YA, Kim HG, Choi SR, Sun IO, Park HS, Chung BH, Choi BS, Park CW, Kim YS, Yang CW. Effectiveness of rituximab and intravenous immunoglobulin therapy in renal transplant recipients with chronic active antibody-mediated rejection. *Transplant Proc*. 2012;44(1):182–4.
10. Billing H, Rieger S, Susal C, Waldherr R, Opelz G, Wuhl E, Tonshoff B. IMG and rituximab for treatment of chronic antibody-mediated rejection: a prospective study in paediatric renal transplantation with a 2-year follow-up. *Transpl Int*. 2012;25(11):1165–73.
11. Bachelet T, Nodimar C, Taupin JL, Lepreux S, Moreau K, Morel D, Guidicelli G, Couzi L, Merville P. Intravenous immunoglobulins and rituximab therapy for severe transplant glomerulopathy in chronic antibody-mediated rejection: a pilot study. *Clin Transpl*. 2015;29(5):439–46.
12. Kahwaji J, Najjar R, Kancharla D, Villicana R, Peng A, Jordan S, Vo A, Haas M. Histopathologic features of transplant glomerulopathy associated with response to therapy with intravenous immune globulin and rituximab. *Clin Transpl*. 2014;28(5):546–53.
13. Moreso F, Crespo M, Ruiz JC, Torres A, Gutierrez-Dalmau A, Osuna A, Perello M, Pascual J, Torres IB, Redondo-Pachon D, et al. Treatment of chronic antibody mediated rejection with intravenous immunoglobulins and rituximab: a multicenter, prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Am J Transplant*. 2018;18(4):927–35.
14. Cid J, Carbasse G, Andreu B, Baltanas A, Garcia-Carulla A, Lozano M. Efficacy and safety of plasma exchange: an 11-year single-center experience of 2730 procedures in 317 patients. *Transfus Apher Sci*. 2014;51(2):209–14.
15. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40(5):373–83.
16. Hemmelgarn BR, Manns BJ, Quan H, Ghali WA. Adapting the Charlson comorbidity index for use in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis*. 2003;42(1):125–32.
17. Miskulin DC, Martin AA, Brown R, Fink NE, Coresh J, Powe NR, Zager PG, Meyer KB, Levey AS. Predicting 1 year mortality in an outpatient haemodialysis population: a comparison of comorbidity instruments. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(2):413–20.
18. van Manen JG, Korevaar JC, Dekker FW, Boeschoten EW, Bossuyt PM, Krediet RT. How to adjust for comorbidity in survival studies in ESRD patients: a comparison of different indices. *Am J Kidney Dis* 2002, 40(1):82–89.
19. Laging M, Kal-van Gestel JA, van de Wetering J, JN IJ, Betjes MG, Weimar W, Roodnat JJ. A high comorbidity score should not be a contraindication for kidney transplantation. *Transplantation*. 2016;100(2):400–6.
20. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of diet in renal disease study group. *Ann Intern Med*. 1999;130(6):461–70.
21. Torng S, Rigatto C, Rush DN, Nickerson P, Jeffery JR. The urine protein to creatinine ratio (P/C) as a predictor of 24-hour urine protein excretion in renal transplant patients. *Transplantation*. 2001;72(8):1453–6.
22. Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *Bmj*. 2004; 329(7458):168–9.
23. Rostaing L, Guilbeau-Frugier C, Fort M, Mekhliti L, Kamar N. Treatment of symptomatic transplant glomerulopathy with rituximab. *Transpl Int*. 2009; 22(9):906–13.
24. Smith RN, Malik F, Goes N, Farris AB, Zorn E, Saidman S, Tolkoff-Rubin N, Puri S, Wong W. Partial therapeutic response to rituximab for the treatment of chronic alloantibody mediated rejection of kidney allografts. *Transpl Immunol*. 2012;27(2–3):107–13.
25. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, Hidalgo LG, Famulski K, Matas A, Halloran PF. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012;12(2):388–99.
26. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Hunsicker L, Hidalgo LG, Kaplan B, Halloran PF. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant*. 2009;9(11):2520–31.
27. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, Fiebeger AM, Leduc R, Cosio FC, Gourishankar S, Grande J, Halloran P, Hunsicker L, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation*. 2010;90(1):68–74.
28. Kedainis RL, Koch MJ, Brennan DC, Liapis H. Focal C4d+ in renal allografts is associated with the presence of donor-specific antibodies and decreased allograft survival. *Am J Transplant*. 2009;9(4):812–9.
29. Kieran N, Wang X, Perkins J, Davis C, Kendrick E, Bakthavatsalam R, Dunbar N, Warner P, Nelson K, Smith KD, et al. Combination of peritubular c4d and transplant glomerulopathy predicts late renal allograft failure. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(10):2260–8.
30. Redfield RR, Ellis TM, Zhong W, Scalea JR, Zens TJ, Mandelbrot D, Muth BL, Panzer S, Samaniego M, Kaufman DB, et al. Current outcomes of chronic active antibody mediated rejection - a large single center retrospective review using the updated BANFF 2013 criteria. *Hum Immunol*. 2016;77(4):346–52.
31. Eskandary F, Regele H, Baumann L, Bond G, Kozakowski N, Wahrmann M, Hidalgo LG, Haslacher H, Kaltenecker CC, Aretin MB, et al. A randomized trial of Bortezomib in late antibody-mediated kidney transplant rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(2):591–605.
32. Viglietti D, Gosset C, Loupy A, Deville L, Verine J, Zeevi A, Glotz D, Lefaucheur C. C1 inhibitor in acute antibody-mediated rejection nonresponsive to conventional therapy in kidney transplant recipients: a pilot study. *Am J Transplant*. 2016;16(5):1596–603.
33. Cornell LD, Schinstock CA, Gandhi MJ, Kremers WK, Stegall MD. Positive Crossmatch kidney transplant recipients treated with Eculizumab: outcomes beyond 1 year. *Am J Transplant*. 2015;15:1293.
34. Choi J, Aubert O, Vo A, Loupy A, Haas M, Puliyanda D, Kim I, Louie S, Kang A, Peng A, et al. Assessment of Tocilizumab (anti-Interleukin-6 receptor monoclonal) as a potential treatment for chronic antibody-mediated rejection and transplant Glomerulopathy in HLA-sensitized renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2017;17(9):2381–9.
35. Martin L, Guignier F, Bocrrie O, D'Athis P, Rageot D, Riffe G, Justrabo E, Mousson C. Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplants recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation*. 2005;79(10):1459–61.
36. Sablik KA, Clahsen-van Groningen MC, Looman CWN, Damman J, Roelen DL, van Agteren M, MGH B. Chronic-active antibody-mediated rejection with or without donor-specific antibodies has similar histomorphology and clinical outcome - a retrospective study. *Transpl Int*. 2018;31:900–8.

Supplementary Material



S1 Fig. Individual eGFR follow-up. (a-b) eGFR evolution of control and treated patients without graft loss. (c-d) eGFR evolution of control and treated patients with graft loss. eGFR, estimated glomerular filtrate rate; c-aABMR, chronic active antibody-mediated rejection.

Objetivo 3

Evaluar el impacto del daño mediado por anticuerpos en la supervivencia del injerto renal y del paciente, en la cohorte de trasplante hepatorenal simultáneo del Hospital Clínic de Barcelona.

1. Justificación del objetivo:

El trasplante simultáneo de hígado y riñón (THRS) es una opción terapéutica para los pacientes con enfermedad hepática y renal crónica. El abordaje inmunológico difiere entre THRS y trasplante de riñón (KT). La presencia de sensibilización específica del donante antes del trasplante es una contraindicación relativa para el trasplante renal aislado, pero no para el trasplante de hígado.

El impacto negativo de los DSA preformados en el trasplante renal aislado es bien conocido y el riesgo de rechazo hiperagudo del riñón es alto en presencia de una prueba cruzada de citotoxicidad dependiente del complemento positiva.(72–74,201)

El injerto hepático muestra una resistencia mucho mayor al daño mediado por anticuerpos y se ha reportado que esta resistencia podría extenderse al injerto renal en el contexto de un THRS.(69,70,72,75,77–79,202,203) Por el contrario, otros autores han expresado su preocupación acerca de la alosensibilización en el THRS y su impacto negativo en la supervivencia del paciente y del aloinjerto renal. (204,205)

Es pertinente estudiar el impacto del daño mediado por anticuerpos en la sobrevida del injerto y el paciente con THRS, dado que variantes basadas en su fisiopatología inmune, podrían constituir en un futuro, una alternativa terapéutica en el manejo del ABMR.

2. Material y Métodos

2.1. Diseño del estudio y población de pacientes

Estudio retrospectivo longitudinal unicéntrico.

Criterios de inclusión: Pacientes receptores de THRS realizados en nuestro centro desde mayo de 1993 hasta septiembre de 2017.

2.2. Definición de grupos del estudio:

Los receptores de THRS fueron clasificados según las características de sensibilización frente al donante al momento del trasplante. Se los dividió según su en alto y bajo riesgo inmunológico para desarrollo de rechazo.

El alto riesgo inmune (HIR) se definió por uno o más de los siguientes eventos: un Crossmatch por citotoxicidad (CDCXM) positivo antes del trasplante, un CDCXM positivo histórico (con suero de hasta 24 meses antes del trasplante), una prueba cruzada de citometría de flujo positiva (FCXM) o la presencia de DSA antes del trasplante. Los receptores sin ninguno de los eventos anteriores citados se clasificaron como de bajo riesgo inmunológico (LIR).

Variables del estudio

Variables principales:

Supervivencia del injerto y del paciente.

Variables secundarias:

La función renal y la incidencia de rechazo del injerto renal fueron criterios de valoración secundarios. Revisamos las características clínicas, la indicación de THRS y los cambios en las pruebas de sensibilización frente al donante después del trasplante. Se recopiló el tipo de inmunosupresión en el momento del trasplante y al final del seguimiento (inmunosupresión de mantenimiento). Todos los niveles de inmunosupresores disponibles en los registros fueron recolectados y agrupados por riesgo inmunológico y tipo de inmunosupresor (tacrolimus o ciclosporina).

Se evaluó la función renal a los 6, 12, 24 y 36 meses y al final del seguimiento el 28 de septiembre de 2018. La función renal se determinó mediante la creatinina sérica y el filtrado glomerular estimado (FGe) utilizando la fórmula MDRD.

2.3. Diagnóstico de rechazo renal y sensibilización frente al donante:

La decisión y el momento de realizar una biopsia de riñón o hígado y el tratamiento se basaron en el juicio clínico del médico tratante.

Se revisaron los episodios de rechazo hepático y renal. El rechazo del injerto renal se determinó según la clasificación de Banff vigente en el momento del diagnóstico. Se consideró sospecha de rechazo renal cuando se trató a un paciente con sospecha clínica de rechazo (deterioro de la función renal tras descartar otras causas) sin confirmación por biopsia.

Los DSA se consideraron positivos con intensidad de fluorescencia media (MFI) > 1500 según los protocolos del Laboratorio de Histocompatibilidad de Catalunya. Los loci A / B / DRB1 HLA se consideraron para la búsqueda de DSA en todos los pacientes, mientras que los loci DQB1 / DP1 / C HLA se consideraron solo cuando estaban disponibles.

En el caso de CDCXM positivo, se realizó un nuevo CDCXM con ditiotreitól para excluir auto anticuerpos. Las muestras de suero se examinaron para detectar anticuerpos de clase 1 y 2 del antígeno leucocitario humano (HLA) utilizando el ensayo de microesferas Lifecodes LifeScreen Deluxe (Immucor, Stamford, CT). Las especificidades de los anticuerpos se determinaron utilizando el ensayo de microesferas de antígeno único Lifecodes (Immucor) en pacientes con anticuerpos HLA positivos.

2.4 Análisis estadístico:

Los niveles de inmunosupresión se analizaron longitudinalmente utilizando modelos de ecuación de estimación generalizada (GEE). Utilizando una matriz de correlación intrasujeto de tipo autorregresivo (AR1). Este modelo incluyó el riesgo inmunológico y su interacción como factores fijos. Se calcularon el nivel medio estimado y el intervalo de confianza (IC) del 95% para cada tipo de

inmunosupresor para los siguientes períodos: 3 a 6 meses, > 6 a 12 meses y por año hasta el sexto año después del trasplante.

Los datos se describieron como media con desviación estándar (DE) para las variables cuantitativas y como frecuencias y porcentajes absolutos y relativos para las variables cualitativas. Las comparaciones de grupos se realizaron mediante la prueba exacta de Fisher, la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney para grupos independientes cuando fue apropiado. El estimador de Kaplan-Meier y la prueba de rango logarítmico se realizaron para la evaluación del injerto renal y la supervivencia general. Se consideró la muerte con un injerto renal funcional como un evento competitivo de la pérdida del injerto y se analizó con la incidencia acumulada del evento competitivo y la prueba de Fine-Gray. (206)

La supervivencia global se analizó mediante modelos de regresión de Cox: análisis univariados, ajustados por factores de confusión que mostraron significación estadística en los análisis univariados y análisis ponderados. El enfoque ponderado se realizó mediante el análisis de la probabilidad inversa de IPTW y se llevó a cabo teniendo en cuenta la presencia de trasplante renal previo, virus de la hepatitis C (VHC) y el tiempo de diálisis previo al trasplante en terciles.

Se realizó una estimación cruda del efecto del riesgo inmunológico sobre la evolución del FGe mediante el modelo GEE utilizando una matriz AR para estimar la correlación intrasujeto. Estos modelos incluyeron riesgo inmunológico y tiempo de seguimiento. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS, versión 25.0 (IBM, Armonk, NY); SAS, versión 94 (SAS Institute, Cary, NC); y estadísticas R, versión 3.5.1, o EZR en R commander, versión 1.37 (Fundación R para Computación Estadística, Viena, Austria). Se utilizó un valor de P bilateral $\leq 0,05$ para indicar significación estadística.

3. Resultados

Se incluyeron 68 THRS, de los cuales 20 se consideraron de riesgo inmunológico alto al presentar alosensibilización contra el donante.

La incidencia de rechazo del injerto renal fue mayor en el grupo de alto riesgo inmunológico 30.0% versus 5.88%, ($P < 0.01$; OR 6.86; IC95% 1.7-27.5). Sin embargo, la supervivencia del injerto renal censurada por muerte, así como el FGe durante el seguimiento, no fueron diferentes entre los dos grupos (Log-Rank = 0,48). La supervivencia del injerto hepático censurada por muerte tampoco fue diferente. Además, la supervivencia del injerto considerando la muerte como un evento competitivo de la pérdida del injerto tampoco arrojó diferencias ($P = 0,39$).

La supervivencia del paciente a 1 y 5 años fue del 70,0% frente al 94,0% y del 57,3% frente al 88,0% para los grupos alto y bajo riesgo inmune respectivamente.

En el modelo crudo de regresión de Cox, la supervivencia del paciente se asoció negativamente con la sensibilización (HR: 2,49; $P = 0,03$). En el análisis univariado, la mortalidad se relacionó con: el alto riesgo inmune (HR, 2,49; $P = 0,03$), infección por VHC (HR, 2,57; $P = 0,02$), el tiempo en diálisis durante más de 24 meses (HR, 2,58; $P = 0,02$) y los trasplantes renales previos (HR, 4,03; $P = 0,001$). Todos estos factores fueron significativamente más prevalentes en pacientes con alto riesgo inmune. En el análisis multivariado (Tabla 5), solo los trasplantes renales previos mantuvieron significación (HR, 4,26; $P = 0,01$). Dada la posibilidad de sesgo en el modelo multivariante por una posible interrelación de variables, se evaluó la supervivencia del paciente mediante regresión de Cox con ponderación de la probabilidad inversa de tratamiento (IPTW) estabilizado por la prevalencia de alto riesgo inmune, mostrando la supervivencia del paciente no estar asociada con el alto riesgo inmune ($P = 0,62$).

No hubo asociación entre la supervivencia del paciente y los episodios de rechazo ($P = 0,26$) o la inducción de timoglobulina ($P = 0,51$).

Esto sugiere que las comorbilidades asociadas con la alosensibilización son factores de riesgo independientes para el injerto renal y la supervivencia del paciente, mientras que el riesgo inmunológico, per se, no lo es.

4. Comunicaciones surgidas de este objetivo:

Presentaciones a congreso:

- Long-Term Kidney Graft Evolution in Simultaneous us Liver-Kidney Transplants with Immunological Risk. Pineiro GJ, Montagud E, Ugalde J, Gelpi R, Torregrosa V, Rovira J, Colmenero J, Diekmann F, Esforzado N. 2019 American Transplant Congress.

Kidney Graft Outcomes in High Immunological Risk Simultaneous Liver-Kidney Transplants

Piñeiro GJ, Rovira J, Montagud-Marrachí E, Torregrosa JV, Ríos J, Cucchiari D, Ugalde-Altamirano J, Ventura-Aguilar P, Gelpi R, Palou E, Colmenero J, Navasa M, Diekmann F, Esforzado N

Liver Transpl. 2020 Apr;26(4):517-527. doi: 10.1002/lt.25726. PMID: 32011089.


5. Conclusiones

La tolerancia al injerto renal en el trasplante hepatorenal simultáneo no es completa, pero es superior comparado con el trasplante de riñón aislado. La incidencia de rechazo renal agudo fue mayor en el grupo de alto riesgo inmunológico. Sin embargo, la supervivencia injerto renal censurada por muerte, así como el FGe durante el seguimiento, no fueron diferentes entre los dos grupos. Las comorbilidades, pero no el riesgo inmunológico, repercuten negativamente en la supervivencia del paciente.



Piñeiro GJ, Rovira J, Montagud-Marrahí E, Torregrosa JV, Ríos J, Cucchiari D, Ugalde-Altamirano J, Ventura-Aguilar P, Gelpi R, Palou E, Colmenero J, Navasa M, Diekmann F, Esforzado N. Kidney Graft Outcomes in High Immunological Risk Simultaneous Liver-Kidney Transplants. *Liver Transpl.* 2020 Apr;26(4):517-527. doi: 10.1002/lt.25726. PMID: 32011089.

Kidney Graft Outcomes in High Immunological Risk Simultaneous Liver-Kidney Transplants

Gastón J. Piñeiro,^{1,2} Jordi Rovira ,^{2,3} Enrique Montagud-Marrahí,¹ Jose V. Torregrosa,¹ José Ríos,^{4,5} David Cucchiari,^{1,2} Jessica Ugalde-Altamirano,¹ Pedro Ventura-Aguiar,^{1,2} Rosana Gelpi,¹ Eduard Palou,⁶ Jordi Colmenero,⁷ Miquel Navasa,⁷ Fritz Diekmann,^{1,2,3} and Nuria Esforzado¹

¹Department of Nephrology and Renal Transplantation, Instituto Clínic de Nefrologia y Urologia, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Laboratori Experimental de Nefrologia i Trasplantament, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ³Red de Investigación Renal, Madrid, Spain; ⁴Medical Statistics Core Facility, IDIBAPS, Barcelona, Spain; ⁵Biostatistics Unit, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁶Department of Immunology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; and ⁷Liver Transplant Unit, Liver Unit, Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Recipients of simultaneous liver-kidney transplantations (SLKTs) have a lower risk of rejection compared with recipients of kidney transplants alone. However, there is disagreement about the impact of pretransplant anti-human leukocyte antigen sensitization on patient and kidney graft survival in the long term. The aim of the study was to evaluate the impact of the recipient immunological risk and comorbidities in renal graft outcomes on SLKT. We reviewed the SLKTs performed in our center from May 1993 until September 2017. Patient and graft survival were analyzed according to the immunological risk, comorbidities, liver and kidney rejection episodes, immunosuppression, and infections. A total of 20 recipients of SLKT were considered in the high immunological risk (HIR) group, and 68 recipients were included in the low immunological risk (LIR) control group. The prevalence of hepatitis C virus infection, second renal transplant, and time on dialysis prior to transplantation were significantly higher in the HIR group. The incidence of acute kidney rejection was higher in the HIR group ($P < 0.01$). However, death-censored kidney graft survival as well as the estimated glomerular filtration rate at follow-up were not different between the 2 groups. Comorbidities, but not the immunological risk, impact negatively on patient survival. Despite the higher incidence of rejection in the HIR SLKT group, longterm renal function and graft survival were similar to the LIR group.

Liver Transplantation 26 517–527 2020 AASLD.

Received September 17, 2019; accepted January 12, 2020.

Simultaneous liver-kidney transplantation (SLKT) is a therapeutic option for patients with chronic liver and kidney disease. The immunological approach differs between SLKT and kidney transplantation (KT).

The presence of pretransplant donor-specific sensitization is a relative contraindication for KT but not for liver transplantation (LT) and SLKT.

The negative impact of preformed donor-specific antibodies (DSAs) in isolated KT is well known,⁽¹⁻⁵⁾ and the risk of hyperacute kidney rejection is high in the presence of a positive complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDCXM).⁽⁶⁾ Also, the presence of pretransplant DSAs has been associated with patient mortality.^(7,8) On the contrary, the liver graft shows an impressive resistance to antibody-mediated rejection (ABMR) even in the presence of preformed DSAs,⁽⁹⁻¹²⁾ and several early reports described that this resistance could be extended to the kidney graft in SLKTs.⁽¹³⁻¹⁵⁾ This immunological contrast has been

Abbreviations: ABMR, antibody-mediated rejection; AR1, autoregressive; ADPKD, autosomal dominant polycystic kidney disease; CDC, complement-dependent cytotoxicity; CDCXM, complement-dependent cytotoxicity crossmatch; CI, confidence interval; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; DSA, donor-specific antibody; eGFR, estimated glomerular filtration rate; FCXM, flow cytometry crossmatch; FK, tacrolimus; GEE, generalized estimating equation; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HIR, high immunological risk; HLA, human leukocyte antigen; HR, hazard ratio; IL2RA, interleukin-2 receptor antagonist; IPTW, inverse

known for many years,^(13,16-18) and SLKT has been successfully used as a strategy to protect the kidney graft in patients with high immunological risk (HIR).⁽¹⁹⁾ In contrast, other authors have raised concerns about the allosensitization in SLKT and its negative impact on patient and overall renal allograft survival.⁽²⁰⁻²²⁾ In this sense, in LT, it has also been reported that preformed DSAs were associated with worse liver graft survival, biliary complications, and ductopenia.⁽²³⁾ Also, 1 registry study of SLKT reported higher mortality in

sensitized recipients (positive pretransplant CDCXM or panel reactive antibody [PRA] titers >10%).⁽²¹⁾

We have reviewed the SLKTs performed in our center to analyze whether the recipient's immunological risk has an impact on patient and kidney graft outcomes.

Patients and Methods

We retrospectively reviewed the SLKTs performed in our center from May 1993 until September 2017, and we classified recipients according to their immunological risk. HIR was defined by 1 or more of the following events: a positive pretransplant CDCXM, historic positive CDCXM (in serum measurements up to 24 months prior to transplantation), positive flow cytometry crossmatch (FCXM), or the presence of DSAs prior to transplantation. Recipients without any of the previous events cited were classified as low immunological risk (LIR).

Patient and kidney graft survival was the primary endpoint, whereas renal function and the incidence of kidney graft rejection were secondary endpoints. We reviewed the clinical characteristics, the indication of SLKT, and the changes in XM and DSA after transplantation.

The type of immunosuppression at the time of transplantation and at the end of follow-up (maintenance immunosuppression) was collected. All immunosuppressant levels available in the records were collected and grouped by immunological risk and immunosuppressant type (tacrolimus or cyclosporine). Analyses of longitudinal results of levels were performed using the generalized estimating equation (GEE) models using an intrasubject correlation matrix of type autoregressive (AR1). This model included HIR, time cutoff, and their interaction as fixed factors. The estimated mean level and the 95% confidence interval (CI) for each type of immunosuppressant were calculated for the following periods: 3-6 months, >6-12 months, and by year to the sixth year after transplantation.

Liver and kidney rejections episodes were reviewed. Kidney graft rejection was determined according to Banff classification at the moment of diagnosis. We considered suspected kidney rejection when a patient with clinical suspicion (impaired renal function after ruling out other causes) was treated without biopsy confirmation. The decision and the time to perform a kidney or liver biopsy and patient treatment were based on clinical judgment.

We assessed renal function at 6, 12, 24, and 36 months and at the end of follow-up on September 28, 2018. Renal function was determined by serum

probability of treatment weights; KT, kidney transplantation; LIR, low immunological risk; LT, liver transplantation; MFI, mean fluorescence intensity; mTORi, mammalian target of rapamycin inhibitor; N/D, not detected; OR, odds ratio; PE, plasmatic exchange; PRA, panel reactive antibody; PS, propensity score; r-ATG, rabbit anti-thymocyte globulin; RTX, rituximab; SD, standard deviation; SLKT, simultaneous liver-kidney transplantation; TG, transplant glomerulopathy; XM, crossmatch.

Address reprint requests to Fritz Diekmann, M.D., Ph.D., Department of Nephrology and Renal Transplantation, Instituto Clinic de Nefrologia y Urologia, Hospital Clinic de Barcelona, IDIBAPS, Villarroel 170 (Escala 12 – Planta 5), E-08036 Barcelona, Spain. Telephone: +34932275444; FAX: +34932275498; E-mail: fdiekman@clinic.cat

Gastón J. Piñeiro is on the speakers' bureau for Alexion Pharmaceuticals and has travel grants from Astellas Pharma and Novartis. Jose V. Torregrosa is on the speakers' bureau for Astellas Pharma, Amgen, and Amicus Therapeutics and has travel grants from Amicus Therapeutics, Novartis, Shire, Vifor Pharma, Amgen, and Astellas Pharma. David Cucchiari reports other income from Novartis, Pharmanutra, and Astellas Pharma. Jessica Ugalde-Altamirano reports other income from Astellas Pharma, Shire, and Amicus Therapeutics. Pedro Ventura-Aguilar reports other income from Astellas Pharma, Alexion Pharmaceuticals, Novartis, Chiesi, and Mallinckrodt Pharmaceuticals. Jordi Colmenero reports other income from Chiesi, Astellas Pharma, and Novartis. Fritz Diekmann reports other income from Alexion Pharmaceuticals, Chiesi, Novartis, Mallinckrodt Pharmaceuticals, Pfizer, Transplant Biomedicals, and Neovii and receives grants from Teva Pharmaceuticals, Chiesi, Pfizer, Novartis, Astellas Pharma, and Transplant Biomedicals. Nuria Esforzado reports other income from Novartis.

This study has been funded by Premio fin de residencia Emili Letang 2016 by Hospital Clinic de Barcelona and Red de Investigación Renal (REDINREN) (RD12/0021/0028 and RD16/0009/0023) by Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación and Redes Temáticas De Investigación Cooperativa En Salud, REDINREN (RD16/0009/0023) cofunded by ISCIII-Subdirección General de Evaluación and Fondo Europeo de Desarrollo Regional Una manera de hacer Europa, and Centres de Recerca de Catalunya (CERCA) Programme/Generalitat de Catalunya. This work was developed at the Centre de Recerca Biomèdica Cellex in Barcelona, Spain.

Copyright © 2020 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/lt.25726

creatinine and by estimated glomerular filtration rate (eGFR) using the Modification of Diet in Renal Disease formula.⁽²⁴⁾ In the case of positive CDCXM, a new CDCXM was performed with dithiothreitol to exclude autoantibodies.

Serum samples were screened for human leukocyte antigen (HLA) class 1 and 2 antibodies using the Lifecodes LifeScreen Deluxe bead assay (Immucor, Stamford, CT). Antibody specificities were determined using the Lifecodes Single Antigen bead assay (Immucor) in patients with positive HLA antibodies. The DSAs were considered positive with mean fluorescence intensity (MFI) >1500 according to the protocols of the Histocompatibility Laboratory of Catalunya. A/B/DRB1 HLA loci were considered for DSA in all patients, whereas DQB1/DP1/C HLA loci were considered for DSAs only when they were available.

Data were described as mean with standard deviation (SD) for quantitative variables, and as absolute and relative frequencies and percentages for qualitative variables. Group comparisons were made by Fisher's exact test, Student *t* test, or Mann-Whitney U test for independent groups when appropriate. The Kaplan-Meier estimator and log-rank test were made for the evaluation of kidney graft and overall survival. We considered death with a functioning kidney graft as a competing event of graft loss, and it was analyzed with the cumulative incidence of the competing event and the Fine-Gray test.⁽²⁵⁾

Overall survival was analyzed by Cox regression models: univariate analyses, adjusted for confounders that showed statistical significance in univariate analyses, and weighted analyses. The weighted approach was made by the inverse probability of treatment weights (IPTW) analysis and was carried out using as weight the IPTW from the propensity score (PS) estimated by logistic regression models using the previous presence of KT, hepatitis C virus (HCV), and the time on dialysis in tertiles. Because the prevalence of HIR is different of 50%, we also analyzed the Cox regression model weighted by IPTW corrected for the prevalence of HIR as a sensitivity analysis.

We performed a crude estimation of the effect of immunological risk on the evolution of eGFR by the GEE model using an AR matrix⁽¹⁾ to estimate the intrasubject correlation. These models included immunological risk and time of follow-up.

Statistical analyses were performed using SPSS, version 25.0 (IBM, Armonk, NY); SAS, version

94 (SAS Institute, Cary, NC); and R statistics, version 3.5.1, or EZR on R commander, version 1.37 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). A 2-sided *P* value ≤ 0.05 was used to indicate statistical significance. The institutional ethics committee approved the study, and the study was registered in the Spanish Agency of Medicines and Health Products (AEP4NQ626C).

Results

A total of 88 SLKTs were performed in our center from May 1993 until September 2017. A total of 20 (22.7%) SLKT recipients were included in the HIR group, whereas 68 patients were included in the LIR group (Fig. 1).

From HIR patients, 1 patient had a positive historic CDCXM; 1 patient had a historic CDCXM and DSAs; 3 patients had a positive CDCXM; 3 patients had a positive CDCXM and DSAs; 2 patients had a positive CDCXM, FCXM, and DSAs; 1 patient had a positive FCXM; 1 patient had a positive FCXM and DSA; and 8 patients had at least 1 DSA identified (Table 1).

EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND IMMUNOSUPPRESSION

The epidemiological characteristics are listed in Table 2. The mean follow-up in the HIR group was 64.4 ± 64.8 months versus 88.8 ± 69.9 in the LIR group ($P = 0.16$), and the overall mean follow-up was 83.3 ± 69.2 months.

Kidney function before SLKT and the requirement of hemodialysis were similar in the HIR and LIR groups with 75.0% and 67.6%, respectively ($P = 0.53$). However, the time on dialysis was significantly higher in HIR than LIR: 128 ± 86.7 versus 27.7 ± 33.0 months ($P < 0.001$).

A total of 32 patients, 15 (75.0%) in the HIR group and 17 (25.0%) in the LIR group, previously received at least 1 KT ($P < 0.001$). There were 7 LIR patients who received a LT before the SLKT, whereas none of the HIR patients received a previous liver graft ($P = 0.34$).

The prevalence of HCV infection, previous KT, and the time on dialysis were significantly higher in the HIR group than in the LIR group ($P < 0.001$). Nevertheless,

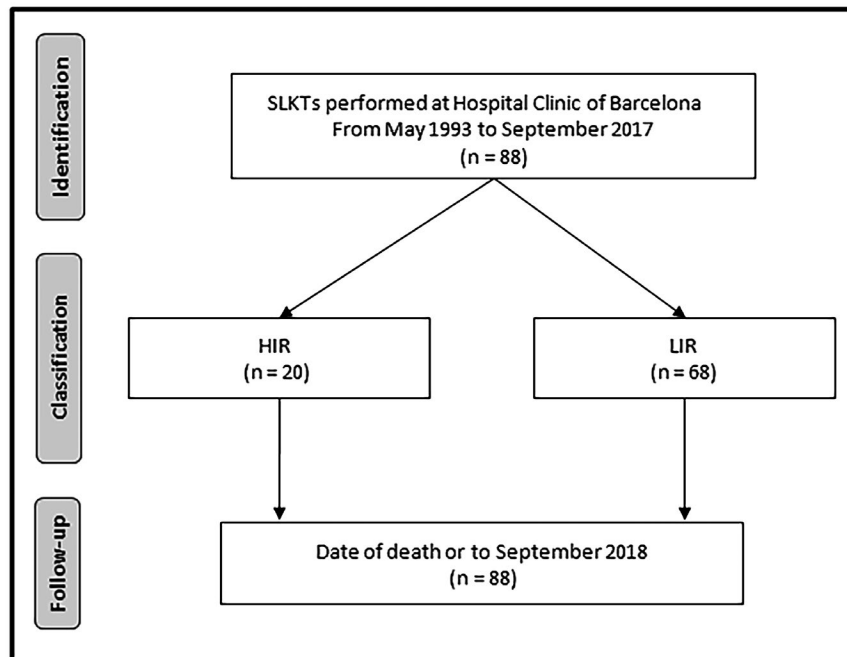


FIG. 1. A flow diagram of the study participants.

TABLE 1. HIR Patients

Number of Patients	Historic CDCXM	Pretransplant CDCXM	Pretransplant FCXM	Pretransplant DSA
1	Yes	No	Unknown	Unknown
1	Yes	No	Unknown	Yes
3	No	Yes	Unknown	Unknown
3	No	Yes	Unknown	Yes
2	No	Yes	Yes	Yes
1	No	No	Yes	Unknown
1	No	No	Yes	Yes
8	No	No	Unknown	Yes

the prevalence of other comorbidities was similar in both groups (Table 2). Liver and kidney diseases leading to organ failure, not including HCV, were similar in both groups (Table 2).

The immunological characteristics are also presented in Table 2. The mean complement-dependent cytotoxicity (CDC)–PRA was significantly higher in HIR than LIR patients ($P < 0.001$). Anti-HLA screening by bead-based detection assay was available in 17 out of 20 HIR patients and in 52 out of 68 LIR patients. Anti-HLA class 1 and class 2 positivity rates were significantly higher in HIR patients than LIR patients. The AB, DR, and total HLA mismatches were similar in both groups (Table 2).

Induction immunosuppressive treatment was common in HIR patients with 80.0% compared with 33.8% in LIR patients ($P < 0.001$). Thymoglobulin was mainly used in the HIR group with 55.0% versus 2.94% in the LIR group ($P < 0.001$), whereas basiliximab was more prevalent in the LIR group. Longterm immunosuppressive treatment is presented in Table 3. The use of prednisone was more frequent in HIR than in LIR patients (95.0% versus 58.8%; $P < 0.01$). The use of all the other maintaining immunosuppressants did not differ between the 2 groups. Regarding immunosuppressant levels, the estimated mean levels and the 95% CIs were calculated for 3–6 months, >6–12 months, and by year to the sixth year after transplant without

TABLE 2. Epidemiological Characteristics

	HIR (n = 20)	LIR (n = 68)	P Value
Follow-up time, months	64.4 ± 64.8	88.8 ± 69.9	0.16
Age, years	50.0 ± 10.1	52.1 ± 12.7	0.45
Sex			0.07
Male	11	46	
Female	9	22	
Dialysis prior to SLKT	15 (75.0)	46 (67.6)	0.53
The time on dialysis prior to SLKT, months	128 ± 86.7	27.7 ± 33.0	<0.001
Donor age, years	40.4 ± 13.1	42.0 ± 13.7	0.64
Prior KT	15 (75.0)	17 (25.0)	<0.001
Prior LT	0 (0.00)	7 (10.3)	0.34
Comorbidities			
Hypertension	12 (60.0)	32 (47.1)	0.31
HCV positive	14 (70.0)	17 (25.0)	<0.001
Diabetes mellitus	3 (15.0)	16 (23.5)	0.54
Cerebrovascular disease	1 (5.00)	3 (4.41)	1
Congestive heart failure	0 (0.00)	3 (4.41)	1
COPD	1 (5.00)	6 (8.82)	1
Pulmonary hypertension	2 (10.0)	2 (2.94)	0.22
Connective tissue disease	0 (0.00)	1 (1.47)	1
Liver disease			
HCV positive	14 (70.0)	17 (25.0)	<0.001
ADPKD	4 (20.0)	20 (29.4)	0.57
Alcoholism	0 (0.00)	17 (25.0)	0.1
Hyperoxaluria	1 (5.00)	5 (7.35)	1
Amyloidosis	1 (5.00)	2 (2.94)	0.54
NASH	0 (0.00)	4 (5.88)	0.57
HBV	0 (0.00)	1 (1.47)	1
Previous liver graft lost	0 (0.00)	2 (2.94)	1
Kidney disease			
Glomerulonephritis	7 (35.0)	21 (30.9)	0.73
ADPKD	5 (25.0)	22 (32.4)	0.53
Chronic tubulointerstitial nephritis	2 (10.0)	4 (5.88)	0.61
Diabetic nephropathy	1 (5.00)	4 (5.88)	1
Amyloidosis	1 (5.00)	2 (2.94)	0.54
Hyperoxaluria	1 (5.00)	5 (7.35)	1
Nephroangiosclerosis	0 (0.00)	4 (5.88)	0.57
Nephrotoxic	0 (0.00)	2 (2.94)	1
Unknown	1 (5.00)	1 (1.47)	1
Hepatorenal syndrome	1 (5.00)	1 (1.47)	0.4
Other	1 (5.00)	2 (2.94)	0.54
Immunological characteristics			
PRA, %	52.0 ± 41.0	1.63 ± 5.56	<0.001
DSA positive	17/19	0/18	<0.001
Luminex type 1 positive*	11/17	4/52	<0.001
Luminex type 2 positive†	14/17	4/52	<0.001

TABLE 2. Continued

	HIR (n = 20)	LIR (n = 68)	P Value
Total mismatch	5.10 ± 0.83	4.91 ± 1.00	0.61
HLA-DR mismatch	1.75 ± 0.45	1.66 ± 0.51	0.56
HLA-A, -B mismatch	3.5 ± 0.63	3.2 ± 0.82	0.29

NOTE: Data are given as mean ± SD or n (%). Luminex is a solid-phase antibody assay.

*Class 1 HLA.

†Class 2 HLA.

TABLE 3. Immunosuppressive Treatments

	HIR (n = 20)	LIR (n = 68)
Induction***	16 (80.0)	23 (33.8)
Thymoglobulin***	11 (55.0)	2 (2.94)
Basiliximab	3 (15.0)	20 (29.4)
OKT3	2 (10.0)	1 (1.47)
Initial immunosuppression		
Cyclosporine/azathioprine/prednisone	1 (5.00)	10 (14.7)
Cyclosporine/mycophenolate/prednisone	2 (10.0)	8 (11.8)
Cyclosporine/prednisone	3 (15.0)	5 (7.35)
Tacrolimus (FK)/mycophenolate/prednisone	13 (65.0)	44 (64.7)
FK/prednisone	1 (5.00)	1 (1.47)
Maintain immunosuppression		
Cyclosporine/azathioprine	0 (0.00)	1 (1.47)
Cyclosporine/mycophenolate	1 (5.00)	9 (13.2)
Cyclosporine/mTORi	1 (5.00)	1 (1.47)
FK/mycophenolate	9 (45.0)	28 (41.2)
FK/mTORi	1 (5.00)	3 (4.41)
mTORi/mycophenolate	0 (0.00)	2 (2.94)
Cyclosporine	4 (20.0)	9 (13.2)
FK	4 (20.0)	12 (17.6)
Mycophenolate	0 (0.00)	1 (1.47)
mTORi	0 (0.00)	2 (2.94)
Maintenance prednisone, yes**	19 (95.0)	40 (58.8)

NOTE: Data are given as n (%).

** $P < 0.01$; *** $P > 0.001$.

finding statistically significant differences between the HIR and LIR groups (Supporting Table 1).

PATIENT SURVIVAL

Patient survival was lower in HIR than in LIR patients (log-rank $P = 0.03$). Overall survival at 1 and 5 years was 70.0% versus 94.0% and 57.3% versus 88.0% for the HIR

and LIR groups, respectively. Also, patients with previous KT had lower survival than those patients without a previous transplant (log-rank $P < 0.001$; Fig. 2A). HIR and LIR patients with previous KT had equal patient survival rates (log-rank $P = 0.67$; Fig. 2B).

In the crude Cox regression model (Table 4), patient survival was negatively associated with HIR (hazard ratio [HR], 2.49; 95% CI, 1.10-5.64; $P = 0.03$). However, in the model weighted by IPTW and IPTW stabilized by the prevalence of HIR, patient survival was not associated with HIR ($P = 0.62$ and 0.71 , respectively).

For the univariate analysis, mortality was related to HIR (HR, 2.49; 95% CI, 1.10-5.64; $P = 0.03$), HCV infection (HR, 2.57; 95% CI, 1.19-5.57; $P = 0.02$), the time on dialysis longer than 24 months (HR, 2.58; 95% CI, 1.18-5.60; $P = 0.02$), and previous KT (HR, 4.03; 95% CI, 1.78-9.1; $P = 0.001$). All of these factors

were significantly more prevalent in HIR versus LIR patients (Table 2). However, in a multivariate analysis (Table 5), only previous KT retained significance (HR, 4.26; 95% CI, 1.36-13.4; $P = 0.01$). The loss of statistical significance of the association of HIR with mortality was also shown in both approaches of IPTW analyses (Table 4). There was no association between patient survival and rejection episodes ($P = 0.26$) or thymoglobulin induction ($P = 0.51$).

In the HIR group, the causes of death were related to respiratory infection ($n = 4$), acute myocardial infarction ($n = 1$), hepatic failure by HCV reactivation ($n = 1$), digestive bleeding ($n = 1$), cardiac insufficiency ($n = 1$), and complication of cardiac surgery ($n = 1$). In the LIR group, the causes of death were related to respiratory infections ($n = 4$), sepsis of unknown origin ($n = 2$), pulmonary carcinomas ($n = 3$), sudden deaths ($n = 2$), lymphoma ($n = 1$), colonic carcinoma ($n = 1$), pharyngeal carcinoma ($n = 1$), pancreatic carcinoma ($n = 1$), stroke ($n = 1$), carcinoma of unknown origin ($n = 1$), and hepatic failure by HCV reactivation ($n = 1$).

GRAFT SURVIVAL

Death-censored liver graft survival was not different among HIR and LIR patients (log-rank $P = 0.48$). Seven patients lost their liver graft in the follow-up period. Two liver graft losses occurred in HIR patients, due to HCV-related fibrosing cholestatic hepatitis and

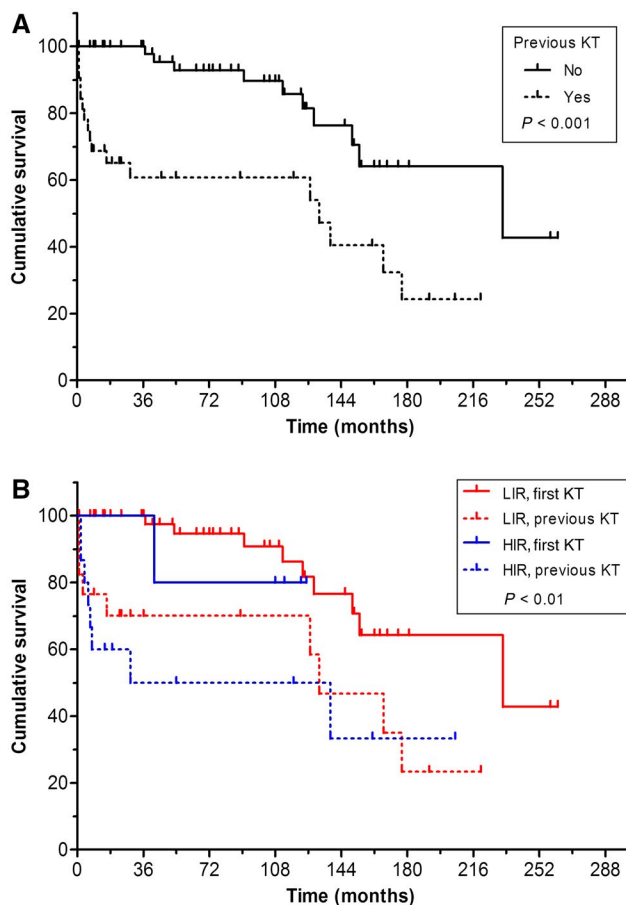


FIG. 2. The rates of patient survival. (A) Patient survival and previous KT. (B) Patient survival analysis according to the immunological risk and previous KTs.

TABLE 4. Patient Survival Proportional Cox Regression Models by Immunological Risk

Factor	Weight	HR (95% CI)	P Value
HIR	Crude	2.49 (1.1-5.64)	0.03
HIR	IPWT	1.16 (0.65-2.07)	0.62
HIR	IPWT corrected	1.21 (0.44-3.31)	0.71

TABLE 5. Multivariate Analysis for the Impact of Comorbidities and Immunological Risk on Overall Patient Survival

	HR (95% CI)	P Value
HIR	1.16 (0.46-2.92)	0.75
Previous KT	4.26 (1.36-13.4)	0.01
Length of dialysis		
1-24 months	0.78 (0.25-2.41)	0.66
>24 months	0.58 (0.15-2.22)	0.43
HCV infections	1.87 (0.72-4.85)	0.20

cryptogenic cirrhosis. Five liver graft losses occurred in LIR patients by hepatic artery thrombosis,⁽²⁾ cirrhosis due to alcoholic relapse,⁽¹⁾ cholangiocarcinoma de novo,⁽¹⁾ and cryptogenic cirrhosis.⁽¹⁾

Death-censored kidney graft survival was also not different between groups (log-rank $P = 0.48$; Fig. 3). Also, graft survival considering death as a competing event of graft loss was not different ($P = 0.39$).

There were 9 kidney graft losses at the follow-up, with 3 occurring early (within 3 months of SLKT) due to vascular anastomosis complications (2 in the LIR group, and 1 in the HIR group). The other 6 kidney graft losses occurred late, and all were in the LIR group: 3 by nephrocalcinosis and 3 attributed to chronic nephropathy but without histopathological confirmation.

The eGFR values were similar in both groups at 6, 12, 24, and 36 months and last follow-up (Table 6). Also, the estimation of eGFR means from the GEE model was not different between the 2 groups (Fig. 4; Table 6).

GRAFT REJECTION

A total of 14 patients had a liver graft rejection: 11 (16.2%) in the LIR group and 3 (15.0%) in the HIR group ($P = 0.89$) (Table 6). In total, 7 rejections were considered mild, 5 were moderate, and 2 were severe. Also, 9 patients received treatment with a corticosteroid bolus. All of the cases presented a good response to treatment.

Kidney graft rejection was significantly higher in HIR compared with LIR patients: 30.0% versus

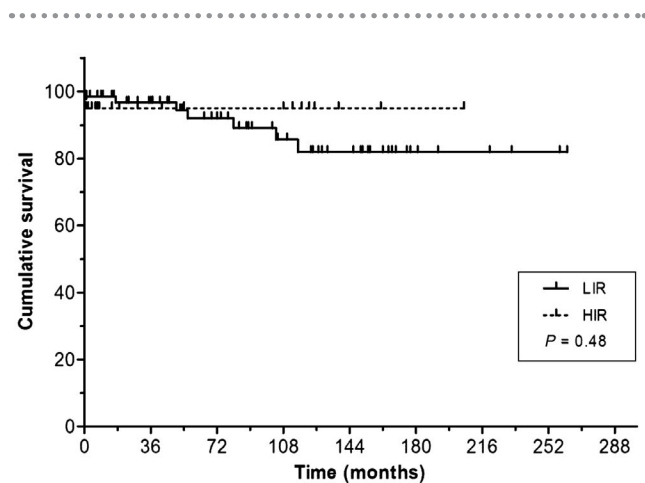


FIG. 3. Kidney graft survival censored for death with a functioning graft.

5.88%, respectively ($P < 0.01$; Table 6) with an odds ratio [OR], 6.86; 95% CI, 1.7-27.5; $P < 0.01$. There were 6 patients from the HIR group who developed at least 1 episode of rejection: 4 of them had a histological diagnosis of ABMR, whereas in 2 patients, rejections episodes were suspected on clinical grounds. There were 4 LIR patients who developed rejection episodes: 1 cellular rejection and 3 suspected ones.

Kidney graft rejection episodes occurred early: 8 episodes within the first month after SLKT and 1 cellular rejection at 4 months. Only 1 late ABMR episode was observed after 7 years of SLKT in an HIR patient.

All kidney graft rejections were treated based on clinical judgment. The suspected rejections were treated with corticosteroid boluses. There was 1 ABMR that required 6 sessions of plasmatic exchange (PE), and another one, in the absence of a response after 15 PE sessions, a dose of rituximab (RTX) (500 mg) was given and 5 more PE sessions were completed. One early ABMR (within the first 10 days of SLKT) did not require treatment due to spontaneous improvement. Regarding the late ABMR episode (7 years after SLKT), it occurred in the context of the initiation of HCV therapy and decreased levels of tacrolimus.

TABLE 6. Clinically Relevant Outcomes

	HIR Group (n = 20)	LIR Group (n = 68)	P Value
eGFR crude analysis, mL/minute/1.73 m ²			
6 months	58.1 ± 18.8	60.5 ± 20.3	0.66
12 months	60.4 ± 20.2	57.2 ± 20.0	0.61
24 months	55.2 ± 14.2	55.7 ± 17.3	0.92
36 months	57.3 ± 18.8	56.0 ± 18.2	0.85
Last follow-up	51.4 ± 20.2	56.0 ± 23.8	0.44
eGFR estimation from the GEE model, mL/minute/1.73 m ²			
6 months	58.1 (49.1-67.0)	60.2 (55.1-65.3)	0.94
12 months	57.5 (47.8-67.3)	57.4 (52.3-62.5)	0.76
24 months	55.2 (47.6-62.9)	56.6 (51.9-61.3)	0.98
36 months	56.8 (46.8-66.9)	57.3 (52.2-62.3)	0.68
Liver graft loss	2 (10.0)	5 (7.35)	0.65
Kidney graft loss (censored for death)	1 (5.0)	8 (11.8)	0.68
Liver rejection episodes	3 (15.0)	11 (16.2)	0.89
Kidney rejection episodes	6 (30.0)	4 (5.88)	<0.01
Suspected kidney rejection	2 (10.0)	3 (4.41)	0.32
Acute cellular kidney rejection	0 (0.0)	1 (1.47)	1
Kidney ABMR	4 (20.0)	0 (0.0)	<0.01

NOTE: Data are given as mean ± SD, median (95% CI), or n (%).

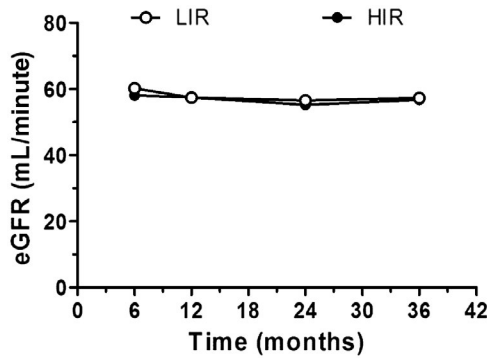


FIG. 4. The eGFR estimation from the GEE model.

Consequently, tacrolimus levels were increased to resolve ABMR episodes.

All patients experiencing rejection episodes had a good clinical response with an improvement of the glomerular filtration rate. Only 3 HIR patients had delayed kidney graft function (at least 1 postoperative dialysis session during the first week after transplantation) in the context of ABMR rejection immediately after transplant.

XM AND DSA FOLLOW-UP

In 4 out of 12 patients with positive pretransplant XM (CDCXM or FCXM), the XM was subsequently monitored from 3 days to 5 months after SLKT, and XM determinations were negative in all patients.

The DSAs at SLKT time and follow-up are described in Table 7. In the HIR group, 15 patients had positive DSAs. The bead-based single-antigen assay was repeated after transplantation in 6 patients; the DSAs either became negative or had a significant decrease in all examined patients.

INFECTIOUS AND NEOPLASTIC COMPLICATIONS

There were 15 and 1 malignancies in the LIR and HIR groups, respectively, during the follow-up period ($P = 0.11$). Malignancies observed were skin ($n = 2$), gynecological ($n = 2$), cholangiocarcinomas ($n = 2$), lymphomas ($n = 2$), pancreatic ($n = 1$), pulmonary ($n = 3$), colonic ($n = 1$), lingual ($n = 1$), mammary ($n = 1$), and carcinoma of unknown origin ($n = 1$).

The incidence of infections that required in-hospital treatment in the 2 years after transplantation was

TABLE 7. DSA and Follow-up in HIR

Patient Number	DSA at SLKT Type/MFI	DSA at Follow-Up Type/MFI	Time of DSA Follow-up
1	A9/15778	A9 190	3 months
	A2/21453	A2 1020	
	B44/21677	B44 493	
	B56/20896	B56 1010	
	DR01/20587	DR01 4377	
2	CDC+ A29	not detected (N/D)	
	CDC+ A30		
3	A25/11778	N/D	
	B35/15735		
	DR15/2686		
4	A2/10646	N/D	
	DR4/3506		
	DR7/17651		
5	B39/22748	B39 186	2 months
	DR13/26397	DR13 260	
6	A1/8716	A1 CDC negative	5 months
	DR7/2400	N/D	
7	DR14/15570		
8	DR8/9160	DR8 3763	1 month
	DR11/9769	DR11 4915	
9	DR3/3993	DR3/180	14 months
	DQB106:02/12479	DQB106:02/1025	
10	A2 8620	N/D	
11	DR3 4859	205	7 years
12	B44 2149	N/D	
13	A31 2800	N/D	
14	DR8 9093	N/D	
	DR14 9434		
	DQB1 04:02 11330		
15	A2 21609	N/D	
	A24 21326		
	DR11 3915		

not different between groups ($P = 0.17$). There were 50 infections in 41 patients: urinary tract infections ($n = 16$), cases of pneumonia ($n = 12$), bacteremias of unknown origin ($n = 4$), skin infections ($n = 4$), cytomegalovirus disease ($n = 5$), sepsis of unknown origin ($n = 3$), catheter-related bacteremias ($n = 2$), biliary sepsis ($n = 2$), liver abscess ($n = 1$), and enteritis ($n = 1$).

Discussion

In our cohort, the only factor associated with worse overall survival in the multivariate analysis was a

previous KT (HR, 4.26; 95% CI, 1.36–13.4). Moreover, the IPTW analysis did not support the association of immunological risk with patient survival. This suggests that the comorbidities associated with allosensitization are independent risk factors for kidney graft and patient survival, whereas immunological risk, per se, is not. We used the IPTW analysis as a complementary approach for the analysis of univariate and adjusted Cox regression models. The factors included in the PS calculation were previous KT, HCV, and the time on dialysis because these factors and HIR showed associations for overall survival in the univariate analyses.

There is a registry study of SLKT that reported higher mortality in sensitized recipients (positive pretransplant XM or PRA >10%).⁽²¹⁾ Sensitization was associated with an increase of 20% in mortality and 16% of graft loss compared with unsensitized patients (HR, 1.22). In this study, time on dialysis, diabetes, and previous transplant were significantly more prevalent in sensitized patients.⁽²¹⁾

Recently, the impact of induction therapy in the SLKT recipients has been analyzed using the United Network for Organ Sharing database.⁽²⁶⁾ The induction therapy, either interleukin-2 receptor antagonist (IL2RA) and rabbit anti-thymocyte globulin (r-ATG), was not associated with a reduction in graft rejection or with a patient survival benefit. However, interestingly, r-ATG and history of previous LT were independently associated with higher mortality in the multivariate analysis (HR, 1.29 and 1.35, respectively). Unfortunately, the immunological risk and previous KT history, which were more prevalent in the r-ATG group, were not evaluated in the multivariate model.

A previous transplant is associated with a cumulative burden of immunosuppression, and the dominant threats to recipient survival are cardiovascular events, infection, and malignancy, which are conditions exacerbated by immunosuppression.⁽²⁷⁾ Also, the higher levels of immunosuppression in SLKT compared with LT have been associated with a worse prognosis in HCV-positive patients.⁽²⁸⁾

O'Leary et al. analyzed the impact of DSA in 30 patients undergoing SLKT. In the multivariate analysis, class 2 DSA was an independent predictor of patient death (HR, 2.2; $P = 0.04$).⁽²²⁾ On the other hand, more recently, Leca et al. reported that in 56 SLKTs, the immunological risk does not have a negative impact on patient or renal allograft survival.⁽²⁹⁾ Notably, HCV infection, the time on dialysis, and previous KTs were balanced in both groups.

In our cohort, the kidney graft rejection was significantly higher in HIR versus LIR patients (30.0% versus 5.88%; OR, 6.86). Out of 10 kidney rejections, 9 occurred early after SLKT. All patients with ABMR had an improvement of renal function, and the repeated renal biopsy showed the absence of antibody rejection activity, even though 2 patients were not treated specifically for ABMR.

Although there was a higher incidence of rejections in HIR patients, renal function was not different between HIR and LIR patients or between patients with and without rejections. In the GEE model estimating the intrasubject correlation, the eGFR means were not different. However, the absence of chronic rejection does not diminish the importance of episodes of acute rejection. In this sense, Nilles et al. reported a prevalence of rejections close to 20% with a decrease in eGFR over time in patients with renal rejections ($P < 0.01$).⁽³⁰⁾

Regarding chronic immune injury to kidney grafts in SLKT, a recent study comparing SLKT versus KT alone concluded that regardless of DSA status, the prevalence of transplant glomerulopathy (TG) was 0 in SLKT, suggesting the absence of chronic antibody-mediated damage.⁽³¹⁾

The liver is an immune organ capable of modifying the immune system of the recipient.^(32–35) Its immunomodulatory properties probably rely on several mechanisms including hepatic graft release of soluble class 1 antigens and HLA-G,^(36–38) removal of lymphocytotoxic antibodies by Kupffer cells, and dendritic liver cell regulation of innate and adaptive immunity.^(39–41) In this sense, 2 recently remarkable studies of Taner et al. enlightened the mechanism of tolerance in SLKT.^(42,43) At 1-year surveillance biopsies of kidney grafts, KT recipients with positive XM, but not SLKT with positive XM, had increased expression of genes associated with donor-specific antigens, inflammation, and endothelial cell activation. Moreover, overall SLKT recipients had a marked increased expression of genes associated with tissue integrity/metabolism, regardless of the XM status.⁽⁴²⁾ Also, SLKT and LT appear to be associated with a decrease of donor-specific alloresponse compared with KT recipients, although their response to third-party cells was unaltered. Accordingly, alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ circulating blood cells in the SLKT were less frequent.⁽⁴³⁾ These studies demonstrated that the immunomodulatory capacity of the liver can be extended beyond the local microenvironment and that it is allospecific. Furthermore, partial auxiliary LT has been performed

as a strategy to avoid kidney graft loss in 7 hyperimmunized patients with promising results. However, even in this small cohort, 2 patients lost their graft, one by an early ABMR and another in the context of severe surgical complications related to the liver graft.⁽¹⁹⁾ This study highlights that liver protection over the kidney is not complete and the surgical risk of LT has to be balanced with the immunological benefits for the transplanted kidney. The authors proposed that the anti-donor antibody levels have to be sufficiently low to avoid a hyperacute rejection.⁽¹⁹⁾ This is a difficult border to define in our cohort because even those patients with high MFIs had a good kidney posttransplant outcome.

Dar et al. considered that class 1 DSAs were preferentially cleared in SLKT and argued that liver allografts may not be fully protective of renal allograft if class 2 DSAs are present.⁽⁴⁴⁾ However, in our cohort, the pretransplant positive class 2 DSAs became negative or had a significant decrease after transplantation (Table 7).

The extended inclusion period and broad definition of high immune risk (presence of DSAs and/or positive XM) could be considered limitations of this study. Other limitations are that blood tests were not performed at specified intervals of time and that the decisions to perform a single antigen assay were based on clinical judgment. However, no patient presented acute immunological graft loss or chronic immune damage. On the other hand, a positive outcome of our experience relies on the immunological risk assessment in correlation to the comorbidities.

In our experience, HIR patients have a higher prevalence of acute rejection after SLKT. However, in our study, this prevalence did not affect kidney graft survival and function in the long term. Nevertheless, a longer follow-up or a larger sample could show a worse evolution of the grafts.

Kidney graft tolerance in sensitized SLKT is not complete, but it is better than in KT alone. The impact of allosensitization on patient and graft survivals should be carefully weighed against the comorbidities because a greater sensitization is associated with greater comorbidities.

Considering the higher incidence of early rejections in HIR patients, greater vigilance seems justified, at least in the early stages of transplantation, as well as more potent induction therapy. On the other hand, there are doubts about the need for more potent maintenance immunosuppression in cases of high immune risk, considering that these patients usually have a higher rate

of comorbidities and have a higher risk of longterm adverse effects of the immunosuppressive drugs.

In our opinion, the protective role of the liver on renal allograft in SLKT transplantation offers a good alternative that may be considered in those patients with HIR.

Acknowledgments: The authors thank Verónica Lazaro for help in this study.

REFERENCES

- 1) Noreen HJ, McKinley DM, Gillingham KJ, Matas AJ, Segall M. Positive remote crossmatch: impact on short-term and long-term outcome in cadaver renal transplantation. *Transplantation* 2003;75:501-505.
- 2) Caro-Oleas JL, Gonzalez-Escribano MF, Gonzalez-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chaves V, Gentil-Govantes MA, Núñez-Roldán A. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:1231-1238.
- 3) Kanter Berga J, Sancho Calabuig A, Gavela Martinez E, Puig Alcaraz N, Beltran Catalan S, Avila Bernabeu A, et al. Pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single antigen bead flow cytometry: risk factors and outcomes after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2012;44:2529-2531.
- 4) Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins LS, Fonseca I, Beirao I, et al. Analysis of preformed donor-specific anti-HLA antibodies characteristics for prediction of antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transplant Immunol* 2015;32:66-71.
- 5) Redondo-Pachon D, Perez-Saez MJ, Mir M, Gimeno J, Llinas L, Garcia C, et al. Impact of persistent and cleared preformed HLA DSA on kidney transplant outcomes. *Hum Immunol* 2018;79:424-431.
- 6) Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003;3:665-673.
- 7) Fidler SJ, Irish AB, Lim W, Ferrari P, Witt CS, Christiansen FT. Pre-transplant donor specific anti-HLA antibody is associated with antibody-mediated rejection, progressive graft dysfunction and patient death. *Transplant Immunol* 2013;28:148-153.
- 8) Marfo K, Ajaimy M, Colovai A, Kayler L, Greenstein S, Lubetzky M, et al. Pretransplant immunologic risk assessment of kidney transplant recipients with donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies. *Transplantation* 2014;98:1082-1088.
- 9) Gordon RD, Fung JJ, Markus B, Fox I, Iwatsuki S, Esquivel CO, et al. The antibody crossmatch in liver transplantation. *Surgery* 1986;100:705-715.
- 10) Mañez R, Kelly RH, Kobayashi M, Takaya S, Bronsther O, Kramer D, et al. Immunoglobulin G lymphocytotoxic antibodies in clinical liver transplantation: studies toward further defining their significance. *Hepatology* 1995;21:1345-1352.
- 11) Hathaway M, Gunson BK, Keogh AC, Briggs D, McMaster P, Neuberger JM. A positive crossmatch in liver transplantation—no effect or inappropriate analysis? A prospective study. *Transplantation* 1997;64:54-59.
- 12) Neumann UP, Lang M, Moldenhauer A, Langrehr JM, Glanemann M, Kahl A, et al. Significance of a T-lymphocytotoxic crossmatch in liver and combined liver-kidney transplantation. *Transplantation* 2001;71:1163-1168.

- 13) Morrissey PE, Gordon F, Shaffer D, Madras PN, Silva P, Sahyoun AI, et al. Combined liver-kidney transplantation in patients with cirrhosis and renal failure: effect of a positive cross-match and benefits of combined transplantation. *Liver Transpl Surg* 1998;4:363-369.
- 14) Flye MW, Duffy BF, Phelan DL, Ratner LE, Mohanakumar T. Protective effects of liver transplantation on a simultaneously transplanted kidney in a highly sensitized patient. *Transplantation* 1990;50:1051-1054.
- 15) Saidman SL, Duquesnoy RJ, Demetris AJ, McCauley J, Ramos H, Mazariegos G, et al. Combined liver-kidney transplantation and the effect of preformed lymphocytotoxic antibodies. *Transplant Immunol* 1994;2:61-67.
- 16) Lang M, Neumann U, Kahl A, Steinmuller T, Settmacher U, Neuhaus P. Long-term outcome of 27 patients after combined liver-kidney transplantation. *Transplant Proc* 2001;33:1440-1441.
- 17) Shapiro R, Zeevi A. Why does combined liver and kidney transplantation confer an immunologic benefit to a kidney? *Pediatr Transplant* 2010;14:439-440.
- 18) Mosconi G, Scolari MP, Feliciangeli G, Zanetti A, Zanelli P, Buscaroli A, et al. Combined liver-kidney transplantation with preformed anti-HLA antibodies: a case report. *Transplant Proc* 2006;38:1125-1126.
- 19) Olausson M, Mjörnstedt L, Nordén G, Rydberg L, Mölne J, Backman L, Friman S. Successful combined partial auxiliary liver and kidney transplantation in highly sensitized cross-match positive recipients. *Am J Transplant* 2007;7:130-136.
- 20) Eid A, Moore SB, Wiesner RH, DeGoey SR, Nielson A, Krom RA. Evidence that the liver does not always protect the kidney from hyperacute rejection in combined liver-kidney transplantation across a positive lymphocyte crossmatch. *Transplantation* 1990;50:331-334.
- 21) Askar M, Schold JD, Eghtesad B, Flechner SM, Kaplan B, Klingman L, et al. Combined liver-kidney transplants: allo-sensitization and recipient outcomes. *Transplantation* 2011;91:1286-1292.
- 22) O'Leary JG, Gebel HM, Ruiz R, Bray RA, Marr JD, Zhou XJ, et al. Class II alloantibody and mortality in simultaneous liver-kidney transplantation. *Am J Transplant* 2013;13:954-960.
- 23) Castillo-Rama M, Castro MJ, Bernardo I, Meneu-Diaz JC, Elola-Olaso AM, Calleja-Antolin SM, et al. Preformed antibodies detected by cytotoxic assay or multibead array decrease liver allograft survival: role of human leukocyte antigen compatibility. *Liver Transpl* 2008;14:554-562.
- 24) Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461-470.
- 25) Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:452-458.
- 26) AbdulRahim N, Anderson L, Kotla S, Liu H, Ariyamuthu VK, Ghanta M, et al. Lack of benefit and potential harm of induction therapy in simultaneous liver-kidney transplants. *Liver Transpl* 2019;25:411-424.
- 27) Feng S, Bucuvalas J. Tolerance after liver transplantation: where are we? *Liver Transpl* 2017;23:1601-1614.
- 28) Hibi T, Nishida S, Sageshima J, Levi DM, Ruiz P, Roth D, et al. Excessive immunosuppression as a potential cause of poor survival in simultaneous liver/kidney transplantation for hepatitis C. *Transplant Int* 2014;27:606-616.
- 29) Leca N, Warner P, Bakthavatsalam R, Nelson K, Halldorson J, Rayhill S, et al. Outcomes of simultaneous liver and kidney transplantation in relation to a high level of preformed donor-specific antibodies. *Transplantation* 2013;96:914-918.
- 30) Nilles KM, Krupp J, Lapin B, Sustento-Reodica N, Gallon L, Levitsky J. Incidence and impact of rejection following simultaneous liver-kidney transplantation. *J Hepatol* 2015;62:340-345.
- 31) Taner T, Heimbach JK, Rosen CB, Nyberg SL, Park WD, Stegall MD. Decreased chronic cellular and antibody-mediated injury in the kidney following simultaneous liver-kidney transplantation. *Kidney Int* 2016;89:909-917.
- 32) Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* 2010;10:753-766.
- 33) Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 2013;14:996-1006.
- 34) Crispe IN. Immune tolerance in liver disease. *Hepatology* 2014;60:2109-2117.
- 35) Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006;43(suppl 1):S54-S62.
- 36) Sumimoto R, Kamada N. Specific suppression of allograft rejection by soluble class I antigen and complexes with monoclonal antibody. *Transplantation* 1990;50:678-682.
- 37) Davies HS, Pollard SG, Calne RY. Soluble HLA antigens in the circulation of liver graft recipients. *Transplantation* 1989;47:524-527.
- 38) Créput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D, Dausset J, et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol* 2003;39:587-594.
- 39) Fung J, Makowka L, Tzakis A, Klintmalm G, Duquesnoy R, Gordon R, et al. Combined liver-kidney transplantation: analysis of patients with preformed lymphocytotoxic antibodies. *Transplant Proc* 1988;20(suppl 1):88-91.
- 40) Gugenheim J, Le Thai B, Rouger P, Gigou M, Gane P, Vial MC, et al. Relationship between the liver and lymphocytotoxic alloantibodies in inbred rats. specific absorption by nonparenchymal liver cells. *Transplantation* 1988;45:474-478.
- 41) Sumpter TL, Abe M, Tokita D, Thomson AW. Dendritic cells, the liver, and transplantation. *Hepatology* 2007;46:2021-2031.
- 42) Taner T, Park WD, Stegall MD. Unique molecular changes in kidney allografts after simultaneous liver-kidney compared with solitary kidney transplantation. *Kidney Int* 2017;91:1193-1202.
- 43) Taner T, Gustafson MP, Hansen MJ, Park WD, Bornschlegl S, Dietz AB, Stegall MD. Donor-specific hypo-responsiveness occurs in simultaneous liver-kidney transplant recipients after the first year. *Kidney Int* 2018;93:1465-1474.
- 44) Dar W, Agarwal A, Watkins C, Gebel HM, Bray RA, Kokko KE, et al. Donor-directed MHC class I antibody is preferentially cleared from sensitized recipients of combined liver/kidney transplants. *Am J Transplant* 2011;11:841-847.

Objetivo 4

Valorar la eficacia de la fotoaféresis extracorpórea para el manejo del rechazo del injerto renal mediado por anticuerpo.

1. Desarrollar un modelo experimental en rata de rechazo de injerto renal mediado por anticuerpos.
2. Desarrollar un modelo en rata de fotoaféresis extracorpórea en trasplante renal
3. Evaluar el impacto de la fotoaféresis extracorpórea en un modelo en rata de rechazo de injerto renal mediado por anticuerpos.

1. Justificación del objetivo:

El rechazo mediado por anticuerpos (ABMR) y las complicaciones relacionadas con la inmunosupresión son aspectos críticos que deben abordarse probablemente con nuevas terapias.(21,22,207) Los nuevos tratamientos deben demostrar un buen perfil de seguridad, al tiempo que se logra el control deseado de la respuesta aloinmune. En este sentido, las terapias celulares, pueden ser una opción adecuada proporcionando control de la aloinmunidad sin incrementar la inmunosupresión. (161,163,208) La fotoaféresis extracorpórea (ECP) es una terapia celular que ha demostrado eficacia en el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped entidad producida tras el trasplante de médula ósea.(167). Respecto al trasplante de órgano sólido, la ECP ha demostrado eficacia en el trasplante de pulmón y corazón, mejorando la respuesta en episodios de rechazo resistente a esteroides. También se ha utilizado como terapia complementaria a la inmunosupresión estándar para reducir la incidencia de rechazo agudo del injerto durante los primeros meses

después del trasplante.(168–170,173,177,209–213) En el trasplante renal, la mayor parte de la información se deriva de informes de casos, pequeñas series retrospectivas y un estudio prospectivo con seguimiento breve.(169,182,184,214–217)

Un aspecto destacable de la ECP es la inducción de tolerancia inmuno-específica sin producir un aumento de la inmunosupresión general y por lo tanto, sin aumentar el riesgo de infección.(179,180,218)

Por todo esto consideramos que la ECP es una terapia promisoriosa que debe ser evaluada en el contexto del rechazo de injerto renal mediado por anticuerpos.

Un modelo animal de rechazo renal mediado por anticuerpos ofrece la posibilidad de estudiar la ECP bajo condiciones controladas, pudiendo evidenciar la eficacia de la ECP en forma aislada.

2. Material y Métodos

Modelo animal

Se utilizaron como donantes ratas consanguíneas Dark Agouti (DA, RT1-A^{av1}) para el trasplante renal alogénico a ratas Lewis receptoras (L, RT1-A¹), en ambos casos se usaron machos. La técnica quirúrgica se realizó como se describió anteriormente.(219) Brevemente, la obtención de riñón del donante y el trasplante de riñón se realizaron bajo anestesia con isoflurano. Los riñones de los donantes se lavaron con solución Celsior a 4°C y se almacenaron en solución Celsior a 4°C hasta la implantación. Los trasplantes renales se realizaron con dos anastomosis terminolaterales, entre la arteria renal del donante y la aorta abdominal del receptor, y entre la vena cava inferior del receptor y la vena renal del donante. La ureteroureterostomía se realizó con una técnica de suturas interrumpidas de extremo a extremo. Las ratas receptoras fueron binefrectomizadas en el momento del trasplante. Los animales se mantuvieron a temperatura y humedad constantes y en un ciclo de luz / oscuridad de 12 horas con acceso libre a agua y comida.

Terapia inmunosupresora

Se estableció una dosis de tacrolimus (TAC) de corta duración para favorecer la función inicial del injerto, evitando una rápida pérdida por rechazo celular agudo. Se administró TAC durante 4 días consecutivos (-1, 0, +1 y +2 respecto al trasplante). Para establecer la dosis de TAC a utilizar, los receptores de Lewis se dividieron en tres grupos de dosis de TAC, 0,1, 0,25 o 0,5 mg / kg y un grupo de control (N = 6, 10, 3 y 8 respectivamente).

Detección de anticuerpos donante específicos

La detección de anticuerpos donante específicos (DSA) se realizó en muestras de suero recogidas a lo largo del experimento.

Tras aislar esplenocitos de rata donante Dark Agouti (5×10^5 células / muestra) y re suspender en tampón MACS durante 10 minutos a temperatura ambiente, se incubaron con 25 μ l de muestras de suero de Lewis receptoras durante 30 minutos. Las células se lavaron tres veces y luego se incubaron con un panel de marcadores que incluye IgG anti-rata de ratón conjugado con FITC (dilución 1: 100), marcadores CMH de clase I y II durante 20 minutos más. Después de lavar (3 veces), las células se suspendieron en 150 μ l de tampón MACS y se analizaron en un citómetro FACS Canto II. Como controles negativos, las células se incubaron con suero de ratas Lewis no inmunizadas. Los anticuerpos específicos del donante (DSA) de clase I y II se cuantificaron mediante el índice de fluorescencia medio (MFI) de la tinción de FITC-IgG en células que expresaban MHC de clase I o II, reconocidas con anticuerpos OX-18 y HIS19 respectivamente.

Histología convencional e inmunofluorescencia

A los seis días del trasplante, se realizó un estudio morfológico e inmunohistoquímico en cinco receptores Lewis para identificar el tipo de rechazo del injerto. El tejido fue fijado con formol y posteriormente incluido en parafina. Se utilizaron secciones (3 μ m de espesor) montadas en portaobjetos de vidrio de xileno (Dako, Carpinteria, CA) para inmunohistoquímica. Una vez realizada la recuperación del antígeno, se realizó el bloqueo de peroxidasa

endógena durante 10 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% (Merck, Darmstadt, Alemania) antes de la incubación primaria del anticuerpo. El anticuerpo primario, anti-C4d de rata (Hycult Biotech, PA), se incubó durante 16 horas a 4°C. Tras unos lavados se aplicó durante 1 hora un anticuerpo secundario anti-conejo específico del sistema Envision marcado con polímero de peroxidasa de rábano picante (Dako, Glostrup, Dinamarca). Todas las secciones se tiñeron por contraste con hematoxilina Mayer. El procedimiento inmunohistoquímico se realizó al mismo tiempo para evitar posibles variaciones diarias en el rendimiento de la tinción. Todas las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio clínico Olympus BX51 y una cámara digital y software DP70 (Olympus, Tokio, Japón). Un patólogo renal evaluó las tinciones de hematoxilina / eosina, ácido periódico de Schiff y C4d para evaluar el daño renal.

Fotoféresis extracorpórea sobre células alorreactivas

Para realizar la fotoféresis extracorpórea se sacrificó un total de 42 ratas LEW trasplantadas con el fin de obtener leucocitos alorreactivos. Cuatro días después del trasplante de DA-L (Figura 1), se recogieron 8 ml de sangre periférica y el bazo de las ratas receptoras Lewis, se separaron y se pasaron a través de un colador de células. Se eliminaron los glóbulos rojos usando tampón de lisis de glóbulos rojos (Multi-especies 10x, eBioscience), luego se lavó y se contó la suspensión de células alogénicas (Lew^{DA}). Ambas suspensiones celulares se caracterizaron y posteriormente se combinaron.

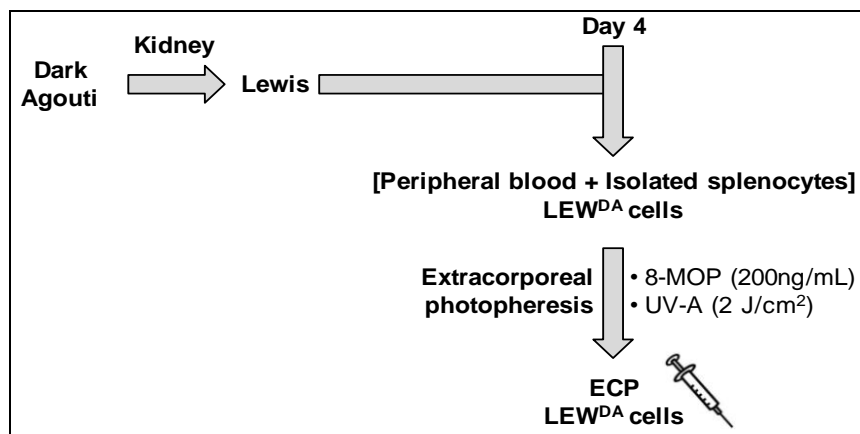


Figure 1. Generación de células ECP. Cuatro días después del trasplante, se obtuvo la suspensión de células leucocitarias (LEWDA) de sangre periférica y bazo. Se administró 8-MOP a las células LEWDA y 30 minutos después se iluminó la suspensión celular con UV-A (2 J/cm^2) en MacoGenic (MACOPharma). DA, ratas Dark Agouti; LEW, ratas Lewis; 8-MOP, psoraleno; ECP, fotoféresis extracorpórea.

La caracterización de las células Lew^{DA} alorreactivas se realizó mediante citometría de flujo. Los marcadores de superficie celular se tiñeron con los anticuerpos indicados en la Tabla 1, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todas las muestras, se utilizó el kit de células muertas Aqua Live / Dead (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para identificar y descartar del análisis las células muertas. El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EE. UU.).

Tabla 1: Anticuerpos de citometría de flujo para la caracterización de linfocitos.

Marcador	Dye	Cat. N°	Clon	Compañía
IgG	FITC	11-4811	Polyclonal	eBioscience
CD3	FITC	11-0030	eBioG4.18	eBioscience
CD45R (B220)	FITC	11-0460	HIS24	eBioscience
CD3	PE	12-0030	eBioG4.18	eBioscience
MHC-II	PE	12-0920	HIS19	eBioscience
CD45R (B220)	PE	12-0460	HIS24	eBioscience
CD3	PerCP eFluor 710	46-0030	eBioG4.18	eBioscience
CD161	PerCP eFluor 710	46-1610	10/78	eBioscience
CD90.1 (Thy1.1)	PE-Cy7	25-0900	HIS51	eBioscience
CD8	PE-Cy7	25-0084	OX8	eBioscience
CD3	APC	12-0030	eBioG4.18	eBioscience
MHC-I (RT1-A)	APC	17-0921	OX18	eBioscience
CD8	APC	17-0084	OX8	eBioscience
CD45	APC-Cy7	47-0461	OX1	eBioscience
CD4	V450	561579	OX35	BD Horizon
Aqua live-dead	Pacific orange	L34957	---	Thermo Fisher

La descripción general de la estrategia de *gating* de las células T, NK y B se muestra en la Figura 2.

Una vez mezcladas las dos suspensiones de células Lew^{DA} , de bazo y sangre periférica, se incorporó psoraleno a 2000 ng / ml y 30 minutos más tarde se iluminó con UV-A (2J / cm²) en el sistema MacoGenic G2 (MacoPharma).

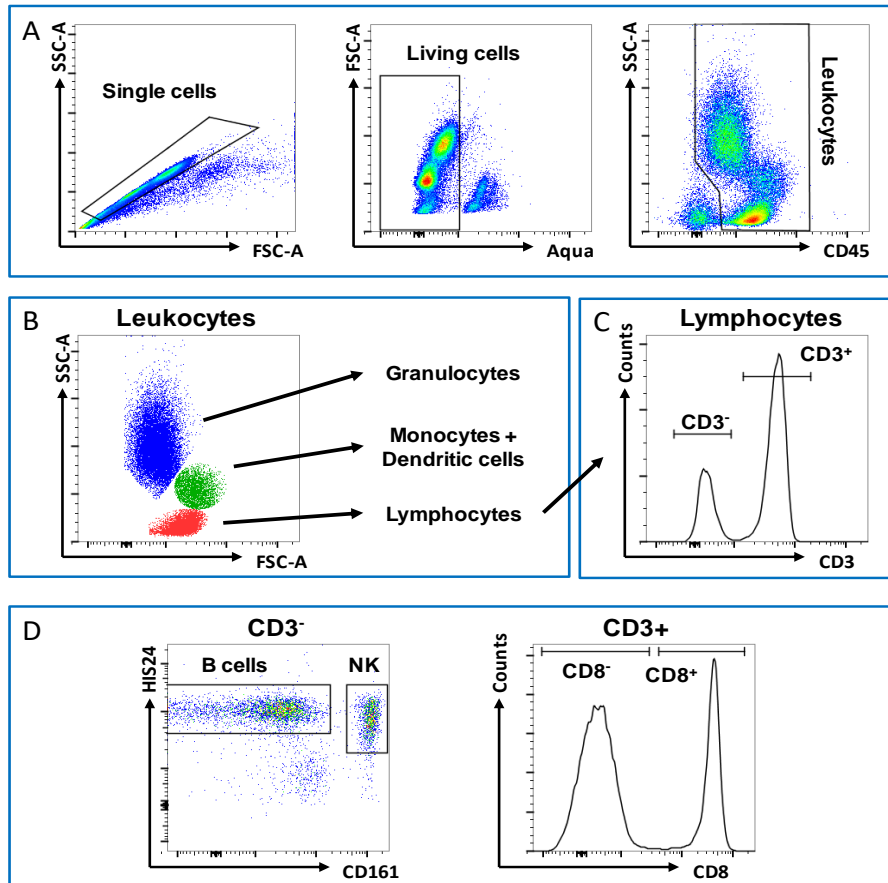


Figure 2. Descripción general de la estrategia de gating para la caracterización de leucocitos de muestras de sangre periférica y bazo. (A) En primer lugar, se excluyeron los eventos no únicos (área de dispersión hacia adelante versus altura de dispersión hacia adelante) y las células muertas (kits de tinción de células muertas reparables VIVAS/MUERTAS, ThermoFisher); control de leucocitos (área de dispersión delantera frente a CD45). (B) Los leucocitos se diferenciaron en granulocitos, monocitos + células dendríticas y linfocitos según FSC y SSC. (C) Los linfocitos se diferenciaron según la tinción de CD3; células no T frente a células T. (D) Las células no T (o linfocitos CD3⁻) se diferenciaron en células B y células NK debido a la clasificación de CD45R y CD161, mientras que las células T (o linfocitos CD3⁺) se diferenciaron en células T CD8⁻ (células T CD4⁺) y células T CD8⁺.

Análisis del producto de ECP

La viabilidad del producto ECP y la capacidad proliferativa en cultivo fueron evaluadas utilizando fitohemaglutinina (PHA-L) como mitógeno para desencadenar la división celular de los linfocitos T. Las células ECP se

caracterizaron fenotípicamente mediante citometría de flujo. La viabilidad del producto ECP se analizó utilizando anexina V y tintes viables. La capacidad proliferativa de las células ECP se determinó mediante citometría de flujo usando tinción con éster N-succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE).

Diseño Experimental

Los receptores de Lewis se dividieron en tres grupos. Todos los grupos recibieron TAC intravenoso (0,25 mg / kg) durante 4 días (-1, 0, +1 y +2 días con respecto al trasplante). El grupo 1 (N = 10) recibió solo TAC, mientras que los grupos 2 (N = 4) y 3 (N = 9), además de TAC, recibieron una inyección intravenosa de 10×10^6 o 100×10^6 células ECP respectivamente. En ambos de estos grupos se administraron siete dosis de células ECP en solución salina tamponada con fosfato a los días -7, -3, 0, +2, +4, +7 y +14 con respecto al trasplante (Figura 3). Se midieron los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina sérica para determinar la función renal.

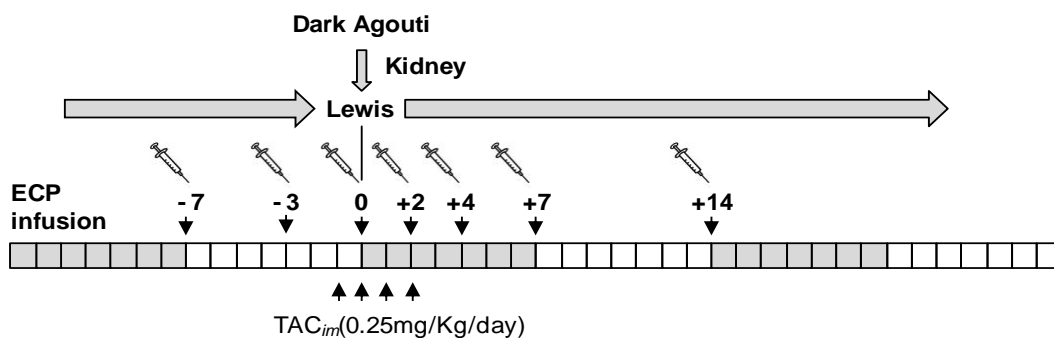


Figura 3: Esquema de tratamiento de fofoféresis extracorpórea (ECP) en el modelo de trasplante de riñón DA-L en rata. TAC_{im}, inyección intramuscular de tacrolimus.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS 21.0. Se realizó un análisis univariante mediante la prueba de rango logarítmico (curvas de Kaplan-Meier) para evaluar la supervivencia de la rata y del injerto (tiempo desde el trasplante de riñón hasta la muerte). Los valores se dan como media \pm DE. Se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney U cuando fue aplicable.

Ética

El estudio fue aprobado y realizado de acuerdo con las directrices del comité local de ética animal (Decreto 214/97).

3. Resultados

Realizamos un modelo de rechazo de injerto de renal mediado por anticuerpos en rata, para determinar las propiedades inmunomoduladoras de ECP. Los resultados primarios a evaluar fueron la supervivencia de injertos y de los animales.

Evolución natural del trasplante renal alogénico (DA-L) sin inmunosupresión

Las ratas Lewis que recibieron un injerto de riñón DA murieron dentro de los ocho días posteriores al trasplante (supervivencia media $6,12 \pm 1,28$ días), mientras que las ratas Lewis que recibieron un injerto de riñón isogénico (donante de Lewis) sobrevivieron hasta el último día del experimento (establecido en D + 15 después de trasplante). La caracterización del trasplante de riñón alogénico (DA-L) se muestra en la Figura 4.

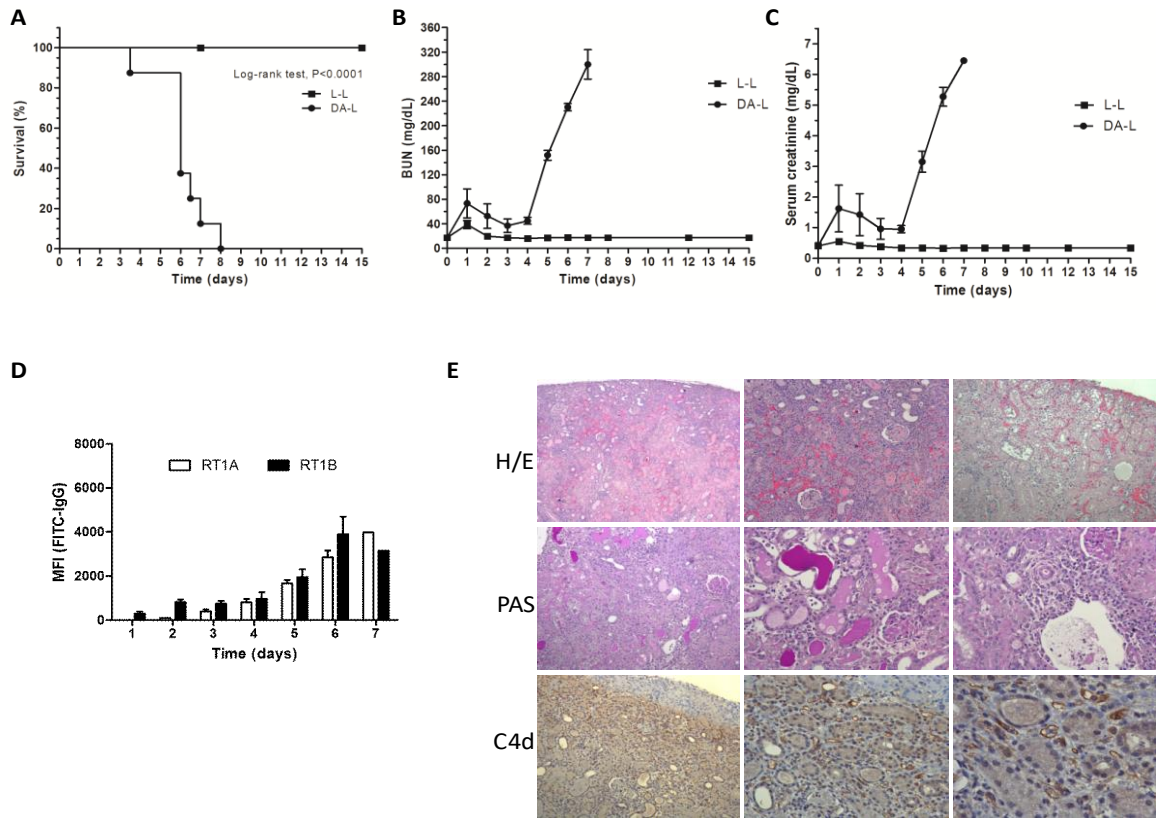


Figura 4. Caracterización del modelo de trasplante renal en rata DA-L. (A) Análisis de supervivencia, trasplante de riñón isogénico (L-L, n=11, cuadrado) *versus* alogénico (DA-L, n=8, círculo). (B, C) Análisis de la función renal incluyendo BUN y creatinina sérica. (D) Anticuerpos donante específicos, CMH-clase I (RT1A) y clase II (RT1B) de rata. (E) Imágenes representativas que ilustran las lesiones renales en el modelo DA-L tras 6 días postrasplante. Las tinciones de Hematoxilina/Eosina, ácido periódico Schiff (PAS) e inmunohistoquímica para C4d se realizaron para definir el tipo de rechazo producido en modelo DA-L, tal y como se puede apreciar se trata de un rechazo mediado por anticuerpos.

El modelo de trasplante de riñón DA-L se caracterizó por un ligero deterioro de la función renal el día +1 postrasplante, seguido de una mejoría de la función renal y, posteriormente, a partir del día +4, una rápida disminución de la función renal con un aumento de BUN y niveles de creatinina sérica, pérdida de la función del injerto y muerte de la rata (Figura 4B, 4C). Los DSA anti-RT1A y anti-RT1B se detectaron desde el día tres con un aumento progresivo hasta el día 7 (Figura 4D). La histología del injerto de riñón a los seis días después del

trasplante fue compatible con el rechazo agudo mediado por anticuerpos (ABMR). La histología mostró necrosis cortical, con capilaritis peritubular y microangiopatía trombótica. Los infiltrados intersticiales se caracterizaron principalmente por leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, y la deposición de C4d en los capilares peritubulares fue fuertemente positiva en inmunohistoquímica (Figura 4E).

Impacto de la terapia TAC en el trasplante de riñón alogénico (DA-L)

Los receptores con dosis baja de TAC (0,1 mg / kg), tuvieron un tiempo medio de supervivencia de $7,25 \pm 0,69$, no diferente del modelo de trasplante sin inmunosupresión ($6,12 \pm 1,28$; $P = 0,074$) (Figura 4A y 4C). Los receptores con dosis medias y altas de TAC (0,25 y 0,5 mg / kg), mostraron un aumento significativo de la supervivencia de las ratas en comparación con los receptores sin inmunosupresión, $11,4 \pm 2,21$ ($P = 0,0004$) y $70,0 \pm 32,8$ ($P = 0,0163$), respectivamente (Figura 4A-4C). Los niveles de BUN y creatinina sérica, con una dosis baja de TAC (0,1 mg / kg), no fueron diferentes del modelo de trasplante sin inmunosupresión. Mientras que las dosis medias y altas de TAC (0,25 y 0,5 mg / kg) preservaron parcialmente la función renal y mostraron un aumento significativo en la supervivencia (Figura 4).

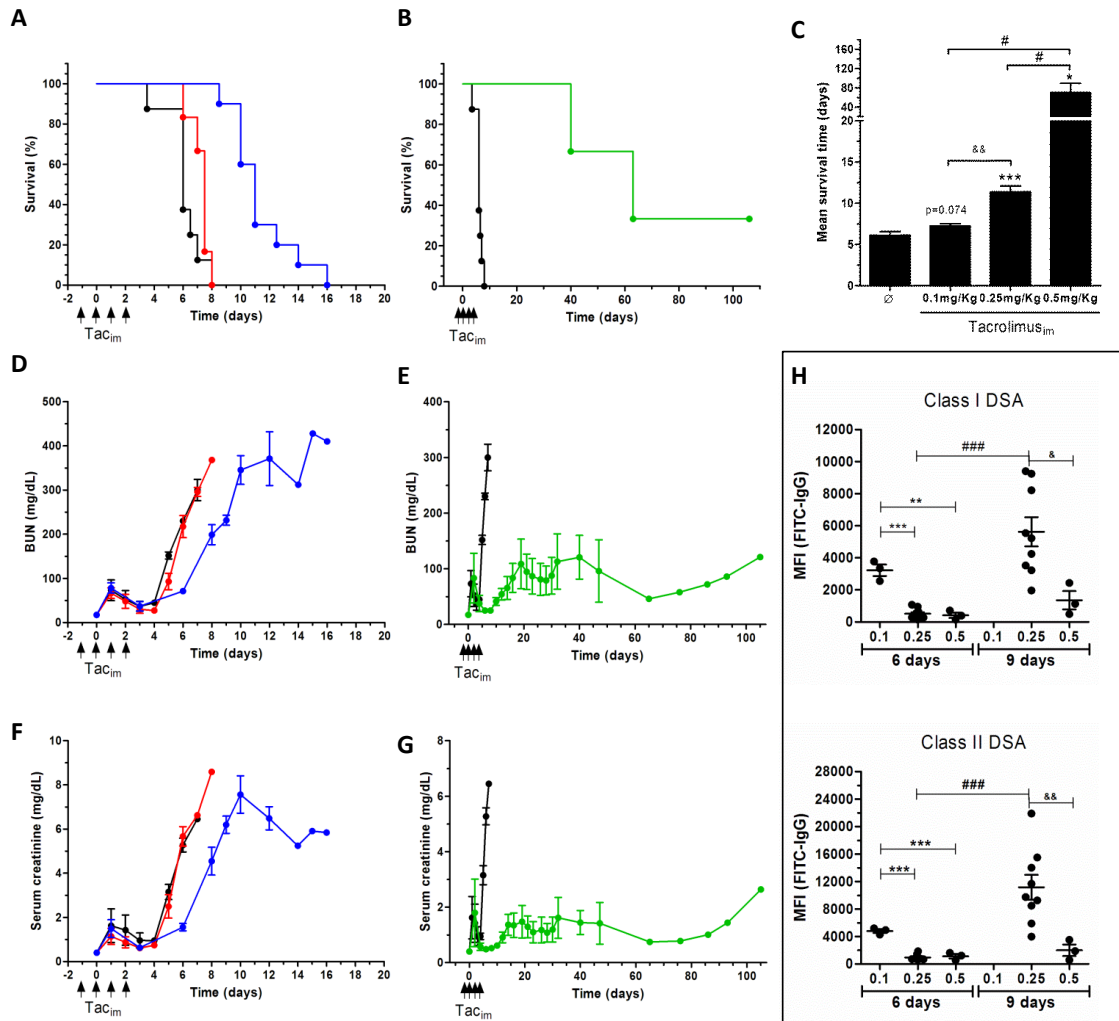


Figure 4: Puesta a punto de la inmunosupresión en el modelo de trasplante renal en rata DA-L. (A, B) Análisis de supervivencia en ratas, DA-L sin inmunosupresión (n = 8, negro), con TAC a 0,1 mg / kg (n = 4, rojo), con TAC a 0,25 mg / kg (n = 10, azul) y con TAC a 0,5 mg / kg (n = 3, verde). (C) Análisis del tiempo medio de supervivencia. * Significativamente diferente en comparación con el grupo sin tratamiento (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001). Significativamente diferente en comparación con la dosis de TAC de 0,25 mg / kg. # Significativamente diferente en comparación con la dosis de TAC de 0,5 mg / kg. (D-G) Análisis de la función renal que incluye nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina sérica. (H) Cuantificación de anticuerpos específicos del donante (DSA) de clase I y clase II a los 6 y 9 días después del trasplante. * Significativamente diferente en comparación con la dosis de TAC de 0,1 mg / kg (* P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001). Dosis de TAC de 0,1 mg / kg. Significativamente diferente en comparación con la dosis de TAC de 0,25 mg / kg. # Significativamente diferente cuando se compara cada grupo en un momento diferente. TACim, inyección intramuscular de TAC; MFI, índice de fluorescencia medio.

Se seleccionó la dosis de 0,25 mg / kg de TAC para el diseño experimental, y los grupos de dosis baja y alta se descartaron para el modelo experimental ya que dificultarían mostrar el efecto del tratamiento con ECP. El efecto de las dosis de TAC sobre los niveles de DSA de clase I y II se representa en la Figura 4H. El día +6 después del trasplante, la dosis de 0,1 mg / kg de TAC no modificó los niveles de DSA en comparación con el modelo sin inmunosupresión (Figura 4D y 4H). Los grupos con las dosis intermedia y alta de TAC (0,25 y 0,5 mg / kg), mostraron niveles de DSA significativamente más bajos en comparación con el modelo basal en el día +7 postrasplante. En el día +9, las MFI de DSA de clase I y clase II fueron significativamente más bajas en el grupo de TAC 0,5 mg / kg en comparación con TAC 0,25 mg / kg.

Caracterización de células Lew^{DA} alogénicas

Las células Lew^{DA} alogénicas de la sangre periférica y la suspensión de células del bazo se caracterizaron mediante citometría de flujo (Figura 5). Las células T y B, las células NK, los monocitos Las células Lew^{DA} de ambas suspensiones celulares se combinaron antes del procedimiento de fotoféresis, concretamente el $5,24 \pm 1,20\%$ de las células Lew^{DA} procedían de sangre periférica. Los linfocitos predominan en las células del bazo y las células polimorfonucleares en la sangre periférica. En las células del bazo, los linfocitos B y las células NK fueron más frecuentes que en la sangre periférica. La concentración de linfocitos CD4⁺ fue similar entre ambos orígenes, mientras que los linfocitos CD8⁺ predominan en el bazo. La proporción de células dendríticas y macrófagos no fue diferente entre la sangre periférica y el bazo.

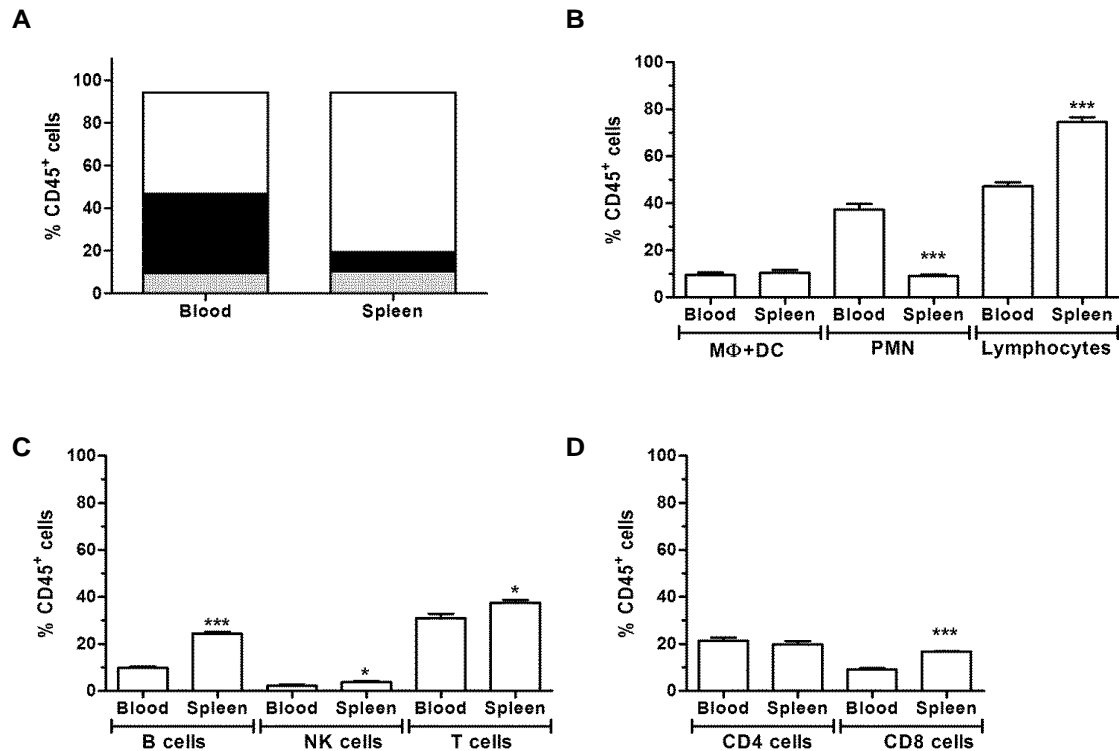


Figure 5: Caracterización de leucocitos esplénicos y sanguíneos. (A) Distribución de los diferentes tipos de células leucocitarias; granulocitos (PMN, negro), monocitos (gris) y linfocitos (blanco). (B) Cuantificación de los diferentes tipos de leucocitos. (C) Cuantificación de los diferentes linfocitos; Células B, células NK y células T. (D) Cuantificación de células T CD3⁺ en células CD4⁺ y CD8⁺. * Significativamente diferente en comparación con las muestras de sangre (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001).

Caracterización del producto celular obtenido por ECP

La viabilidad del producto de la célula ECP se evaluó inmediatamente después de la fotoféresis y después de tres días en cultivo con un PHA-L como estímulo mitógeno. El producto de células ECP parece estar vivo ($79,4 \pm 1,4\%$) cuando el análisis se realizó inmediatamente después del procedimiento de fotoféresis en comparación con las células Lew^{DA} alogénicas (Figura 5A: gráficos izquierdos y medio). Sin embargo, cuando el producto de células ECP se cultivó durante tres días con PHA-L, aproximadamente el $95,2 \pm 3,6\%$ de las

células tuvieron que considerarse apoptóticas; además, aproximadamente el $0,15 \pm 0,06\%$ de las células permanecieron vivas (gráfico de la Figura 5A-derecha). Para evaluar la capacidad proliferativa del producto celular ECP, se agregó un estímulo mitogénico en el medio de cultivo celular. El procedimiento de fotoféresis evitó por completo la proliferación observada en las células Lew^{DA} (Figura 5B).

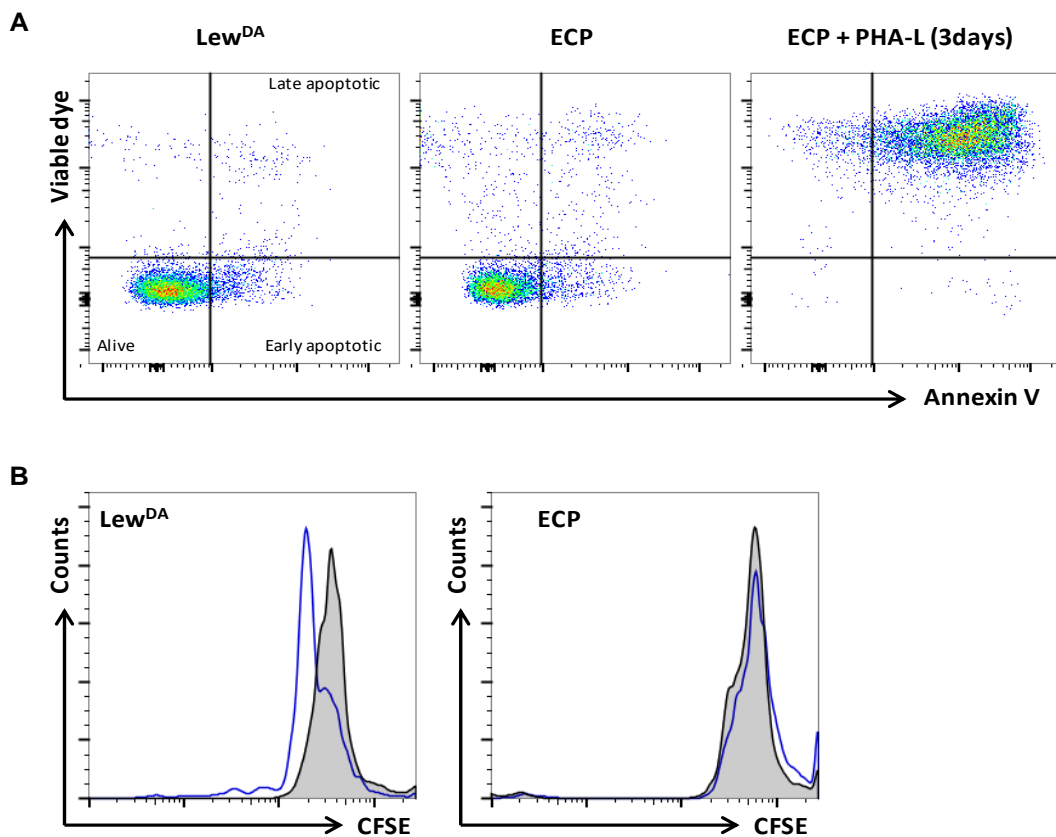


Figure 6: Caracterización del producto de fotoféresis extracorpórea. (A) Impacto de ECP en la viabilidad de Lew^{DA} . (B) Impacto de ECP sobre la capacidad proliferativa de esplenocitos Lew^{DA} y producto ECP. Gráfico de la izquierda, esplenocitos de Lew^{DA} estimulados con fitohemaglutinina-L (PHA-L) durante 3 días. Gráfico de la derecha, células ECP estimuladas con PHA-L. Células Lew^{DA} y ECP teñidas con CFSE con PHA-L (azul) y sin PHA-L (gris).

Impacto de la ECP en el trasplante de riñón alotípico (DA-L)

Todas las ratas del grupo de dosis baja de TAC + ECP (10×10^6) y del grupo de monoterapia con TAC mueren antes del día 16 después del trasplante, mientras que el 44% de las ratas del grupo de dosis alta de TAC + ECP (100×10^6) sobreviven hasta el día 29 después del trasplante. El análisis de supervivencia se muestra en la Figura 7A. El tiempo medio de supervivencia se prolongó en dosis altas de PAE hasta $26,28 \pm 21,9$ días ($P = 0,0470$); sin embargo, una dosis baja de ECP no modificó la MST en comparación con el tratamiento en monoterapia con TAC (Figura 5B). La dosis alta de ECP en combinación con TAC estabilizó el deterioro de la función renal en casi el 50% de las ratas (Figura 7C y 7D), mientras que una dosis baja de ECP no confirió ninguna mejora en la función renal en comparación con el grupo TAC. El impacto de las dosis de ECP sobre los DSA de clase I y II se muestra en la Figura 7 E y F. Las dosis de ECP tanto bajas como altas no redujeron el MFI de los DSA de clase I y II en el día 6 después del trasplante. El análisis en el día 9 reveló que altas dosis de ECP en combinación de TAC redujeron parcialmente la DSA de clase I, concretamente las ratas supervivientes tenían los niveles más bajos de DSA de clase I y clase II. En las ratas supervivientes el día 23 después del trasplante, del grupo de dosis alta de TAC + ECP, el MFI para los DSA de clase I y II fueron 2620 ± 989 y 4241 ± 1102 , respectivamente.

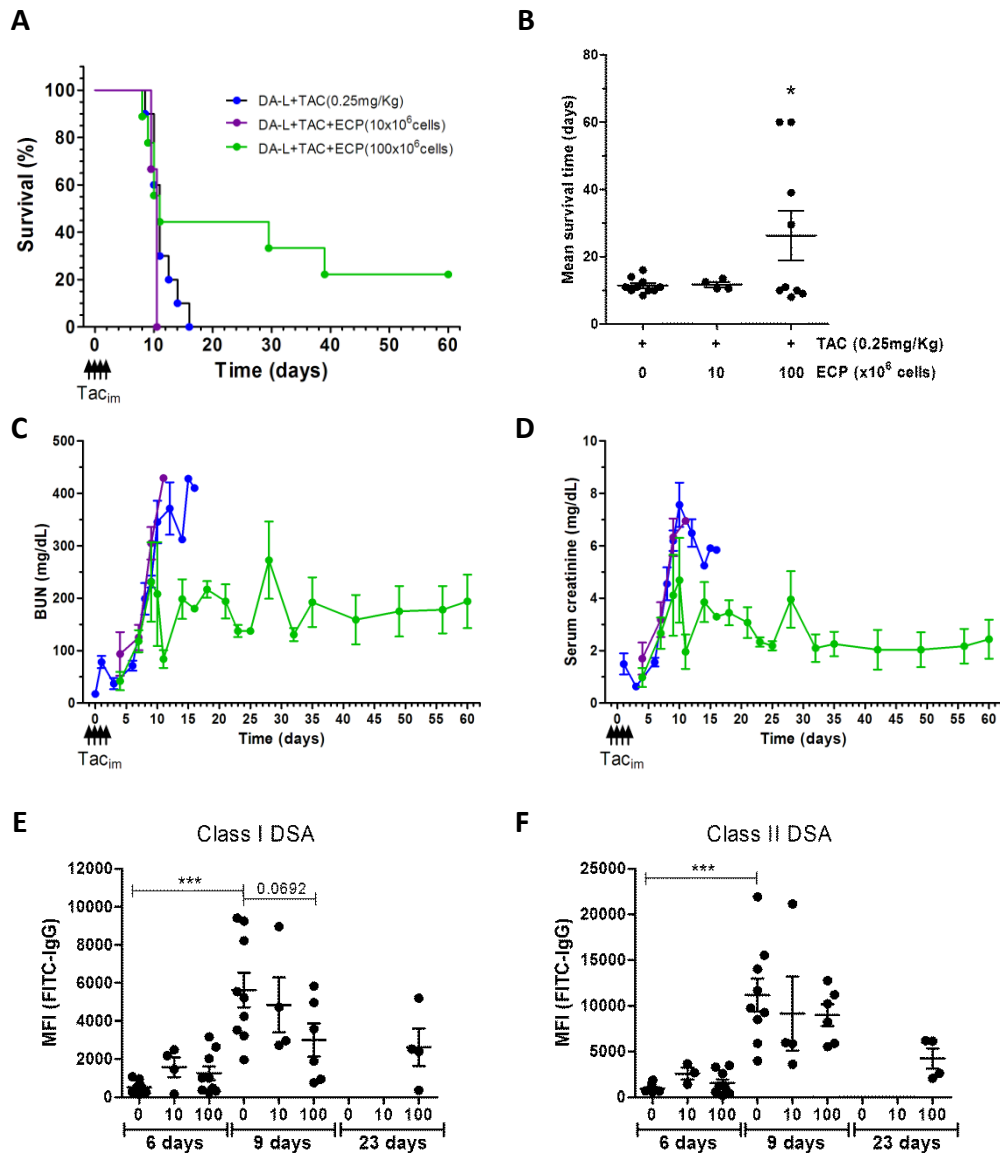


Figure 7: Impacto del producto de ECP en el modelo de trasplante renal de rata DA-L. (A) Análisis de supervivencia de ratas de los siguientes grupos de ratas: DA-L + TAC (0,25 mg / kg) (n = 10, azul), más dosis baja de ECP (10×10^6 células, n = 4, púrpura) y más alta dosis de ECP (100×10^6 células, n = 9, verde) trasplante de riñón. (B) Análisis del tiempo medio de supervivencia. * Diferencias estadísticas en comparación con el grupo TAC (0,25 mg / kg). (C, D) Análisis de la función renal que incluye nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina sérica. (E-F) Análisis de anticuerpos específicos del donante que incluyen MHC de rata de clase I (RT1A) y clase II (RT1B). * Significativamente diferente en comparación con la dosis de TAC de 0,25 mg / kg a los 6 días.

4. Comunicaciones surgidas de este objetivo:

- Impact of Extracorporeal Photopheresis in a Full-Mismatch Kidney Transplant Rat Model. Rovira J, Piñeiro GJ, Lazo-Rodríguez M, Ramirez-Bajo MJ, Banon-Maneus E, Hierro-García N, Ventura-Aguiar P, Cid J, Lozano M, Diekmann F. 2020 American Transplant Congress (Poster communication)

5. Conclusiones

En el modelo experimental, la ECP pudo prolongar la supervivencia del injerto renal, preservando su función. El impacto de la ECP sobre los DSA no ha quedado del todo claro. La eficacia de ECP en este modelo podría allanar el camino para futuros estudios clínicos en trasplante de riñón. La ECP requiere una evaluación adicional como terapia inmunomoduladora en el campo del trasplante de riñón.

DISCUSIÓN

El daño mediado por anticuerpos es la principal limitación para la supervivencia del injerto renal a largo plazo. Pero a pesar de su relevancia clínica, el tratamiento del rechazo mediado por anticuerpos (ABMR), tiene una base empírica y con poca evidencia respecto a su efectividad. Además, el mismo presenta una gran variabilidad en su forma de aplicación entre los diferentes centros y series reportadas.

Al inicio de la investigación para la presente tesis, en el Hospital Clínic de Barcelona, el tratamiento del rechazo renal mediado por anticuerpos, tanto en su forma aguda como crónica, se basaba en la combinación de RP, IVIg, corticoides y Rituximab. Esta es una combinación habitual en muchos centros y es considerada (exceptuando al Rituximab), como el tratamiento estándar en varios consensos.(100–102) Es por ello, que el objetivo inicial de la tesis fue investigar retrospectivamente la respuesta al tratamiento del ABMR activo en la cohorte de pacientes trasplantados en el Hospital Clínic de Barcelona.

Se identificó una cohorte de 116 receptores renales diagnosticados con un rechazo activo mediado por anticuerpos (aABMR), los cuales fueron tratados con una combinación de RP, IVIg, corticoides y rituximab entre 2004 y 2019.

El primer resultado, fue una eficacia relativamente más baja de lo esperada; sólo el 54,3% de los pacientes presentó una estabilización o mejoría en la función del injerto renal a los seis meses post tratamiento. La efectividad fue distinta según el tiempo transcurrido entre el trasplante y el diagnóstico de rechazo. El 67% de los pacientes con diagnóstico de aABMR antes de los seis meses de trasplante (tempranos), respondieron al tratamiento con una mejoría o estabilización de la función renal a los 6 meses. Mientras que sólo el 23,5%, de los rechazos diagnosticados después de los seis meses de trasplante (tardíos), respondieron a dicho tratamiento ($P < 0,001$). Respecto a esto, estudios previos han reportado en el mismo sentido, evidenciando una peor respuesta y sobrevida de los injertos en rechazos tardíos con respecto a los

tempranos.(220) Esto, hace suponer una fisiopatología inmunológica diferente entre el aABMR temprano y tardío. En los estudios mencionados, los episodios de rechazos tempranos se asociaron a una presensibilización contra el donante, hecho que también se comprueba en nuestra cohorte ($P = 0,007$, OR 5,1). Por otro lado, en dichos estudios se ha relacionado, aunque con resultados contradictorios, la clase de DSA (contra HLA clase I o II) con la temporalidad del rechazo.(139,220,) En la serie del Hospital Clínic, no encontramos asociación con la clase de DSA que presentaron los pacientes. A diferencia de los estudios precedentes, en la serie del Hospital Clínic solo se incluyeron pacientes con diagnóstico de aABMR y se excluyeron a todos los pacientes con criterios de rechazo crónico mediado por anticuerpos (cABMR).

Un aspecto controvertido que no ha sido evaluado sólidamente en estudios previos es la utilidad de realizar biopsias de seguimiento después del tratamiento del aABMR.(100,222,223)

Tras el tratamiento, 90 de los 116 pacientes (78%) fueron sometidos a una biopsia de seguimiento, con una mediana de tiempo de 2 [4] meses. Se observó persistencia de inflamación microvascular ($MVI \geq 1$) en el 71% de las re biopsias. Sin embargo, hasta el 53% de los pacientes con MVI persistente, habían presentado una respuesta favorable de la función renal tras el tratamiento. Lo que refuerza el valor de la biopsia de seguimiento post tratamiento del aABMR.

La persistencia de inflamación aguda (MVI, tubulitis, microangiopatía trombótica activa, necrosis tubular aguda) en las biopsias de seguimiento se asoció a una mayor tasa de fracaso del injerto renal. El impacto negativo de MVI en biopsias de seguimiento tempranas post trasplante ha sido descrito en estudios previos como un potencial predictor del desarrollo de ABMR, progresión de fibrosis y desarrollo de DSA. Sin embargo, solo uno de estos estudios ha evaluado la influencia específica de la capilaritis peritubular en las biopsias de control post tratamiento, donde se asoció con un mayor riesgo de pérdida del injerto. (194,222,223)

Otro elemento asociado a peor pronóstico en la biopsia de seguimiento, fue la presencia de tubulitis, incluso sin cumplir criterios para el diagnóstico de TCMR. Se ha descrito previamente que la coexistencia de un TCMR con un ABMR empeora significativamente el pronóstico del ABMR.(224,225) Sin embargo, solo un estudio ha evaluado la presencia de tubulitis en biopsias de control tras el tratamiento de ABMR, pero no ha evidenciado un mayor riesgo de pérdida del injerto a los seis años.(194)

Los hallazgos del presente estudio sugieren que la inflamación persistente tras el tratamiento del ABMR activo tiene un valor pronóstico, a pesar de no cumplir estrictamente con ninguna de las categorías de Banff y presentar mejoría de la función renal. Este hallazgo concuerda con la patogenia del daño humoral crónico. En él, se produce un daño de bajo grado mantenido en el tiempo, que se manifiesta con una multilaminación de la membrana basal glomerular conocida como glomerulopatía del trasplante (GT), la cual se encuentra asociada a mal pronóstico.(226) De hecho, en la serie del Hospital Clínic, la presencia de glomerulitis persistente en la biopsia de seguimiento estuvo asociada en forma consistente con la presencia de GT (N = 14) en dicha biopsia (P < 0,001, OR 1,45, IC95% 1,19 - 1,77). Esta inflamación glomerular persistente parece ser la evidencia de un daño endotelial mantenido en el tiempo que llevaría a la GT.

Tras la biopsia de seguimiento, el 37,5% de los pacientes con persistencia de MVI recibieron un segundo tratamiento. Estos pacientes presentaron una menor tasa de pérdida del injerto respecto a aquellos con MVI persistente que no se sometieron a un retratamiento. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con cautela porque el tamaño de la muestra es pequeño y las biopsias de control y la decisión de tratar, fueron basadas en el juicio clínico del médico tratante, por lo que el riesgo de sesgo de selección es elevado.

Los pacientes de la serie del Hospital Clínic, presentaron una incidencia elevada de infecciones que requirieron ingreso hospitalario al menos por 48 horas (0,87 infecciones/ paciente tratado/ año). Las infecciones se encontraron asociadas con la presencia de comorbilidades en el paciente al momento del

tratamiento, siendo un índice de comorbilidades de Charlson ≥ 4 un factor de riesgo ($p = 0,01$, OR 4,2). Sin embargo, no pudimos demostrar asociación con la “carga inmunosupresora” (uso previo de Rituximab, retratamientos de ABMR, tipo de inducción, tiempo de inmunosupresión, o tipo de inmunosupresores). Esta falta de asociación probablemente se pueda explicar por una relación más débil entre la “carga de inmunosupresión” y el riesgo de infecciones, lo que requeriría una N de pacientes mayor para evidenciarla.

Otro hecho a destacar, es que en la serie del Hospital Clínic, la mayoría de los pacientes recibieron tratamiento con rituximab y este se ha asociado con un mayor riesgo de infecciones en el postrasplante renal, aunque sin haber datos de estudios aleatorizados.(227–229)

Los resultados de este estudio plantean preguntas importantes por resolver, como son la estandarización del tiempo entre el tratamiento y la biopsia renal de seguimiento, la necesidad de retratar o no a estos pacientes y en qué circunstancias. La primera pregunta es crucial para poder diferenciar lesiones persistentes activas, de aquellas en fase de recuperación que mejorarán con el tratamiento previo ya recibido. A este respecto, este estudio no puede responder con evidencia. Más allá de ello, los datos parecen apoyar la realización de una biopsia precoz entre 1 a 3 meses tras el tratamiento ya que brinda información relevante en el pronóstico del injerto.

Con respecto a la necesidad de retratamiento, la única evidencia sólida podría venir de un estudio aleatorizado y por lo tanto libre de sesgos. A pesar de las limitaciones de este estudio, creemos que aporta información valiosa que refuerza la importancia de las biopsias de seguimiento tras el tratamiento del ABMR y la persistencia de inflamación aguda como marcador de mal pronóstico del injerto.

El segundo objetivo del estudio fue caracterizar la eficacia y factores pronósticos del tratamiento con Rituximab, IVIG y RP en el rechazo renal crónico activo mediado por anticuerpos (caABMR). Para ello realizamos un estudio retrospectivo en una cohorte de pacientes trasplantados en el Hospital Clínic de Barcelona con diagnóstico de caABMR, entre 2006 y 2015. Como ya

se ha comentado esta pauta de tratamiento era la usual en estos pacientes. Sin embargo, dada la baja evidencia respecto a la efectividad, no se indicó tratamiento en todos los pacientes.

El estudio incluyó una cohorte de 23 pacientes con diagnóstico de caABMR, tratados con la combinación de Rituximab, IVIg y RP y 39 pacientes que no recibieron tratamiento específico. En este estudio la triple terapia, no se asoció a una mejor evolución de la función del injerto renal. No hubo diferencias significativas en la supervivencia del injerto, ni en el número de pérdidas de injerto a los 12 y 24 meses.

Al tratarse de un estudio retrospectivo la posibilidad de sesgo es importante, por lo que intentamos demostrar diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, los grupos fueron homogéneos en cuanto a la severidad de lesiones histológicas, el grado de deterioro de la función renal y el tipo de trasplante. No obstante, la decisión de tratar se basó en el juicio clínico individual de cada médico y puede haber sido influenciado por una percepción de un mejor estado funcional y menor riesgo de infecciones de los pacientes. En este sentido, los receptores y donantes del grupo tratamiento fueron más jóvenes. Sin embargo, incluso con este posible sesgo de selección positivo, las infecciones graves fueron más frecuentes en los pacientes tratados que en el grupo de control de mayor edad. De hecho, el ICC fue similar en ambos grupos, pero solo se asoció con más infecciones en los pacientes de grupo control, resaltando “el peso” del tratamiento inmunosupresor recibido.

La evidencia para el tratamiento con rituximab en el caABMR proviene de pequeñas series retrospectivas con resultados favorables.(124,125,127,230) En dichas cohortes hay una heterogeneidad considerable entre pacientes con y sin criterios de caABMR y se evidencia mal pronóstico y escasa respuesta asociada a la presencia de GT. Por otro lado, la eficacia en estos estudios, se estableció en base a la estabilización de la función del injerto renal. Pero, es difícil distinguir la historia natural de la enfermedad en ausencia de un grupo de control no tratado. De hecho, en el grupo control del Hospital Clínic algunos

pacientes estabilizaron su función renal, a pesar de no recibir tratamiento específico. Y al igual que en otras series reportadas, la evolución es heterogénea en ambos grupos, lo que resalta la importancia de contar con un grupo control.

Dos estudios, más recientes, reportan que el tratamiento con Rituximab no mejora la supervivencia del injerto en comparación con un grupo no tratado. Además, muestran una mayor incidencia de efectos adversos en los grupos de tratamiento.(128)(129) Pero, en ambos estudios, no se evaluó la combinación de Rituximab, RP e IVIg.

Recientemente, la evidencia más contundente ha sido aportada por un ensayo aleatorizado multicéntrico español para analizar la eficacia de Rituximab e IVIg frente a placebo en 24 pacientes con GT y presencia de DSA (12 placebo frente a 12 tratamientos).(231) De acuerdo con nuestro estudio, no hubo diferencias en la disminución de la FGe a los 12 meses. Lamentablemente, el estudio se detuvo, debido a la baja tasa de inclusión, lo que resalta la dificultad para realizar estudios prospectivos en esta área.

Como se ha comentado en la introducción, dado que los anticuerpos son producidos por células plasmáticas, las cuales no son afectadas directamente por el Rituximab, otra estrategia posible sería el uso de bortezomib, un inhibidor del proteosoma que si actúa sobre dichas células. Un ensayo aleatorizado, comparó el tratamiento con bortezomib frente a placebo en 28 pacientes con diagnóstico de ABMR tardío. El bortezomib no logró inducir una reversión en la caída del FGe, los niveles de DSA o las características morfológicas y moleculares de actividad en el seguimiento. En este estudio, el tratamiento se asoció con una toxicidad sustancial.(142)

En busca de opciones terapéuticas más eficaces, dos pequeños estudios prospectivos evaluaron el bloqueo del sistema del complemento a diferentes niveles en el tratamiento y prevención de caABMR y GT, sin cambios en los resultados a largo plazo.(153)(148)

Por último, el bloqueo de la señalización por interleuquina 6 (IL-6) ha arrojado datos prometedores. Por un lado, Tocilizumab, un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6, demostró estabilización de la función renal en una pequeña serie de pacientes con caABMR y GT.(156) Y por otro lado, más recientemente, Clazakizumab, un anticuerpo monoclonal contra la IL-6, ha demostrado mejorar el declive en el FGe e incluso lograr mejoría histológica y molecular en las biopsias de seguimiento en un estudio aleatorizado de fase 2. Sin embargo el 25% de los pacientes presentaron eventos adversos graves.(157) Esta línea de tratamiento parece interesante aunque no exenta de riesgos, actualmente se encuentra en desarrollo un estudio aleatorizado de fase 3 (NCT03744910), que planea incluir 350 pacientes con diagnóstico de cABMR.

Respecto a marcadores de mal pronóstico, al contrario de los resultados presentados en otros estudios(127), en la serie del Hospital Clínic la severidad de la GT no se asoció con peor supervivencia o pérdida del injerto a los 24 meses. Diez pacientes tuvieron una biopsia de seguimiento después del tratamiento y ninguno presentó mejoría de GT. Probablemente la GT indica una manifestación no reversible de procesos de daño crónico mediados por anticuerpos. En la cohorte del Hospital Clínic la presencia o ausencia de DSA no se asoció a peor pronóstico, hecho que también ha sido reportado por otros autores en el contexto de caABMR.(232)

En la cohorte del Hospital Clínic, un bajo FGe al momento del diagnóstico y una velocidad elevada de deterioro del FGe en los 6 meses previos al diagnóstico de caABMR, se asociaron a pérdida del injerto a los 24 meses, independientemente del tratamiento recibido. Un $\Delta\text{FGe} \geq 13 \text{ ml / min}$ fue útil para identificar a los pacientes con peor supervivencia del injerto a los 24 meses.

Considerando todos los datos reportados y que la falta de adherencia a la terapia inmunosupresora es una causa importante para el desarrollo de caABMR, parece más eficiente y menos peligroso para el paciente centrarse en

promover la adherencia a la terapia inmunosupresora en lugar de tratar el caABMR de manera agresiva.

En el Hospital Clínic se realizan trasplantes hepatorenales simultáneos (THRS) que podrían considerarse de alto riesgo inmunológico desde la óptica del trasplante renal aislado. Esta es una situación inmunológica especial donde el daño por anticuerpos tiene un impacto diferente al trasplante renal aislado. Si bien ya es conocida la mayor tolerancia al daño mediado por anticuerpos del injerto hepático, el grado de extensión de dicha ventaja inmunológica al injerto renal no es tan claro. Además, se ha reportado una mortalidad mayor en los pacientes con THRS sensibilizados contra el donante.(99,233–235)

Consideramos relevante estudiar el impacto del daño mediado por anticuerpos en la sobrevida del injerto renal y del paciente con THRS, dado que variantes basadas en su fisiopatología inmune podrían constituir, en un futuro, una alternativa terapéutica en el manejo del ABMR.

Se ha realizado un estudio longitudinal retrospectivo de los pacientes con THRS llevados a cabo en el Hospital Clínic de Barcelona entre 1993 y 2017. De los 68 receptores incluidos, 20 se consideraron de alto riesgo inmunológico.

Un estudio previo basado en un registro en receptores de THRS reportó una mayor mortalidad en los receptores sensibilizados (CM o PRA positivos > 10%). La sensibilización se relacionó con un aumento del 20% en la mortalidad y del 16% en la pérdida del injerto en comparación con los pacientes no sensibilizados (HR = 1,22). Sin embargo, en este estudio, el tiempo en diálisis, la diabetes y el trasplante previo fueron significativamente más frecuentes en los pacientes sensibilizados.(99)

Más recientemente, se analizó el impacto de la terapia de inducción en los receptores de THRS mediante la base de datos United Network for Organ Sharing (UNOS). La terapia de inducción no se asoció con una reducción del rechazo del injerto ni con un beneficio en la supervivencia del paciente. Sin

embargo, curiosamente, el uso de ATG y los antecedentes de trasplante hepático previo se asociaron de forma independiente con una mayor mortalidad en el análisis multivariado. Desafortunadamente, el riesgo inmunológico y la historia de TR previo, más prevalentes en el grupo ATG, no se evaluaron en el modelo multivariado.(233)

En la cohorte del Hospital Clínic, el único factor asociado con una peor supervivencia global del receptor en el análisis multivariado fue el antecedente de un TR previo (HR, 4,26; IC del 95%, 1,36±13,4). Dada la posibilidad de sesgo en el modelo multivariante por una posible interrelación de variables, se utilizó como enfoque complementario para el análisis de modelos de regresión de Cox la ponderación de la probabilidad inversa de tratamiento (IPTW), estabilizado por la prevalencia de alto riesgo inmune. Demostrando la supervivencia del paciente no estar asociada con el alto riesgo inmune (P = 0,62). Los factores incluidos en el cálculo de *Propensity score* fueron el TR previo, la positividad de VHC y el tiempo en diálisis, dado que estos factores y el alto riesgo inmune se mostraron asociados con una menor supervivencia del paciente en los análisis univariados. Este tipo de análisis representa un sustituto válido para corregir el sesgo de asignación en estudios retrospectivos.(236)

El análisis IPTW no apoyó la asociación del riesgo inmunológico con la supervivencia del paciente, esto sugiere que las comorbilidades asociadas con la alosensibilización son factores de riesgo independientes para la supervivencia del injerto renal y del paciente, mientras que el riesgo inmunológico, per se, no lo es.

Una explicación posible es que trasplante previo se relaciona con una mayor “carga acumulada de inmunosupresión” y esto este en relación con las causas de muerte dominantes en los receptores de trasplante, que son los eventos cardiovasculares, la infección y la neoplasia, todas ellas exacerbadas por la inmunosupresión.(237) En apoyo de esta teoría, los niveles más elevados de

inmunosupresión en el THRS, en comparación con trasplante hepático, se han relacionado con un pronóstico peor en pacientes con VHC positivo.(238)

O'Leary analizó el impacto de la presencia de DSA en 30 pacientes sometidos a un THRS. En el análisis multivariado, la presencia de DSA de clase II fue un predictor independiente de muerte del paciente (HR, 2,2; P = 0,04). (204) Sin embargo, más recientemente, Leca *et al.* informaron que en 56 THRS el riesgo inmunológico no tuvo un impacto negativo en la supervivencia del paciente o del aloinjerto renal.(239) Es destacable, que en este último estudio la infección por VHC, el tiempo en diálisis y los TR previos se encontraron equilibrados en ambos grupos.

En nuestra cohorte, el rechazo del injerto renal fue significativamente mayor en los pacientes con alto riesgo inmunológico (30,0% versus 5,88%; OR, 6,86). De 10 rechazos renales, 9 ocurrieron poco después del THRS.

Todos los pacientes con ABMR tuvieron mejoría de la función renal y la biopsia renal repetida mostró la ausencia de actividad de rechazo mediado por anticuerpos, incluso aunque 2 pacientes no fueron tratados específicamente para el ABMR.

Con respecto a la lesión inmunitaria crónica de los injertos renales en el contexto del THRS, un estudio reciente comparó un grupo de 68 THRS con receptores de TR aislado y concluyó que, independientemente de la presencia de DSA, la prevalencia de GT fue de 0 en el THRS, lo que sugiere ausencia de daño crónico mediado por anticuerpos.(240) Sin embargo, la ausencia de rechazo crónico no disminuye la importancia de los episodios de rechazo agudo. En este sentido, Nilles *et al.* Informaron una prevalencia de rechazos cercana al 20% con una disminución de la FGe en los pacientes con rechazos renales (P <0,01).(240)

En la serie del Hospital Clínic, aunque hubo una mayor incidencia de rechazos en los pacientes de alto riesgo inmunológico, la función renal no fue diferente entre los pacientes según el riesgo inmune o entre los pacientes con y sin

rechazos. Evaluamos la correlación intrasujeto en la función renal con un modelo de ecuación de estimación generalizada (GEE), para valorar un posible deterioro de la función renal, demostrando que las medias de FGe no fueron diferentes, mostrando la estabilidad en el FGe.

Como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis, el hígado es un órgano capaz de modificar el sistema inmunológico del receptor.^{57-62,63} La capacidad inmunomoduladora del hígado puede extenderse más allá del microambiente local y es aloespecífica.(97)

El uso del THRS como estrategia para evitar la pérdida del injerto renal en pacientes sensibilizados contra el donante, ha sido explorado en 7 pacientes hiperinmunizados con resultados prometedores. Sin embargo, incluso en esta pequeña cohorte, 2 pacientes perdieron su injerto, uno por un ABMR temprano y otro en el contexto de complicaciones quirúrgicas graves relacionadas con el injerto de hígado. Este estudio destaca que la protección del hígado sobre el riñón no es completa y el riesgo quirúrgico del trasplante hepático debe equilibrarse con los beneficios inmunológicos para el riñón trasplantado. Los autores propusieron que los niveles de anticuerpos anti-donante deben ser lo suficientemente bajos para evitar un rechazo hiperagudo.(49) Este es un límite difícil de definir. En nuestra cohorte incluso los pacientes con MFI altos tuvieron un buen resultado renal después del trasplante.

Dar y col. consideraron que los DSA de clase I se eliminan preferentemente en THRS y argumentan que los aloinjertos de hígado pueden no proteger completamente al injerto renal si están presentes DSA de clase II.(49) Sin embargo, en nuestra cohorte, los DSA de clase II antes del trasplante se volvieron negativos o tuvieron una disminución significativa después del trasplante.

El período de inclusión extendido y la definición amplia de alto riesgo inmunológico (presencia de DSA y / o CM positivo) podrían considerarse limitaciones de este estudio. Otras limitaciones son que los seguimientos no se

realizaron en intervalos de tiempo específicos y se basaron en el juicio clínico. Sin embargo, ningún paciente presentó pérdida del injerto o daño inmunológico crónico. Por otro lado, un resultado positivo de nuestra experiencia se basa en la evaluación del riesgo inmunológico en correlación con las comorbilidades.

En la serie del Hospital Clínic, los pacientes con alto riesgo inmunológico tuvieron una mayor prevalencia de rechazo agudo. Sin embargo, esta prevalencia no afectó a la supervivencia y función del injerto renal a largo plazo. No obstante, un seguimiento más prolongado o una muestra más amplia podrían mostrar una peor evolución de los injertos.

La tolerancia del injerto renal en el THRS no es completa, pero es mayor que en el TR aislado. El impacto de la alosensibilización en la supervivencia del paciente y del injerto, debe sopesarse cuidadosamente frente a las comorbilidades porque una mayor sensibilización puede asociarse con mayores comorbilidades.

La mayor incidencia de rechazos tempranos en pacientes con alto riesgo inmunológico, justificaría una mayor vigilancia de estos pacientes al menos en las primeras etapas del trasplante. Por otro lado, persisten las dudas sobre la necesidad de una inmunosupresión de mantenimiento más potente en casos de alto riesgo inmunológico, considerando que estos pacientes suelen tener una mayor prevalencia de comorbilidades y un mayor riesgo de efectos adversos a largo plazo asociados a los fármacos inmunosupresores.

Tras comprobar en las secciones precedentes, que la eficacia del tratamiento habitual fue parcial y más baja de lo esperada en el ABMR activo y nula en la forma crónica de daño humoral, y que estos tratamientos se vieron asociados a una incidencia elevada de complicaciones infecciosas, decidimos explorar la terapia de fotoaféresis extracorpórea (ECP). La ECP ha demostrado eficacia clara en la enfermedad injerto contra huésped (EICH) y eficacia variable en el contexto del rechazo pulmonar y cardíaco. (166,167,176,177,168–175) La ECP es

una terapia celular atractiva para tratar el rechazo del injerto renal, dado la ausencia de inmunosupresión generalizada o efectos secundarios graves. Su eficacia sobre la alorreactividad de las células T ha sido probada desde hace mucho tiempo, y en el trasplante de riñón, existen reportes favorables en el rechazo refractario mediado por células T.(241) Por lo tanto, una cuestión pendiente es valorar la eficacia de la ECP en el rechazo mediado por anticuerpos donde los linfocitos B y células plasmáticas tienen un rol predominante.

En esta tesis se ha explorado el uso de la ECP en un modelo animal de ABMR. Para ello pusimos a punto y caracterizamos el modelo de trasplante renal Dark Agouti-Lewis (DA-L). El modelo se caracteriza por desarrollar un ABMR de inicio temprano, con un rápido deterioro de la función renal desde el día +4 tras el trasplante y una supervivencia media de 6 días. Los anticuerpos donante específico *de novo*, de clase I y II, se detectaron desde el tercer día post-trasplante con un aumento progresivo, y la histología del injerto renal fue compatible con un ABMR.

Dada la rapidez en el deterioro de la función renal, se introdujo un ciclo corto de 4 dosis de tacrolimus para permitir mantener la función inicial del injerto, aumentando la supervivencia hasta los 11 días. La intención de de dicha acción fue lograr una ventana temporal que permitiera evidenciar el efecto de la fotoaféresis.

La adición de ECP (100×10^6 células) prolongó el tiempo medio de supervivencia hasta 26,28 días ($P = 0,047$) y estabilizó el deterioro de la función renal en casi el 50% de las ratas. Aunque este tratamiento no modificó la expresión de DSA en el período inicial, en el día +23 se evidenció una disminución del MFI medio de los DSA en comparación con las determinaciones previas (día +9).

Con respecto al comportamiento de los DSA en el trasplante de órgano sólido bajo tratamiento con ECP, en el trasplante pulmonar se ha reportado una

disminución significativa en los DSA y auto anticuerpos pulmonares en receptores con rechazo crónico en forma de bronquiolitis obliterante.(213) Esta disminución de anticuerpos se produjo junto con una reducción de las citoquinas proinflamatorias y un aumento de las antiinflamatorias. No se puede descartar un efecto directo de la ECP sobre la producción de DSA, aunque parecen estar involucrados efectos indirectos relacionados con factores inflamatorios. Dado que en el modelo animal, la ECP solo se administro hasta el día +14, cabe la posibilidad que el tiempo y número de dosis sean insuficientes para conseguir el control de los DSA evidenciado en el trasplante de pulmón.

Respecto a la acción de la ECP sobre las células B, una disminución en los niveles del factor de activación de células B (BAFF) y cambios en las poblaciones de células B se han reportado como predictores de buena respuesta al tratamiento con ECP en la EICH(242,243). Además, un modelo de aloinjerto de piel en ratón mostró que la infusión de esplenocitos expuestos a 8-MOP + UVA aumenta el número de células B reguladoras IL-10⁺ en circulación, promoviendo la supervivencia del injerto.(244)

La dosis de ECP parece ser relevante para lograr la estabilización de la función renal. Una dosis baja de ECP no confirió ninguna mejora en la función renal ni en la supervivencia de los animales en comparación con el tratamiento en monoterapia con tacrolimus. Los datos presentados sugieren una dosis-respuesta o al menos la posibilidad de un umbral de dosis; de hecho, la falta de respuesta de algunas animales podría deberse a una dosis insuficiente.

Otro tema discutible es el uso de dos dosis previas al trasplante. Sin embargo, en otras terapias celulares el momento de administración es de vital importancia para lograr una mayor potencia. Por ejemplo, la administración de células mesenquimales (MSC) produce una mayor respuesta si la misma se produce antes del desarrollo de un estado inflamatorio.(245).

Este estudio tiene algunas limitaciones; la inmunosupresión fue limitada en el tiempo para resaltar el efecto de la ECP en un pequeño grupo de animales. Como es habitual en los modelos fotoaféresis en rata, el porcentaje de células

sanguíneas periféricas es reducido (5,24%), siendo la mayoría de las células infundidas esplenocitos. Esta diferencia en el producto celular puede conducir a diferente potencia en la respuesta inmune que deben tenerse en cuenta con respecto al uso de la ECP en humanos, donde el producto consiste fundamentalmente en leucocitos de sangre periférica.

La eficacia de ECP descrita en este modelo podría allanar el camino para futuros estudios clínicos en trasplante de riñón, si bien es cierto que se requieren algunos datos más sobre el mecanismo de acción de la ECP en el contexto del rechazo mediado por anticuerpos. Dado el adecuado perfil de seguridad, de demostrar efectividad, la ECP podría constituir una herramienta valiosa para prolongar la sobrevida del injerto renal.

Como conclusión final de la discusión, podemos afirmar, en acuerdo con otros investigadores, que el rechazo del injerto renal más que un evento parece ser un proceso que se mantiene durante toda la “relación inmunológica” entre el injerto y el receptor. Esta relación, es inmunomodulada por la terapia inmunosupresora, la que también impactan negativamente en la sobrevida del paciente. La mejora en este proceso de forma segura, es el reto a superar para prolongar tanto la sobrevida del injerto como del paciente. Para lograrlo, consideramos que se deben explorar alternativas innovadoras y de mayor seguridad respecto a la inmunosupresión.

CONCLUSIONES GENERALES

- El tratamiento del rechazo activo mediado por anticuerpo del injerto renal, mediante el uso de una combinación de recambios plasmáticos, inmunoglobulina endovenosa y rituximab, mostro una eficacia del 54,3% en la mejoría o estabilización de la función renal a los 6 meses del diagnóstico.
- La efectividad del tratamiento del rechazo, fue distinta según el tiempo transcurrido entre el trasplante y el diagnóstico de rechazo activo mediado por anticuerpos. En los pacientes diagnosticados durante los primeros seis meses después del trasplante (rechazos tempranos/precocos), el 67% respondieron con una mejoría o estabilización de la función renal a los 6 meses tras el tratamiento. Mientras que sólo el 23,5% de los rechazos diagnosticados después de los seis meses tras el trasplante (rechazos tardíos) respondieron a dicho tratamiento ($P < 0,001$).
- Los episodios de rechazos tempranos se asociaron a sensibilización contra el donante previa al trasplante ($P = 0,007$, OR 5,1).
- A pesar de que el 53% de los pacientes con rechazo activo mediado por anticuerpos presentaban mejoría de la función renal tras el tratamiento, el 71% de la re biopsias mostraron inflamación microvascular (MVI ≥ 1) persistente.
- La persistencia de inflamación aguda (MVI, tubulitis, microangiopatía trombótica activa, necrosis tubular aguda), en las biopsias de seguimiento se asoció a fracaso del injerto renal.
- La presencia de tubulitis, incluso sin cumplir criterios para el diagnóstico de rechazo celular agudo o crónico, se asocio a menor sobrevida del injerto renal.
- La incidencia de infecciones que requirieron ingreso hospitalario al menos por 48 horas tras el tratamiento fue elevada, alcanzando las 0,87

infecciones/paciente tratado/año. Se ha encontrado una asociación entre las infecciones y la presencia de comorbilidades en el paciente al momento del tratamiento, siendo un índice de comorbilidades de Charlson ≥ 4 un factor de riesgo ($p = 0,01$, OR 4,2).

- En el rechazo crónico activo mediado por anticuerpos, el tratamiento con RP, IVIg y rituximab, no se asoció a una mejor evolución de la función del injerto renal. No hubo diferencias significativas en la supervivencia del injerto, ni en el número de pérdidas de injerto a los 12 y 24 meses.
- Un bajo FGe al momento del diagnóstico y una velocidad elevada de deterioro del FGe en los 6 meses previos al diagnóstico de rechazo crónico mediado por anticuerpos, (Δ FGe), se asociaron a pérdida del injerto a los 24 meses, independientemente del tratamiento recibido.
- El umbral de Δ FGe ≥ 13 ml/min permitió identificar a los pacientes con peor supervivencia del injerto a los 24 meses.
- Las infecciones graves fueron más frecuentes en los pacientes tratados que en el grupo de control.
- En el THRS, el único factor asociado con una peor supervivencia global del receptor en el análisis multivariado, fue el antecedente de un trasplante renal previo y no la sensibilización previa contra el donante.
- El rechazo del injerto renal en el THRS fue significativamente mayor en los pacientes con alto riesgo inmunológico (30,0% versus 5,88%; OR, 6,86).
- Aunque hubo una mayor incidencia de rechazos en los pacientes de alto riesgo inmunológico, la evolución de la función renal no fue diferente entre pacientes con y sin episodios de rechazo, ni tampoco entre los pacientes según el riesgo inmune.

- El trasplante de riñón DA-L es un modelo experimental en rata que permite estudiar el rechazo agudo mediado por anticuerpos.
- La adición de tratamiento con ECP prolongó el tiempo medio de supervivencia y estabilizó el deterioro de la función renal en el 44% los individuos de un modelo animal de ABMR en rata.

Líneas de investigación de futuro

- Tratamiento del rechazo crónico mediado por anticuerpos.

Recientemente, el doctorando y los directores de la presente tesis, en conjunto con la Unidad de Aféresis, han realizado una propuesta de estudio piloto para valorar la utilidad de los recambios plasmáticos sostenidos en el tiempo como tratamiento del rechazo crónico mediado por anticuerpos. La misma se encuentra bajo valoración como una Investigator Initiated Research por parte de Grifols.

- Inmunología del trasplante hepatorenal simultáneo

El doctorando, dentro del Laboratori Experimental de Nefrologia i Trasplantament (LENIT) y en conjunto con la Unidad de Trasplante Hepático, están realizando un estudio de alorrespuesta en receptores de trasplante hepatorenal simultáneo vs trasplante de riñón aislado (en fase de colección de muestras).

- Fotoaféresis en el trasplante renal

El doctorando, con los directores de la presente tesis, han propuesto un estudio piloto aleatorizado para valorar el uso de la fotoaféresis en la prevención del rechazo en el paciente trasplantado hiperinmunizado. El estudio se ha planteado dentro de un Investigator Initiated Research, recientemente su financiación ha sido aprobada y se encuentra pendiente de inicio. NCT04414735, "Impact of Photopheresis in the Prevention of Acute Rejection in Highly Sensitized de Novo Kidney Transplant Recipients".

BIBLIOGRAFÍA

1. Foundation. NK. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002;39:S1–266.
2. KDIGO. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*. 2013;Suppl 2013:3:S6-308.
3. Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, Fernández-Fresnedo G, Galcerán JM, Goicoechea M, et al. Documento de la sociedad española de nefrología sobre las guías KDIGO para la evaluación y el tratamiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrología*. 2014;34(3):302–16.
4. Nitsch D, Grams M, Sang Y, Black C, Cirillo M, Djurdjev O, et al. Associations of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with mortality and renal failure by sex: A meta-analysis. *BMJ*. 2013;346(7895):1–14.
5. Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS, Edwards EB, Malinchoc M, Kremers WK et al. MELD and PELD: application of survival models to liver allocation. *Liver Trans*. 2001;7:567–80.
6. Nashef SAM, Roques F, Michel P, Gauducheau E, Lemeshow S SR and the E study group. European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE). *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;16:9–13.
7. Charlson ME, Pompei P, Ales KL MC. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chron Dis*. 1987;40:373–83.
8. Saran R, Robinson B, Abbott KC, Bragg-Gresham J, Chen X, Gipson D, et al. US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2020;75(1):A6–7.
9. ERA-EDTA Registry. ERA-EDTA Registry Annual Report 2017 [Internet]. Department of Medical Informatics, Amsterdam, the Netherlands. 2019. Available from:
https://global.honda/content/dam/site/global/investors/cq_img/library/annual_report/FY201703_annual_report_s_e.pdf
10. Sociedad Española de Nefrología (SEN), Registro Español de Enfermos Renales de las Comunidades autónomas, Organización nacional de trasplantes (ONT) R español de enfermos renales. Informe de diálisis y Trasplantes 2018 (datos preliminares). *Inf 2018 Congr la Soc Española Nefrol (SEN)*, 2019 [Internet]. 2019;2018. Available from:
https://www.senefro.org/contents/webstructure/SEN_2019_REER_modificada.pdf
11. Webster AC, Nagler E V., Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet* [Internet]. 2017;389(10075):1238–52. Available from:
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32064-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32064-5)
12. Registro Español de Enfermos Renales . Informe de Diálisis y Trasplante 2017. Registros Autonómicos-de Enfermos Renales-ONT. Registro Español de Enfermos Renales . XLVIII Congr la Soc Española Nefrol (Madrid, noviembre 2018).
13. Organització Catalana de Trasplantaments (OCATT). Registre de malalts renales de Catalunya, informe estadístic 2018. Barcelona. Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, abril de 2020. 2018;
14. Lorenzo V, Perestelo I, Barroso M, Torres A, Nazco J. Evaluación económica de la hemodiálisis. Análisis de los componentes del coste basado en datos

- individuales. *Nefrologia*. 2010;30(4):403–12.
15. Vargas Marcos F. Documento Marco sobre Enfermedad Renal Crónica dentro de la Estrategia de Abordaje a la Cronicidad en el SNS. Minist Sanid Serv Soc E Igual [Internet]. 2015;54. Available from: http://www.senefro.org/modules/news/images/enfermedad_renal_cronica_2015.pdf
 16. Arend SM, Mallat MJK, Westendorp RJW, Van Der Woude FJ, Van Es LA. Patient survival after renal transplantation; more than 25 years follow-up. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(8):1672–9.
 17. Goldfarb DA. The natural history of chronic allograft nephropathy. *J Urol*. 2005;173(6):2106.
 18. Engels EA. Epidemiologic perspectives on immunosuppressed populations and the immunosurveillance and immunocontainment of cancer. *Am J Transplant*. 2019;19(12):3223–32.
 19. Dharnidharka VR. Comprehensive review of post-organ transplant hematologic cancers. *Am J Transplant*. 2018;18(3):537–49.
 20. Tort J. Activitat de donació i trasplantament d'òrgans a Catalunya. Informe 2014. 2015;27. Available from: http://trasplantaments.gencat.cat/web/.content/minisite/trasplantament/registres_activitat/registre_de_donacio_i_trasplantament/arxius/Informe-2015.pdf
 21. Cheung CY, Tang SCW. An update on cancer after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(6):914–20.
 22. Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med*. 2005;352(13):1371–3.
 23. Liefeldt L, Budde K. Risk factors for cardiovascular disease in renal transplant recipients and strategies to minimize risk. *Transpl Int*. 2010;23(12):1191–204.
 24. Marcén R. Cardiovascular risk factors in renal transplantation - Current controversies. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(SUPPL. 3):3–8.
 25. Moreso F, Grinyo JM. Graft dysfunction and cardiovascular risk - An unholy alliance. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(3):699–702.
 26. Wiebe C, Pochinco D, Blydt-Hansen TD, Ho J, Birk PE, Karpinski M, et al. Class II HLA epitope matching - A strategy to minimize de novo donor-specific antibody development and improve outcomes. *Am J Transplant*. 2013;13(12):3114–22.
 27. Dankers MKA, Witvliet MD, Roelen DL, De Lange P, Korfage N, Persijn GG, et al. The number of amino acid triplet differences between patient and donor is predictive for the antibody reactivity against mismatched human leukocyte antigens. *Transplantation*. 2004;77(8):1236–9.
 28. Kosmoliaptsis V, Mallon DH, Chen Y, Bolton EM, Bradley JA, Taylor CJ. Alloantibody Responses After Renal Transplant Failure Can Be Better Predicted by Donor-Recipient HLA Amino Acid Sequence and Physicochemical Disparities Than Conventional HLA Matching. *Am J Transplant*. 2016;16(7):2139–47.
 29. Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2004;351(6):2715–29.
 30. Ali JM, Bolton EM, Andrew Bradley J, Pettigrew GJ. Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation*. 2013;96(8):681–8.
 31. *Rev.Nefrología*. Alorreactividad frente a tolerancia: importancia de la inmunosupresión. 2016; Available from: <https://www.revistanefrologia.com/es->

- pdf-X2013757516600734
32. Solez K. History of the Banff classification of allograft pathology as it approaches its 20th year. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(1):49–51.
 33. Loupy A, Haas M, Roufosse C, Naesens M, Adam B, Afrouzian M, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell– and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2020;20(9):2318–31.
 34. Hara S. Cell mediated rejection revisited: Past, current, and future directions. *Nephrology*. 2018;23:45–51.
 35. Sis B, Bagnasco SM, Cornell LD, Randhawa P, Haas M, Lategan B, et al. Isolated endarteritis and kidney transplant survival: A multicenter collaborative study. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(5):1216–27.
 36. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell–mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant*. 2018;18(2):293–307.
 37. El Ters M, Grande JP, Keddis MT, Rodrigo E, Chopra B, Dean PG, et al. Kidney allograft survival after acute rejection, the value of follow-up biopsies. *Am J Transplant*. 2013;13(9):2334–41.
 38. Lefaucheur C, Gosset C, Rabant M, Viglietti D, Verine J, Aubert O, et al. T cell–mediated rejection is a major determinant of inflammation in scarred areas in kidney allografts. *Am J Transplant*. 2018;18(2):377–90.
 39. Noguchi H, Nakagawa K, Ueki K, Tsuchimoto A. Response to Treatment for Chronic-active T Cell – mediated Rejection in Kidney Transplantation : A Report of 3 Cases. 2020;6(12):e628.
 40. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med*. 2018;379(12):1150–60.
 41. Valenzuela NM, McNamara JT, Reed EF. Antibody-mediated graft injury: Complement-dependent and complement-independent mechanisms. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19(1):33–40.
 42. Rafei H, Kharfan-Dabaja MA, Nishihori T. A critical appraisal of extracorporeal photopheresis as a treatment modality for acute and chronic graft-versus-host disease. *Biomedicines*. 2017;5(4).
 43. O’Leary JG, Kaneku H, Banuelos N, Jennings LW, Klintmalm GB, Terasaki PI. Impact of IgG3 Subclass and C1q-Fixing Donor-Specific HLA Alloantibodies on Rejection and Survival in Liver Transplantation. *Am J Transplant* [Internet]. 2015 Apr;15(4):1003–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.13153>
 44. Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, Wiebe C, Thauinat O, Dubois V, et al. Non-complement-binding de novo donor-specific anti-HLA antibodies and kidney allograft survival. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(2):615–25.
 45. Bamoulid J, Roodenburg A, Staeck O, Wu K, Rudolph B, Brakemeier S, et al. Clinical outcome of patients with de novo c1q-binding donor-specific HLA antibodies after renal transplantation. *Transplantation*. 2017;101(9):2165–74.
 46. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, van Huyen J-PD, Mooney N, et al. Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival. *N Engl J Med*. 2013;369(13):1215–26.
 47. Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M, Couzi L, McGregor B, Badet L, 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(2):457–67.
48. Sellarés J, De Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: The dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant.* 2012;12(2):388–99.
49. Böhmig GA, Eskandary F, Doberer K, Halloran PF. The therapeutic challenge of late antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int.* 2019;32(8):775–88.
50. Tsapepas DS, Vasilescu R, Tanriover B, Coppleson Y, Rekhman Y, Hardy MA, et al. Preformed donor-specific antibodies and risk of antibody-mediated rejection in repeat renal transplantation. *Transplantation.* 2014;97(6):642–7.
51. Amrouche L, Aubert O, Suberbielle C, Rabant M, Van Huyen JPD, Martinez F, et al. Long-term Outcomes of Kidney Transplantation in Patients with High Levels of Preformed DSA: The Necker High-Risk Transplant Program. *Transplantation.* 2017;101(10):2440–8.
52. Vo AA, Sinha A, Haas M, Choi J, Mirocha J, Kahwaji J, et al. Factors Predicting Risk for Antibody-mediated Rejection and Graft Loss in Highly Human Leukocyte Antigen Sensitized Patients Transplanted after Desensitization. *Transplantation.* 2015;99(7):1423–30.
53. Schwaiger E, Eskandary F, Kozakowski N, Bond G, Kikić Željko, Yoo D, et al. Deceased donor kidney transplantation across donor-specific antibody barriers: Predictors of antibody-mediated rejection. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(8):1342–51.
54. Cioni M, Nocera A, Innocente A, Tagliamacco A, Trivelli A, Basso S, et al. De Novo Donor-Specific HLA Antibodies Developing Early or Late after Transplant Are Associated with the Same Risk of Graft Damage and Loss in Nonsensitized Kidney Recipients. *J Immunol Res.* 2017;2017.
55. Eskandary F, Bond G, Kozakowski N, Regele H, Marinova L, Wahrmann M, et al. Diagnostic contribution of donor-specific antibody characteristics to uncover late silent antibody-mediated rejection results of a cross-sectional screening study. *Transplantation.* 2017;101(3):631–41.
56. Yamamoto T, Watarai Y, Takeda A, Tsujita M, Hiramitsu T, Goto N, et al. De Novo Anti-HLA DSA Characteristics and Subclinical Antibody-Mediated Kidney Allograft Injury. *Transplantation.* 2016;100(10):2194–202.
57. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, et al. Incidence and impact of de Novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation.* 2013;95(3):410–7.
58. Lee H, Min JW, Kim J Il, Moon IS, Park KH, Yang CW, et al. Clinical significance of HLA-DQ antibodies in the development of chronic antibody-mediated rejection and allograft failure in kidney transplant recipients. *Med (United States).* 2016;95(11):1–9.
59. Lim WH, Chapman JR, Coates PT, Lewis JR, Russ GR, Watson N, et al. HLA-DQ mismatches and rejection in kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(5):875–83.
60. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2011;11(10):2132–43.

61. Moreso F, Carrera M, Goma M, Hueso M, Sellares J, Martorell J, et al. Early subclinical rejection as a risk factor for late chronic humoral rejection. *Transplantation*. 2012;93(1):41–6.
62. Luque S, Lúcia M, Melilli E, Lefaucheur C, Crespo M, Loupy A, et al. Value of monitoring circulating donor-reactive memory B cells to characterize antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2019;19(2):368–80.
63. Jordan SC, Bunnapradist S, Bromberg JS, Langone AJ, Hiller D, Yee JP, et al. Donor-derived cell-free DNA identifies antibody-mediated rejection in donor specific antibody positive kidney transplant recipients. *Transplant Direct*. 2018;4(9):1–5.
64. Naesens M, Kuypers DRJ, De Vusser K, Evenepoel P, Claes K, Bammens B, et al. The histology of kidney transplant failure: A long-term follow-up study. *Transplantation*. 2014;98(4):427–35.
65. Rempfort A, Ivanyi B, Mathe Z, Tinckam K, Mucsi I, Molnar MZ. Better understanding of transplant glomerulopathy secondary to chronic antibody-mediated rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(11):1825–33.
66. John R, Konvalinka A, Tobar A, Kim SJ, Reich HN, Herzenberg AM. Determinants of long-term graft outcome in transplant glomerulopathy. *Transplantation*. 2010;90(7):757–64.
67. López Jiménez V, Fuentes L, Jiménez T, León M, Garcia I, Sola E, et al. Transplant glomerulopathy: Clinical course and factors relating to graft survival. *Transplant Proc* [Internet]. 2012;44(9):2599–600. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.09.068>
68. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*. 2009;9(3):527–35.
69. Noreen HJ, McKinley DM, Gillingham KJ, Matas AJ, Segall M. Positive remote crossmatch: Impact on short-term and long-term outcome in cadaver renal transplantation. *Transplantation*. 2003;75(4):501–5.
70. Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, González-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chaves V, Gentil-Govantes MÁ, et al. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(3):1231–8.
71. Kanter Berga J, Sancho Calabuig A, Gavela Martínez E, Puig Alcaraz N, Beltran Catalan S, Avila Bernabeu A, et al. Pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single antigen bead flow cytometry: Risk factors and outcomes after kidney transplantation. *Transplant Proc* [Internet]. 2012;44(9):2529–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.09.102>
72. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins LS, Fonseca I, Beirão I, et al. Analysis of preformed donor-specific anti-HLA antibodies characteristics for prediction of antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transpl Immunol* [Internet]. 2015;32(2):66–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2015.01.002>
73. Redondo-Pachón D, Pérez-Sáez MJ, Mir M, Gimeno J, Llinás L, García C, et al. Impact of persistent and cleared preformed HLA DSA on kidney transplant outcomes. *Hum Immunol* [Internet]. 2018;79(6):424–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.02.014>
74. Terasaki PI. Humoral Theory of Transplantation. *Am J Transplant* [Internet].

- 2003 Jun;3(6):665–73. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-6143.2003.00135.x>
75. Gordon RD, Fung JJ, Markus B, Fox I, Iwatsuki S, Esquivel CO, et al. The antibody crossmatch in liver transplantation. *Surgery*. 1986;100(4):705–15.
76. Mañez R, Kelly RH, Kobayashi M, Takaya S, Bronsther O, Kramer D, et al. Immunoglobulin g lymphocytotoxic antibodies in clinical liver transplantation: Studies toward further defining their significance. *Hepatology* [Internet]. 1995 May;21(5):1345–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.1840210519>
77. Hathaway M, Gunson BK, Keogh AC, Briggs D, McMaster P, Neuberger JM. A POSITIVE CROSSMATCH IN LIVER TRANSPLANTATION-NO EFFECT OR INAPPROPRIATE ANALYSIS? *Transplantation* [Internet]. 1997 Jul;64(1):54–9. Available from: <http://journals.lww.com/00007890-199707150-00011>
78. Neumann UP, Lang M, Moloenhauer A, Langrehr JM, Glanemann M, Kahl A, et al. Significance of a T-lymphocytotoxic crossmatch in liver and combined liver-kidney transplantation. *Transplantation*. 2001;71(8):1163–8.
79. Morrissey PE, Gordon F, Shaffer D, Madras PN, Silva P, Sahyoun AI, et al. Combined liver-kidney transplantation in patients with cirrhosis and renal failure: Effect of a positive cross-match and benefits of combined transplantation. *Liver Transplant Surg*. 1998;4(5):363–9.
80. Flye MW, Duffy BF, Phelan DL, Ratner LE, Mohanakumar T. Protective effects of liver transplantation on a simultaneously transplanted kidney in a highly sensitized patient. *Transplantation*. 1990 Dec;50(6):1051–4.
81. Saidman SL, Duquesnoy RJ, Demetris AJ, McCauley J, Ramos H, Mazariegos G, et al. Combined liver-kidney transplantation and the effect of preformed lymphocytotoxic antibodies. *Transpl Immunol*. 1994;2(1):61–7.
82. Lang M, Neumann U, Kahl A, Steinmüller T, Settmacher U, Neuhaus P. Long-term outcome of 27 patients after combined liver-kidney transplantation. *Transplant Proc* [Internet]. 2001 Feb;33(1–2):1440–1. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134500025458>
83. Shapiro R, Zeevi A. Why does combined liver and kidney transplantation confer an immunologic benefit to a kidney? *Pediatr Transplant* [Internet]. 2010 Jun;14(4):439–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3046.2010.01336.x>
84. Mosconi G, Scolari MP, Feliciangeli G, Zanetti A, Zanelli P, Buscaroli A, et al. Combined Liver-Kidney Transplantation With Preformed Anti-HLA Antibodies: A Case Report. *Transplant Proc* [Internet]. 2006 May;38(4):1125–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004113450600340X>
85. Olausson M, Mjörnstedt L, Nordén G, Rydberg L, Mölne J, Bäckman L, et al. Successful Combined Partial Auxiliary Liver and Kidney Transplantation in Highly Sensitized Cross-Match Positive Recipients. *Am J Transplant* [Internet]. 2007 Jan;7(1):130–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-6143.2006.01592.x>
86. Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Nov 25;10(11):753–66. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2858>
87. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* [Internet]. 2006 Feb;43(S1):S54–62. Available from:

- <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.21060>
88. Crispe IN. Immune tolerance in liver disease. *Hepatology* [Internet]. 2014 Dec 26;60(6):2109–17. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.27254>
 89. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* [Internet]. 2013 Oct 18;14(10):996–1006. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni.2691>
 90. SUMIMOTO R, KAMADA N. SPECIFIC SUPPRESSION OF ALLOGRAFT REJECTION BY SOLUBLE CLASS I ANTIGEN AND COMPLEXES WITH MONOCLONAL ANTIBODY. *Transplantation* [Internet]. 1990 Oct;50(4):678–82. Available from: <http://journals.lww.com/00007890-199010000-00029>
 91. s. DAVIES HF, POLLARD s. G, CALNE RY. SOLUBLE HLA ANTIGENS IN THE CIRCULATION OF LIVER GRAFT RECIPIENTS. *Transplantation* [Internet]. 1989 Mar;47(3):524–7. Available from: <http://journals.lww.com/00007890-198903000-00025>
 92. Créput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D, Dausset J, et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol* [Internet]. 2003 Oct;39(4):587–94. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827803003544>
 93. Gugenheim J, Thai B Le, Rouger P, Gigou M, Gane P, Vial MC, et al. RELATIONSHIP BETWEEN THE LIVER AND LYMPHOCYTOTOXIC ALLOANTIBODIES IN INBRED RATS. *Transplantation* [Internet]. 1988 Feb;45(2):474–8. Available from: <http://journals.lww.com/00007890-198802000-00046>
 94. Sumpter TL, Abe M, Tokita D, Thomson AW. Dendritic cells, the liver, and transplantation. *Hepatology* [Internet]. 2007 Dec;46(6):2021–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.21974>
 95. Feng S, Sanchez-Fueyo A. Immune Tolerance After Liver Transplantation. In: D'Antiga L, editor. *Pediatric Hepatology and Liver Transplantation* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 625–52. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-96400-3_36
 96. Taner T, Park WD, Stegall MD. Unique molecular changes in kidney allografts after simultaneous liver-kidney compared with solitary kidney transplantation. *Kidney Int* [Internet]. 2017 May;91(5):1193–202. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253816307591>
 97. Taner T, Gustafson MP, Hansen MJ, Park WD, Bornschlegl S, Dietz AB, et al. Donor-specific hypo-responsiveness occurs in simultaneous liver-kidney transplant recipients after the first year. *Kidney Int* [Internet]. 2018 Jun;93(6):1465–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253818301352>
 98. Castillo-Rama M, Castro MJ, Bernardo I, Meneu-Diaz JC, Moreno Elola-Olaso A, Calleja-Antolin SM, et al. Preformed antibodies detected by cytotoxic assay or multibead array decrease liver allograft survival: Role of human leukocyte antigen compatibility. *Liver Transplant* [Internet]. 2008 Apr;14(4):554–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lt.21408>
 99. Askar M, Schold JD, Eghtesad B, Flechner SM, Kaplan B, Klingman L, et al. Combined Liver-Kidney Transplants: Allosensitization and Recipient Outcomes. *Transplantation* [Internet]. 2011 Jun;91(11):1286–92. Available from:

- <http://journals.lww.com/00007890-201106150-00022>
100. Schinstock CA, Mannon RB, Budde K, Chong AS, Haas M, Knechtle S, et al. Recommended Treatment for Antibody-mediated Rejection after Kidney Transplantation: The 2019 Expert Consensus from the Transplantation Society Working Group. *Transplantation*. 2020;104(5):911–22.
 101. Burton SA, Amir N, Asbury A, Lange A, Hardinger KL. Treatment of antibody-mediated rejection in renal transplant patients: A clinical practice survey. *Clin Transplant*. 2015;29(2):118–23.
 102. Velidedeoglu E, Cavaillé-Coll MW, Bala S, Belen OA, Wang Y, Albrecht R. Summary of 2017 FDA Public Workshop: Antibody-mediated Rejection in Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2018;102(6):e257–64.
 103. Bonomini V, Vangelista A, Frascà GM et al. Effects of plasmapheresis in renal transplant rejection: a controlled study. *Trans AmSoc Artif Intern Organs*. 1985;(31):698–703.
 104. Salvadori M, Tsalouchos A. Therapeutic apheresis in kidney transplantation: An updated review. *World J Transplant*. 2019;9(6):103–22.
 105. Böhmig GA, Wahrmann M, Regele H, Exner M, Robl B, Derfler K, et al. Immunoabsorption in severe C4d-positive acute kidney allograft rejection: A randomized controlled trial. *Am J Transplant*. 2007;7(1):117–21.
 106. Bartel G, Wahrmann M, Regele H, Kikić Ž, Fischer G, Druml W, et al. Peritransplant Immunoabsorption for Positive Crossmatch Deceased Donor Kidney Transplantation. *Am J Transplant* [Internet]. 2010 Sep;10(9):2033–42. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-6143.2010.03226.x>
 107. Schwenger V, Morath C. Immunoabsorption in nephrology and kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(8):2407–13.
 108. Wan SS, Ying TD, Wyburn K, Roberts DM, Wyld M, Chadban SJ. The treatment of antibody-mediated rejection in kidney transplantation: An updated systematic review and meta-analysis. *Transplantation*. 2018;102(4):557–68.
 109. Montgomery RA, Zachary AA, Racusen LC, Leffell MS, King KE, Burdick J, et al. Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients. *Transplantation*. 2000;70(6):887–95.
 110. Rocha PN, Butterly DW, Greenberg A, Reddan DN, Tuttle-Newhall J, Collins BH, et al. Beneficial effect of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin on renal allograft survival of patients with acute humoral rejection. *Transplantation*. 2003;75(9):1490–5.
 111. Lefaucheur C, Nochy D, Andrade J, Verine J, Gautreau C, Charron D, et al. Comparison of combination plasmapheresis/IVIg/Anti-CD20 versus high-dose ivig in the treatment of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2009;9(5):1099–107.
 112. Slatinska J, Honsova E, Burgelova M, Slavcev A, Viklicky O. Plasmapheresis and intravenous immunoglobulin in early antibody-mediated rejection of the renal allograft: A single-center experience. *Ther Apher Dial*. 2009;13(2):108–12.
 113. Slatinska J, Honsova E, Burgelova M, Slavcev A, Viklicky O. Plasmapheresis and intravenous immunoglobulin in the treatment and prevention of antibody mediated rejection. *Transplantationsmedizin Organ der Dtsch Transplantationsgesellschaft*. 2010;22(4):277–81.
 114. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M.

- Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: Current status and novel approaches. *Am J Transplant*. 2014;14(2):255–71.
115. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mabthera-epar-product-information_es.pdf. Ficha técnica MabThera.
 116. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): Mechanisms of action and resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7359–68.
 117. Geetha D, Specks U, Stone JH, Merkel PA, Seo P, Spiera R, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(4):976–85.
 118. Stone JH, Merkel PA, Spiera R, Seo P, Langford CA, Hoffman GS, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Jul 15;363(3):221–32. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0909905>
 119. Journal A. Special Issue: KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2009;9:S1–155.
 120. Karahan GE, Claas FHJ, Heidt S. B cell immunity in solid organ transplantation. *Front Immunol*. 2017;7(JAN):1–11.
 121. Chong AS. B cells as antigen-presenting cells in transplantation rejection and tolerance. *Cell Immunol* [Internet]. 2020;349(November 2019):104061. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104061>
 122. Hychko G, Mirhosseini A, Parhizgar A, Ghahramani N. A Systematic Review and Meta-Analysis of Rituximab in Antibody-mediated Renal Allograft Rejection. *Int J Organ Transplant Med* [Internet]. 2011;2(2):51–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25013595> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4089253>
 123. Garces JC, Giusti S, Staffeld-coit C, Bohorquez H, Ari J, Loss GE. Antibody-Mediated Rejection : A Review. 2017;46–55.
 124. Billing H, Rieger S, Ovens J, Süsal C, Melk A, Waldherr R, et al. Successful treatment of chronic antibody-mediated rejection with IVIG and rituximab in pediatric renal transplant recipients. *Transplantation*. 2008;86(9):1214–21.
 125. Fehr T, Rüsi B, Fischer A, Hopfer H, Wüthrich RP, Gaspert A. Rituximab and intravenous immunoglobulin treatment of chronic antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transplantation*. 2009;87(12):1837–41.
 126. Hong YA, Kim HG, Choi SR, Sun IO, Park HS, Chung BH, et al. Effectiveness of rituximab and intravenous immunoglobulin therapy in renal transplant recipients with chronic active antibody-mediated rejection. *Transplant Proc* [Internet]. 2012;44(1):182–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.12.006>
 127. Billing H, Rieger S, Süsal C, Waldherr R, Opelz G, Wühl E, et al. IVIG and rituximab for treatment of chronic antibody-mediated rejection: A prospective study in paediatric renal transplantation with a 2-year follow-up. *Transpl Int*. 2012;25(11):1165–73.
 128. Bachelet T, Nodimar C, Taupin JL, Lepreux S, Moreau K, Morel D, et al. Intravenous immunoglobulins and rituximab therapy for severe transplant glomerulopathy in chronic antibody-mediated rejection: A pilot study. *Clin Transplant*. 2015;29(5):439–46.
 129. Kahwaji J, Najjar R, Kancherla D, Villicana R, Peng A, Jordan S, et al. Histopathologic features of transplant glomerulopathy associated with response

- to therapy with intravenous immune globulin and rituximab. *Clin Transplant* [Internet]. 2014 May;28(5):546–53. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ctr.12345>
130. Moreso F, Crespo M, Ruiz JC, Torres A, Gutierrez-Dalmau A, Osuna A, et al. Treatment of chronic antibody mediated rejection with intravenous immunoglobulins and rituximab: A multicenter, prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Am J Transplant*. 2018;18(4):927–35.
 131. Shiu KY, Stringer D, McLaughlin L, Shaw O, Brookes P, Burton H, et al. Effect of Optimized Immunosuppression (Including Rituximab) on Anti-Donor Alloresponses in Patients With Chronically Rejecting Renal Allografts. *Front Immunol*. 2020;11(February).
 132. Macklin PS, Morris PJ, Knight SR. A systematic review of the use of rituximab for desensitization in renal transplantation. *Transplantation*. 2014;98(8):794–805.
 133. Zachary AA, Lucas DP, Montgomery RA, Leffell MS. Rituximab prevents an anamnestic response in patients with cryptic sensitization to HLA. *Transplantation*. 2013;95(5):701–4.
 134. Orandi BJ, Luo X, Massie AB, Garonzik-Wang JM, Lonze BE, Ahmed R, et al. Survival Benefit with Kidney Transplants from HLA-Incompatible Live Donors. *N Engl J Med*. 2016;374(10):940–50.
 135. Manook M, Koeser L, Ahmed Z, Robb M, Johnson R, Shaw O, et al. Post-listing survival for highly sensitised patients on the UK kidney transplant waiting list: a matched cohort analysis. *Lancet* [Internet]. 2017;389(10070):727–34. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31595-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31595-1)
 136. Villela lucia maria aversa. Ficha Técnica Bortezomib. https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/83444/83444_ft.pdf [Internet]. 2013;53(9):1689–99. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/83444/83444_ft.pdf
 137. Everly MJ, Everly JJ, Susskind B, Brailey P, Arend LJ, Alloway RR, et al. Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection. *Transplantation*. 2008;86(12):1754–61.
 138. Trivedi HL, Terasaki PI, Feroz A, Everly MJ, Vanikar A V., Shankar V, et al. Abrogation of Anti-HLA antibodies via proteasome inhibition. *Transplantation*. 2009;87(10):1555–61.
 139. Walsh RC, Brailey P, Girnita A, Alloway RR, Shields AR, Wall GE, et al. Early and late acute antibody-mediated rejection differ immunologically and in response to proteasome inhibition. *Transplantation*. 2011;91(11):1218–26.
 140. Woodle ES, Shields AR, Ejaz NS, Sadaka B, Girnita A, Walsh RC, et al. Prospective iterative trial of proteasome inhibitor-based desensitization. *Am J Transplant*. 2015;15(1):101–18.
 141. Waiser J, Budde K, Schütz M, Liefeldt L, Rudolph B, Schönemann C, et al. Comparison between bortezomib and rituximab in the treatment of antibody-mediated renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(3):1246–51.
 142. Eskandary F, Regele H, Baumann L, Bond G, Kozakowski N, Wahrmann M, et al. A Randomized Trial of Bortezomib in Late Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(2):591–605.
 143. Thurman JM, Panzer SE, Le Quintrec M. The role of complement in antibody mediated transplant rejection. *Mol Immunol* [Internet]. 2019;112(June):240–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.06.002>
 144. Yell M, Muth BL, Kaufman DB, Djamali A, Ellis TM. C1q binding activity of de

- novo donor-specific HLA antibodies in renal transplant recipients with and without antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 2015;99(6):1151–5.
145. Stites E, Le Quintrec M, Thurman JM. The Complement System and Antibody-Mediated Transplant Rejection. *J Immunol*. 2015;195(12):5525–31.
 146. EMA - European Medicines Agency. Anexo I ficha técnica o resumen de las características del producto 1: Eculizumab [Internet]. 2006. p. 1–27. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/soliris-epar-product-information_es.pdf
 147. Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, Cornell LD, Burns J, Dean PG, et al. Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2011;11(11):2405–13.
 148. Cornell LD, Schinstock CA, Gandhi MJ, Kremers WK, Stegall MD. Positive crossmatch kidney transplant recipients treated with eculizumab: Outcomes beyond 1 year. *Am J Transplant*. 2015;15(5):1293–302.
 149. Kulkarni S, Kirkiles-Smith NC, Deng YH, Formica RN, Moeckel G, Broecker V, et al. Eculizumab Therapy for Chronic Antibody-Mediated Injury in Kidney Transplant Recipients: A Pilot Randomized Controlled Trial. *Am J Transplant*. 2017;17(3):682–91.
 150. Marks WH, Mamode N, Montgomery RA, Stegall MD, Ratner LE, Cornell LD, et al. Safety and efficacy of eculizumab in the prevention of antibody-mediated rejection in living-donor kidney transplant recipients requiring desensitization therapy: A randomized trial. *Am J Transplant*. 2019;19(10):2876–88.
 151. Pedraz Muñoz J, Daudén E, García-Diez A. Manejo práctico del déficit de C1 inhibidor. *Actas Dermosifiliogr*. 2007;98(4):240–9.
 152. Montgomery RA, Orandi BJ, Racusen L, Jackson AM, Garonzik-Wang JM, Shah T, et al. Plasma-Derived C1 Esterase Inhibitor for Acute Antibody-Mediated Rejection Following Kidney Transplantation: Results of a Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Pilot Study. *Am J Transplant*. 2016;16(12):3468–78.
 153. Viglietti D, Gosset C, Loupy A, Deville L, Verine J, Zeevi A, et al. C1 Inhibitor in Acute Antibody-Mediated Rejection Nonresponsive to Conventional Therapy in Kidney Transplant Recipients: A Pilot Study. *Am J Transplant*. 2016;16(5):1596–603.
 154. Vo AA, Zeevi A, Choi J, Cisneros K, Toyoda M, Kahwaji J, et al. A phase I/II placebo-controlled trial of C1-inhibitor for prevention of antibody-mediated rejection in HLA sensitized patients. *Transplantation*. 2015;99(2):299–308.
 155. Eskandary F, Jilma B, Mühlbacher J, Wahrmann M, Regele H, Kozakowski N, et al. Anti-C1s monoclonal antibody BIVV009 in late antibody-mediated kidney allograft rejection—results from a first-in-patient phase 1 trial. *Am J Transplant*. 2018;18(4):916–26.
 156. Choi J, Aubert O, Vo A, Loupy A, Haas M, Puliyananda D, et al. Assessment of Tocilizumab (Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal) as a Potential Treatment for Chronic Antibody-Mediated Rejection and Transplant Glomerulopathy in HLA-Sensitized Renal Allograft Recipients. *Am J Transplant*. 2017;17(9):2381–9.
 157. Doberer K, Duerr M, Halloran PF, Eskandary F, Budde K, Regele H, et al. A Randomized Clinical Trial of Anti-IL-6 Antibody Clazakizumab in Late Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection. 2021;
 158. Interleukin 6 Blockade Modifying Antibody-Mediated Graft Injury and Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) Decline (IMAGINE) [Internet].

- Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03744910>
159. Jordan SC, Lorant T, Choi J, Kjellman C, Winstedt L, Bengtsson M, et al. IgG Endopeptidase in Highly Sensitized Patients Undergoing Transplantation. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Aug 3;377(5):442–53. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1612567>
 160. Lorant T, Bengtsson M, Eich T, Eriksson B-M, Winstedt L, Järnum S, et al. Safety, immunogenicity, pharmacokinetics, and efficacy of degradation of anti-HLA antibodies by IdeS (imlifidase) in chronic kidney disease patients. *Am J Transplant* [Internet]. 2018 Nov;18(11):2752–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.14733>
 161. Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, Moreau A, Hutchinson JA, Game DS, et al. Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *Lancet*. 2020;395(10237):1627–39.
 162. Ezzelarab MB, Zahorchak AF, Lu L, Morelli AE, Chalasani G, Demetris AJ, et al. Regulatory dendritic cell infusion prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates. *Am J Transplant*. 2013;13(8):1989–2005.
 163. Dreyer GJ, Groeneweg KE, Heidt S, Roelen DL, van Pel M, Roelofs H, et al. Human leukocyte antigen selected allogeneic mesenchymal stromal cell therapy in renal transplantation: The Neptune study, a phase I single-center study. *Am J Transplant*. 2020;20(10):2905–15.
 164. Heshmati F. Updating ECP action mechanisms. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2014;50(3):330–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2014.04.003>
 165. Edelson R, Berger C, Gasparro F, Jegasothy B, Heald P, Wintroub B, et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N Engl J Med* [Internet]. 1987;316(6):297–303. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=3543674
 166. Halle P, Paillard C, D’Incan M, Bordigoni P, Piguet C, De Lumley L, et al. Successful extracorporeal photochemotherapy for chronic graft-versus-host disease in pediatric patients. *J Hematotherapy Stem Cell Res*. 2002;11(3):501–12.
 167. Rafei H, Kharfan-Dabaja MA, Nishihori T. A critical appraisal of extracorporeal photopheresis as a treatment modality for acute and chronic graft-versus-host disease. *Biomedicines*. 2017;5(4).
 168. Rose EA, Barr ML, Xu H et al. Photochemotherapy in human heart transplant recipients at high risk for fatal rejection. *J Hear Lung Transplant*. 1992;11:746–50.
 169. allograft rejection controlled by photopheresis. 1994;1994.
 170. Jaksch P, Knobler R. ECP and solid organ transplantation. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2014;50(3):358–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2014.04.006>
 171. Kirklin JK, Brown RN, Huang ST, Naftel DC, Hubbard SM, Rayburn BK, et al. Rejection with hemodynamic compromise: Objective evidence for efficacy of photopheresis. *J Hear Lung Transplant*. 2006;25(3):283–8.
 172. Barr ML, Meiser BM, Eisen HJ, Roberts RF, Livi U, Dall’Amico R, et al. Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. *N Engl J*

- Med. 1998;339(24):1744–51.
173. Patel J, Klapper E, Shafi H, Kobashigawa JA. Extracorporeal photopheresis in heart transplant rejection. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2015;52(2):167–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2015.02.004>
 174. Morrell MR, Despotis GJ, Lublin DM, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. The efficacy of photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Hear Lung Transplant* [Internet]. 2010;29(4):424–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2009.08.029>
 175. Jaksch P, Scheed A, Keplinger M, Ernst MB, Dani T, Just U, et al. A prospective interventional study on the use of extracorporeal photopheresis in patients with bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Hear Lung Transplant* [Internet]. 2012;31(9):950–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2012.05.002>
 176. Baskaran G, Tiriveedhi V, Ramachandran S, Aloush A, Grossman B, Hachem R, et al. Efficacy of extracorporeal photopheresis in clearance of antibodies to donor-specific and lung-specific antigens in lung transplant recipients. *J Hear Lung Transplant* [Internet]. 2014;33(9):950–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2014.04.020>
 177. Hachem R, Corris P. Extracorporeal Photopheresis for Bronchiolitis Obliterans Syndrome after Lung Transplantation. *Transplantation*. 2018;102(7):1059–65.
 178. Scarisbrick J. Extracorporeal photopheresis: What is it and when should it be used? *Clin Exp Dermatol*. 2009;34(7):757–60.
 179. De Silvestro G. The Italian registry of therapeutic apheresis – 2015. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2017;56(1):75–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2016.12.024>
 180. Cid J, Carbassé G, Suárez-Lledó M, Moreno DF, Martínez C, Gutiérrez-García G, et al. Efficacy and safety of one-day offline extracorporeal photopheresis schedule processing one total blood volume for treating patients with graft-versus-host disease. *Transfusion*. 2019;59(8):2636–42.
 181. Kuzstal M, Kałk R, Krajewska M, Boratyńska M, Patrzalek D, Klinger M. Application of extracorporeal photopheresis in kidney transplant recipients: Technical considerations and procedure tolerance. *Transplant Proc*. 2011;43(8):2941–2.
 182. Tamain M, Sayegh J, Lionet A, Grimbert P, Philipponnet C, Hazzan M, et al. Extracorporeal photopheresis for the treatment of graft rejection in 33 adult kidney transplant recipients. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2019;58(4):515–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.06.031>
 183. Lamioni A, Carsetti R, Legato A, Landolfo A, Isacchi G, Emma F, et al. Induction of regulatory T cells after prophylactic treatment with photopheresis in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2007;83(10):1393–6.
 184. Dall'Amico R, Murer L, Montini G, Andreetta B, Zanon GF, Zacchello G, et al. Successful treatment of recurrent rejection in renal transplant patients with photopheresis. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(1):121–7.
 185. Wolfe JT, Tomaszewski JE, Grossman RA, Gottlieb SL, Naji A, Brayman KL, et al. Reversal of acute renal allograft rejection by extracorporeal photopheresis: A case presentation and review of the literature. *J Clin Apher*. 1996;11(1):36–41.
 186. Kumlien G, Genberg H, Shanwell A, Tydén G. Photopheresis for the treatment of refractory renal graft rejection. *Transplantation*. 2005;79(1):123–5.
 187. Gatza E, Rogers CE, Clouthier SG, Lowler KP, Tawara I, Liu C, et al.

- Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. *Blood*. 2008;112(4):1515–21.
188. Spisek R, Gasova Z, Bartunkova J. Maturation state of dendritic cells during the extracorporeal photopheresis and its relevance for the treatment of chronic graft-versus-host disease. *Transfusion*. 2006;46(1):55–65.
189. Morelli AE. The immune regulatory effect of apoptotic cells and exosomes on dendritic cells: Its impact on transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6(2):254–61.
190. Aubin F. Fotoinmunología. Efectos inmunológicos de las radiaciones ultravioletas y sus implicaciones en dermatología. EMC - Dermatología. 2012;46(2):1–11.
191. Goussetis E, Varela I, Tsigiotis P. Update on the mechanism of action and on clinical efficacy of extracorporeal photopheresis in the treatment of acute and chronic graft versus host disease in children. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2012;46(2):203–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2011.10.017>
192. Piñeiro GJ, De Sousa-Amorim E, Solé M, Ríos J, Lozano M, Cofán F, et al. Rituximab, plasma exchange and immunoglobulins: An ineffective treatment for chronic active antibody-mediated rejection. *BMC Nephrol*. 2018;19(1):1–9.
193. Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Death after graft loss: A novel endpoint for renal transplantation. *Transplant Proc* [Internet]. 2001;33(7–8):3405–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11750457/>
194. Viglietti D, Loupy A, Aubert O, Bestard O, Van Huyen JPD, Taupin JL, et al. Dynamic Prognostic Score to Predict Kidney Allograft Survival in Patients with Antibody-Mediated Rejection. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2018 Feb;29(2):606–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29255058/>
195. Montgomery RA, Loupy A, Segev DL. Antibody-mediated rejection: New approaches in prevention and management. *Am J Transplant*. 2018;18:3–17.
196. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant* [Internet]. 2018 Feb;18(2):293–307. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ajt.14625>
197. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* [Internet]. 2009 May 5;150(9):604. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19414839>
198. Tornig S, Rigatto C, Rush DN, Nickerson P, Jeffery JR. THE URINE PROTEIN TO CREATININE RATIO (P/C) AS A PREDICTOR OF 24-HOUR URINE PROTEIN EXCRETION IN RENAL TRANSPLANT PATIENTS. *Transplantation* [Internet]. 2001 Oct;72(8):1453–6. Available from: <http://journals.lww.com/00007890-200110270-00021>
199. Cid J, Carbassé G, Suárez-Lledó M, Moreno DF, Martínez C, Gutiérrez-García G, et al. Efficacy and safety of one-day offline extracorporeal photopheresis schedule processing one total blood volume for treating patients with graft-versus-host disease. *Transfusion*. 2019;59(8):2636–42.
200. Hemmelgarn BR, Manns BJ, Quan H, Ghali WA. Adapting the charlson comorbidity index for use in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2003 Jul;42(1):125–32. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272638603004153>
201. Miskulin DC, Martin AA, Brown R, Fink NE, Coresh J, Powe NR, et al. Predicting 1 year mortality in an outpatient haemodialysis population: A comparison of comorbidity instruments. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(2):413–20.
 202. Saidman SL, Duquesnoy RJ, Demetris AJ, Mccauley J, Ramos H, Mazariegos G, et al. NIH Public Access. 2010;2(1):61–7.
 203. Maiñez R, Kelly RH, Kobayashi M, Takaya S, Bronsther O, Kramer D, et al. Immunoglobulin G lymphocytotoxic antibodies in clinical liver transplantation: Studies toward further defining their significance. *Hepatology*. 1995;21(5):1345–52.
 204. O’Leary JG, Gebel HM, Ruiz R, Bray RA, Marr JD, Zhou XJ, et al. Class II alloantibody and mortality in simultaneous liver-kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13(4):954–60.
 205. Del Bello A, Thauinat O, Le Quintrec M, Bestard O, Durrbach A, Perrin P, et al. Combined Liver-Kidney Transplantation With Preformed Anti-human Leukocyte Antigen Donor-Specific Antibodies. *Kidney Int Reports [Internet]*. 2020;5(12):2202–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2020.09.018>
 206. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZ” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(3):452–8.
 207. Böhmig GA, Eskandary F, Doberer K, Halloran PF. The therapeutic challenge of late antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int*. 2019;32(8):775–88.
 208. Ezzelarab MB, Zahorchak AF, Lu L, Morelli AE, Chalasani G, Demetris AJ, et al. Regulatory dendritic cell infusion prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates. *Am J Transplant*. 2013;13(8):1989–2005.
 209. Kirklin JK, Brown RN, Huang ST, Naftel DC, Hubbard SM, Rayburn BK, et al. Rejection with hemodynamic compromise: Objective evidence for efficacy of photopheresis. *J Hear Lung Transplant*. 2006;25(3):283–8.
 210. Barr ML, Meiser BM, Eisen HJ, Roberts RF, Livi U, Dall’Amico R, et al. Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. *N Engl J Med*. 1998;339(24):1744–51.
 211. Morrell MR, Despotis GJ, Lublin DM, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. The efficacy of photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Hear Lung Transplant [Internet]*. 2010;29(4):424–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2009.08.029>
 212. Jaksch P, Scheed A, Keplinger M, Ernst MB, Dani T, Just U, et al. A prospective interventional study on the use of extracorporeal photopheresis in patients with bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Hear Lung Transplant [Internet]*. 2012;31(9):950–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2012.05.002>
 213. Baskaran G, Tiriveedhi V, Ramachandran S, Aloush A, Grossman B, Hachem R, et al. Efficacy of extracorporeal photopheresis in clearance of antibodies to donor-specific and lung-specific antigens in lung transplant recipients. *J Hear Lung Transplant [Internet]*. 2014;33(9):950–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2014.04.020>
 214. Kuształ M, Kałk R, Krajewska M, Boratyńska M, Patrzalek D, Klinger M. Application of extracorporeal photopheresis in kidney transplant recipients: Technical considerations and procedure tolerance. *Transplant Proc*.

- 2011;43(8):2941–2.
215. Lamioni A, Carsetti R, Legato A, Landolfo A, Isacchi G, Emma F, et al. Induction of regulatory T cells after prophylactic treatment with photopheresis in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2007;83(10):1393–6.
216. Wolfe JT, Tomaszewski JE, Grossman RA, Gottlieb SL, Naji A, Brayman KL, et al. Reversal of acute renal allograft rejection by extracorporeal photopheresis: A case presentation and review of the literature. *J Clin Apher*. 1996;11(1):36–41.
217. Kumlien G, Genberg H, Shanwell A, Tydén G. Photopheresis for the treatment of refractory renal graft rejection. *Transplantation*. 2005;79(1):123–5.
218. Scarisbrick J. Extracorporeal photopheresis: What is it and when should it be used? *Clin Exp Dermatol*. 2009;34(7):757–60.
219. Rovira J, Ramírez-Bajo MJ, Banon-Maneus E, Lazo-Rodríguez M, Moya-Rull D, Hierro-García N, et al. Tofacitinib Halts Progression of Graft Dysfunction in a Rat Model of Mixed Cellular and Humoral Rejection. *Transplantation*. 2018;102(7):1075–84.
220. Sijpkens YWJ, Doxiadis IIN, Mallat MJK, De Fijter JW, Bruijn JA, Claas FHH, et al. Early versus late acute rejection episodes in renal transplantation. *Transplantation*. 2003;75(2):204–8.
221. EARLY_VERSUS_LATE_ACUTE_RENAL_ALLOGRAFT_REJECTION_7.pdf.
222. Gupta A, Broin P, Bao Y, Pullman J, Kamal L, Ajaimy M, et al. Clinical and molecular significance of microvascular inflammation in transplant kidney biopsies. *Kidney Int [Internet]*. 2016;89(1):217–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26422506/>
223. Tsuji T, Yanai M, Itami H, Ishii Y, Akimoto M, Fukuzawa N, et al. Microvascular inflammation in early protocol biopsies of renal allografts in cases of chronic active antibody-mediated rejection. *Nephrology [Internet]*. 2015 Jul;20(S2):26–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26031582/>
224. Randhawa P. T-cell-mediated rejection of the kidney in the era of donor-specific antibodies: diagnostic challenges and clinical significance [Internet]. Vol. 20, *Current opinion in organ transplantation*. *Curr Opin Organ Transplant*; 2015. p. 325–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25944230/>
225. Willicombe M, Roufosse C, Brookes P, Mclean AG, Galliford J, Cairns T, et al. Acute Cellular Rejection: Impact of Donor-Specific Antibodies and C4d. 2014; Available from: <http://links.lww.com/TP/A891>
226. Vazquez Martul E. The pathology of renal transplants. *Rev Esp Patol [Internet]*. 2018;51(2):110–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.patol.2017.10.001>
227. Scemla A, Loupy A, Candon S, Mamzer MF, Martinez F, Zuber J, et al. Incidence of infectious complications in highly sensitized renal transplant recipients treated by rituximab: A case-controlled study. *Transplantation*. 2010;90(11):1180–4.
228. Kamar N, Milioto O, Puissant-Lubrano B, Esposito L, Pierre MC, Mohamed AO, et al. Incidence and predictive factors for infectious disease after rituximab therapy in kidney-transplant patients. *Am J Transplant*. 2010;10(1):89–98.
229. Grim SA, Pham T, Thielke J, Sankary H, Oberholzer J, Benedetti E, et al. Infectious complications associated with the use of rituximab for ABO-incompatible and positive cross-match renal transplant recipients. *Clin*

- Transplant. 2007;21(5):628–32.
230. Hong YA, Kim HG, Choi SR, Sun IO, Park HS, Chung BH, et al. Effectiveness of Rituximab and Intravenous Immunoglobulin Therapy in Renal Transplant Recipients with Chronic Active Antibody-Mediated Rejection. *Transplant Proc* [Internet]. 2012 Jan;44(1):182–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004113451101668X>
 231. Moreso F, Crespo M, Ruiz JC, Torres A, Gutierrez-Dalmau A, Osuna A, et al. Treatment of chronic antibody mediated rejection with intravenous immunoglobulins and rituximab: A multicenter, prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Am J Transplant*. 2018;18(4):927–35.
 232. Sablik KA, Clahsen-van Groningen MC, Looman CWN, Damman J, Roelen DL, van Agteren M, et al. Chronic-active antibody-mediated rejection with or without donor-specific antibodies has similar histomorphology and clinical outcome - a retrospective study. *Transpl Int* [Internet]. 2018 Aug;31(8):900–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tri.13154>
 233. AbdulRahim N, Anderson L, Kotla S, Liu H, Ariyamuthu VK, Ghanta M, et al. Lack of Benefit and Potential Harm of Induction Therapy in Simultaneous Liver-Kidney Transplants. *Liver Transplant* [Internet]. 2019 Mar;25(3):411–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lt.25390>
 234. O’Leary JG, Gebel HM, Ruiz R, Bray RA, Marr JD, Zhou XJ, et al. Class II Alloantibody and Mortality in Simultaneous Liver-Kidney Transplantation. *Am J Transplant* [Internet]. 2013 Apr;13(4):954–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.12147>
 235. A Eid , S B Moore, R H Wiesner, S R DeGoey, A Nielson RAK. Evidence that the liver does not always protect the kidney from hyperacute rejection in combined liver-kidney transplantation across a positive lymphocyte crossmatch. *Transplantation*. 1990;(Aug;50(2)):331–4.
 236. Torres F, Ríos J, Saez-Peñataro J, Pontes C. Is Propensity Score Analysis a Valid Surrogate of Randomization for the Avoidance of Allocation Bias? *Semin Liver Dis* [Internet]. 2017 Aug 28;37(03):275–86. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0037-1606213>
 237. Feng S, Bucuvalas J. Tolerance after liver transplantation: Where are we? *Liver Transplant* [Internet]. 2017 Dec;23(12):1601–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lt.24845>
 238. Hibi T, Nishida S, Sageshima J, Levi DM, Ruiz P, Roth D, et al. Excessive immunosuppression as a potential cause of poor survival in simultaneous liver/kidney transplantation for hepatitis C. *Transpl Int* [Internet]. 2014 Jun;27(6):606–16. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tri.12303>
 239. Leca N, Warner P, Bakthavatsalam R, Nelson K, Halldorson J, Rayhill S, et al. Outcomes of Simultaneous Liver and Kidney Transplantation in Relation to a High Level of Preformed Donor-Specific Antibodies. *Transplant J* [Internet]. 2013 Nov;96(10):914–8. Available from: <http://journals.lww.com/00007890-201311270-00012>
 240. Nilles KM, Krupp J, Lapin B, Sustento-Reodica N, Gallon L, Levitsky J. Incidence and impact of rejection following simultaneous liver-kidney transplantation. *J Hepatol* [Internet]. 2015 Feb;62(2):340–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827814006254>
 241. Xts U. Papel de la fotoaféresis en el tratamiento del rechazo celular agudo refractario en trasplante renal Role of photopheresis in the treatment of refractory

-
- cellular rejection in kidney transplantation Late onset of de novo atypical hemolytic – uremic syndro. 2015;6(3):327–8.
242. Whittle R, Taylor PC. Circulating B-cell activating factor level predicts clinical response of chronic graft-versus-host disease to extracorporeal photopheresis. *Blood*. 2011;118(24):6446–9.
243. Zielinski C. To the editor : Proportions of immature CD19+ CD21- B lymphocytes predict the response to extracorporeal. 2009;114(3):744–6.
244. Vieyra P, Wolf P. Extracorporeal Photopheresis: A Case of Immunotherapy Ahead of Its Time. *Transfus Med Hemotherapy*. 2020;47(3):226–35.
245. Pool M, Leuvenink H, Moers C. Reparative and regenerative effects of mesenchymal stromal cells-promising potential for kidney transplantation? *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).