



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

TÍTULO

Valor predictivo del fenotipo molecular sobre la progresión
de las lesiones renales en biopsias de seguimiento en
trasplante renal.

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

DEPARTAMENTO MEDICINA



Universitat Autònoma de Barcelona

Doctorando: Irina B. Torres Rodríguez

Director: Francesc J. Moreso Mateos

Tutor: Rafael Esteban Mur

2017

ÍNDICE

1.	Introducción	4
1.1.	Trasplante renal en la enfermedad renal crónica terminal	4
1.1.1.	Revisión histórica	4
1.1.2.	Retos en trasplante renal	6
1.2.	Monitorización histológica post-trasplante renal	10
1.2.1.	Seguridad de la biopsia de seguimiento	11
1.2.2.	Inflamación subclínica en injertos con función estable	12
1.2.2.1.	Incidencia y factores de riesgo	13
1.2.2.2.	Influencia del tratamiento inmunosupresor.	16
1.2.2.3.	Implicación sobre el pronóstico	17
1.2.2.4.	Tratamiento de la inflamación subclínica	18
1.2.3.	Progresión del daño crónico en injertos con función estable	20
1.2.4.	Inflamación subclínica y anticuerpos anti-HLA de novo	21
1.3.	Monitorización inmunológica post-trasplante renal	23
1.3.1.	Anticuerpos anti-HLA	23
1.3.2.	Subpoblaciones linfocitarias	29
1.4.	Estudio del fenotipo molecular en biopsias renales	31
1.4.1.	Microarrays de ADN: conceptos generales	31
1.4.2.	Fenotipo molecular en trasplante renal	33
1.4.3.	Fenotipo molecular del rechazo en trasplante renal	33
1.4.4.	Microarrays de ADN en biopsias de seguimiento	34
2.	Hipótesis	37
3.	Objetivos	38
4.	Trabajos publicados	39
4.1.	Torres-Rodríguez IB y cols. Nefrología 2014; 34 (6): 749-55	42
4.2.	Moreso F y cols. Transplant Immunol 2014; 31 (1): 11-6.	47
4.3.	Torres IB y cols. Clin Transplant 2014; 28 (10): 1148-54	49
5.	Discusión conjunta	62
6.	Conclusiones	75
7.	Futuras líneas de investigación en desarrollo	73
8.	Bibliografía	75
9.	Anexos	88
9.1.	Torres IB y cols. Transplant Int 2017 (en prensa)	90
9.2.	Torres IB y cols. Biomed Res Int 2014. 2014:750-602	124

9.3. Tablas	134
9.4. Figuras	139

1. INTRODUCCIÓN

1.1. TRASPLANTE RENAL EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

1.1.1. REVISIÓN HISTÓRICA

La insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) fue causa de mortalidad hasta bien avanzada la mitad del pasado siglo ya que no se disponía de ningún tratamiento para los pacientes que la padecían. En la actualidad es un relevante problema de salud pública a nivel mundial con una prevalencia estimada entre un 8-16% ⁽¹⁾, existiendo una amplia variabilidad de su incidencia y prevalencia entre distintos países, manteniéndose relativamente estable en los países desarrollados durante las dos últimas décadas. La diabetes mellitus es la principal causa de incidencia de IRCT, siendo la hemodiálisis el tratamiento sustitutivo renal más común a nivel mundial seguido del trasplante renal. La morbimortalidad asociada a la presencia de enfermedad cardiovascular reduce la calidad de vida y empeora el pronóstico a medio y largo plazo en los pacientes con IRCT ⁽²⁾.

Durante la segunda guerra mundial se pusieron en marcha los primeros tratamientos de diálisis que permitieron sobrevivir a los pacientes con fracaso renal agudo en espera de que la función del riñón se recuperara. Posteriormente, durante la década de los 50 en los Estados Unidos de América y durante la década de los 60 en nuestro país, se pusieron en marcha los primeros programas de diálisis crónica para los pacientes con IRCT. El trasplante renal es el tratamiento de elección para los pacientes con IRCT debido a su asociación con una mayor supervivencia, mejor calidad de vida y menor costo de salud comparado con el tratamiento sustitutivo mediante diálisis⁽³⁾.

La historia del trasplante renal corre de forma paralela a la de las técnicas de diálisis. Esta técnica empezó a desarrollarse a principios del siglo pasado cuando Alexis Carrel (Premio Nobel de Medicina 1912) describió la técnica de la sutura vascular, imprescindible para el trasplante de órganos sólidos ⁽⁴⁾⁽⁵⁾. El primer trasplante se realizó en 1936 por Yu Voronoy en Rusia y fracasó a los pocos días debido a la aparición de rechazo agudo⁽⁶⁾. Dados los desconocimientos en la inmunobiología del rechazo, no fue hasta 1954 que se pudo realizar el primer trasplante renal con éxito. En 1954, los Dres. John Merrill y Joseph Murray (Premio Nobel de Medicina 1990) del Peter Bent Brigham Hospital de Boston realizaron el primer trasplante renal entre gemelos univitelinos ⁽⁷⁾. Posteriormente, en 1959 se realizaron tanto en Boston como en París (Hospital Necker) los primeros trasplantes entre hermanos no idénticos. La

gran barrera para poder aumentar el número de trasplantes era la falta de tratamientos para controlar el rechazo del órgano.

Por otra parte, para poder desarrollar los programas de trasplante renal era necesario disponer de órganos obtenidos de donantes cadáver. En 1959, los neurofisiólogos Collaret y Goulon describieron el coma “depassé”, conocido posteriormente como muerte cerebral. Esto permitió que en 1963 se realizara el primer trasplante utilizando un órgano procedente de un donante en muerte encefálica, lo cual permitió definir un marco legal para la utilización de estos órganos. De todas formas, en nuestro país, hubo muchos años de vacío legal, y no fue hasta 1979 que se promulgó la ley de 27 de octubre 30/1979 sobre la extracción y trasplante de órganos.

Los avances en inmunología que se produjeron durante la pasada centuria también contribuyeron al desarrollo de los trasplantes. En 1936, Peter Gorer fue el primero que describió un complejo de histocompatibilidad en ratones y posteriormente George Snell (Premio Nobel de Medicina 1980) planteó que el rechazo de tejidos por el ratón era debido a incompatibilidad en algunos antígenos ⁽⁸⁾⁽⁹⁾. Este complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) fue denominado «H-2» (en honor al antígeno 2 descrito por Gorer) y es similar al CMH de varias especies. En 1952, Jean Dausset (Premio Nobel de Medicina 1980) demostró que en los glóbulos blancos existe un sistema de histocompatibilidad similar al de los glóbulos rojos⁽⁸⁾. En el año 1964, se inició un esfuerzo internacional para la caracterización del CMH (IHW, International Histocompatibility Workshop) y se definió el área del cromosoma 6 donde se codifican los antígenos HLA A, B y C, que por entonces se creía que sólo eran expresados por los leucocitos (HLA: human leucocytic antigen). En los años 70, se identificaron los antígenos HLA de clase II y luego, con los avances de la biología molecular, la investigación se centró a nivel de genes más que en sus productos. Posteriormente, el Prof. Paul I. Terasaki desarrolló el test de microtoxicidad que permitía caracterizar las variantes de HLA en los donantes y receptores y describió la utilidad de la prueba cruzada donante/receptor para prevenir la aparición del rechazo hiperagudo ⁽¹⁰⁾. De hecho, sus contribuciones a la teoría humoral del rechazo del trasplante siguen vigentes en la actualidad cuando el tratamiento del rechazo mediado por células T se ha podido reducir gracias a los tratamientos disponibles ⁽¹¹⁾.

Para poder realizar el trasplante con éxito es necesario disponer de tratamientos para prevenir y tratar el rechazo del injerto. En 1961 se introdujo el tratamiento con azatioprina, primer inmunosupresor disponible vía oral, que permitió realizar trasplantes con órganos obtenidos de donante cadáver ⁽¹²⁾. Poco tiempo después, el Dr. Thomas Starzl reportó una serie de 22 trasplantes renales con

resultados aceptables utilizando la azatioprina como tratamiento de mantenimiento y tratando los episodios de rechazo agudo con pulsos de corticoesteroides. Posteriormente se introdujo el tratamiento con anticuerpos antilinfocitarios ⁽¹³⁾. La expansión del trasplante renal se produjo gracias a la introducción de la ciclosporina en la década de los 70 y, más recientemente, la introducción del micofenolato mofetil y el tacrolimus durante la década de los 90 han contribuido a mejorar los resultados del trasplante renal ^{(14) (15)}.

Durante la década de los 70 y 80 se produjo una expansión exponencial de los programas de trasplante renal en nuestro país, de tal forma que a día de hoy España es el país que lidera las tasas de donación y trasplante renal a nivel mundial. En la actualidad, el trasplante renal forma parte de la práctica clínica en muchos hospitales de nuestro ámbito. En Cataluña existen seis programas de trasplante renal de adultos y dos programas de trasplante renal infantil. La tasa de trasplante renal ha crecido durante las últimas décadas y en 2016 superó los 100 procedimientos p.m.p. adulta. Esto ha sido factible gracias a la implantación de un sistema que permite obtener una tasa de donación cadáver muy elevado. Durante los últimos años los programas de donación en asistolia (especialmente el Maastricht tipo III) y los programas de donación de vivo han contribuido de forma significativa a aumentar el número de trasplantes ⁽¹⁶⁾.

1.1.2. RETOS EN TRASPLANTE RENAL

El trasplante renal es la técnica de tratamiento sustitutivo renal que ofrece una mejor supervivencia y una mejor calidad de vida. Según datos del Registre de Malalts Renals de Catalunya ⁽¹⁷⁾, la supervivencia del paciente al año del trasplante supera el 95% y la del injerto se sitúa alrededor del 90%. En los años siguientes, se produce una pérdida constante de injertos que oscila alrededor del 4-6% anual, en la mitad de los casos por fallecimiento del paciente con injerto funcional y en la otra mitad por fracaso del injerto con retorno a diálisis. Esto significa que a los 10 años del trasplante, la mitad de los receptores continúan con un trasplante funcional, pero en la mitad de los casos se ha producido un fracaso del injerto con una supervivencia del paciente del 74% y una supervivencia del injerto con censura de la muerte del 65%. Por lo tanto, a pesar de que los resultados del trasplante son aceptables, existen todavía unas limitaciones que se relacionan con:

1. Cambios clínicos en donantes y receptores

Durante las últimas décadas se ha producido un aumento progresivo de la edad de los donantes que en la actualidad alcanza una media de casi 60 años y en más del 25% de los casos excede los 70 años. Además, la donación por traumatismo cráneo-encefálico (TCE) se ha reducido y ha aumentado la tasa de donación por accidente cerebro-vascular (ACV) y la tasa de donación en asistolia ⁽¹⁶⁾. Este perfil de donante con mayor comorbilidad (hipertensión arterial, diabetes mellitus) presenta lesiones renales al momento de la donación (esclerosis glomerular, fibrosis intersticial, arteriopatía hialina, engrosamiento fibroso de la íntima arterial) que van a limitar la recuperación funcional del injerto y su supervivencia a largo plazo ^{(18) (19) (20)}.

Los criterios para incluir a un paciente en lista de espera se han extendido, de tal forma que la edad ha dejado de ser un criterio de exclusión para acceder al trasplante renal. En la actualidad, la edad media de los receptores es de 54 años y el 30% de los procedimientos se realizan en pacientes de más de 65 años ¹. Este envejecimiento se ha acompañado de un aumento de la comorbilidad de los receptores (diabetes, cardiopatía isquémica, vasculopatía periférica,...) que se va a acompañar de una mayor tasa de complicaciones infecciosas y cardiovasculares y de un mayor riesgo de desarrollar neoplasias.

2. Inmunosupresión personalizada

Desde principios de este siglo, la mayor parte de unidades de trasplante renal ha adoptado unas pautas de inmunosupresión que permiten prevenir la aparición de rechazo agudo con gran eficacia. Se basan en la combinación de pautas de inducción (anticuerpos monoclonales contra la cadena α del receptor de interleucina 2 o sueros anti-linfocitarios) con una pauta de mantenimiento en la que el uso de un inhibidor de la calcineurina es pieza fundamental. En la actualidad, tacrolimus es el inmunosupresor más utilizado siendo marginal el uso de ciclosporina. Esta pauta de mantenimiento se combina con inhibidores del metabolismo de las purinas (micofenolato mofetilo) o con inhibidores de mTOR (mammalian target of rapamycin), sirolimus y everolimus. Siguen utilizándose los corticoides a dosis bajas y aunque se han desarrollado diversas estrategias para su eliminación (pautas cortas de < 14 días o eliminación precoz entre los 3-6 meses), las ventajas de un mantenimiento sin esteroides respecto a un mantenimiento con esteroides a dosis bajas (<0.1 mg/kg/día) sigue siendo tema de debate. Otras opciones terapéuticas que han demostrado ventajas en ensayos clínicos como el inhibidor de la señal co-estimuladora Belatacept, no se hallan disponibles en el mercado español.

En general, estas pautas de tratamiento se han derivado de ensayos clínicos realizados en un perfil de donantes/receptores que se alejan de la práctica clínica habitual y se acompañan de efectos deletéreos a corto y largo plazo. Así, la mortalidad por causa infecciosa sigue siendo prevalente durante el primer año (alrededor del 3%) y a largo plazo las complicaciones neoplásicas y cardiovasculares son muy frecuentes⁽²¹⁾. Por lo tanto, necesitamos disponer de marcadores biológicos que contribuyan a definir un perfil de riesgo individual para implantar un tratamiento personalizado. A pesar de los esfuerzos realizados durante la última década disponemos de pocas herramientas para monitorizar a nuestros pacientes. La monitorización inmunológica mediante la determinación seriada de la aparición de anticuerpos anti-HLA se ha incorporado a la práctica clínica ⁽²²⁾, pero cuando estos aparecen no disponemos de tratamientos efectivos para su eliminación (especialmente cuando son anticuerpos donante-específicos de clase II contra locus DQ) y conducen al fracaso del injerto ⁽²³⁾. La monitorización histológica mediante biopsias ha sido un terreno ampliamente explorado durante los últimos 30 años y ha contribuido a caracterizar la presencia de lesiones subclínicas. Sin embargo, es un procedimiento invasivo no exento de posibles complicaciones. Además, la utilidad de esta monitorización para tomar decisiones terapéuticas sigue siendo todavía tema de debate.

3. Rechazo mediado por anticuerpos anti-HLA

Con las pautas de inmunosupresión disponibles en la actualidad la incidencia de rechazo agudo mediado por linfocitos T durante el primer año post-trasplante se ha reducido por debajo del 10% y ha emergido como un nuevo reto terapéutico el rechazo mediado por anticuerpos. Los pacientes que han sufrido eventos sensibilizadores (trasplantes previos, transfusiones múltiples, embarazos) presentan anticuerpos anti-HLA preformados donante-específicos (DSA) o células de memoria (linfocitos B, células plasmáticas de larga vida residentes en la médula ósea) que pueden desencadenar un rechazo agudo/crónico mediado por anticuerpos. A pesar de presentar peores resultados que los pacientes sin anticuerpos preformados y que en muchos centros se evita el trasplante en estos pacientes (prueba cruzada donante / receptor virtual negativa), se ha demostrado que los pacientes que reciben un injerto contra el que presenten DSA tienen una mejor supervivencia del paciente a largo plazo que los pacientes que quedan a la espera de un injerto renal compatible ^{(24) (25) (26)} Por otra parte, a lo largo del seguimiento los pacientes desarrollan DSA “*de novo*” que se van a asociar con la aparición de rechazo crónico activo mediado por anticuerpos y

conducir al fracaso tardío del injerto. La aparición de DSA “*de novo*” se ha relacionado con la falta de adherencia al tratamiento inmunosupresor y con la pauta de mantenimiento utilizada tras el trasplante ⁽²⁷⁾ ⁽²⁸⁾. Por lo tanto, sigue siendo tema de debate la pauta de mantenimiento que se debe utilizar a medio y largo plazo para prevenir la aparición de DSA.

En la figura 1 se muestra de forma teórica la evolución de la función renal del injerto según las características de los donantes y receptores así como la influencia de los distintos eventos que aparecen tras el trasplante renal y conducen a la disfunción crónica del injerto renal.

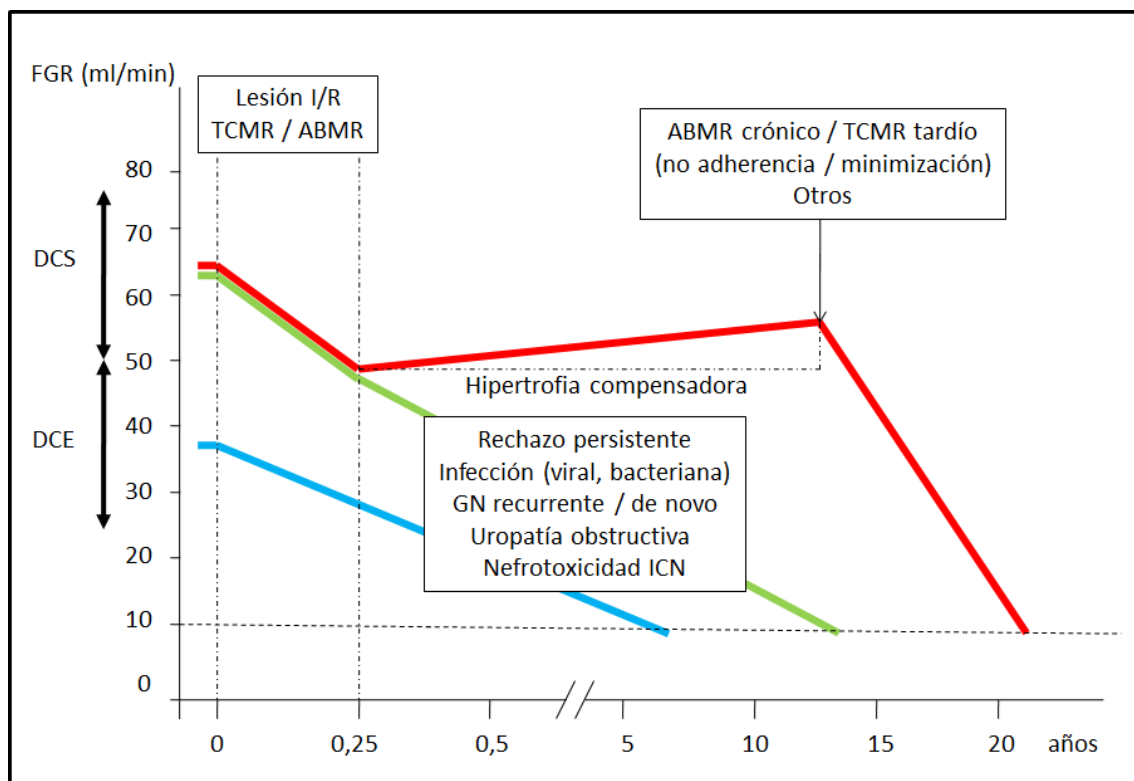


Figura 1. Distintos patrones de evolución de la función renal en los injertos renales con disfunción crónica. DCS, donante criterios estándar; DCE, donante criterios expandidos; FGR, filtrado glomerular renal; I/R isquemia reperfusión; TCMR, rechazo agudo celular; ABMR rechazo mediado por anticuerpos; GN, glomerulonefritis; ICN, inhibidores de la calcineurina. Modificado de Moreso F y Hernandez D.⁽²⁹⁾

1.2. MONITORIZACIÓN HISTOLÓGICA POST-TRASPLANTE.

La biopsia renal es una herramienta imprescindible en la monitorización del injerto tras el trasplante renal ya que nos permite diagnosticar y establecer un tratamiento y un pronóstico ante los episodios de disfunción del injerto ⁽³⁰⁾ ⁽³¹⁾. Durante los últimos 25 años se ha llevado a cabo un extenso trabajo con el objetivo de estandarizar la evaluación histológica de las alteraciones del injerto renal. Desde la primera reunión del grupo de Banff celebrada en 1991 ⁽³²⁾ se han mantenido reuniones con periodicidad bianual y tras cada reunión se ha realizado una publicación en las revistas de la especialidad donde se ha revisado de forma constante la clasificación con el objetivo de poder incorporar rápidamente las novedades derivadas de los trabajos de distintos grupos de investigación. En el documento que recogió las conclusiones de la reunión de 1997 ⁽³³⁾ se describe la representación de glomérulos y arterias que debe contener la muestra (un mínimo de 10 glomérulos y 2 arterias para muestras adecuadas y un mínimo de 7 glomérulos y 1 arteria para muestras marginales) así como el método de procesamiento de la misma (3 laminillas con H&E, 3 laminillas con PAS o plata y 1 laminilla con tricómico). Posteriormente, en la reunión de 2001, se incorporó la tinción con C4d en tejido congelado o parafinado ⁽³⁴⁾ y, en la actualidad, la última revisión de la clasificación que se halla disponible es la realizada en la reunión de 2015 ⁽³⁵⁾ como se presenta en la tabla 1 del anexo.

La evaluación de las lesiones crónicas (fibrosis intersticial, atrofia tubular, hialinosis arteriolar, engrosamiento intimal arterial) es una tarea compleja ya que estas lesiones también se asocian al envejecimiento, a la hipertensión arterial o a la diabetes. Dado que a día de hoy se están utilizando injertos renales procedentes de donantes añosos (hasta 80-90 años) y con comorbilidades (hipertensión arterial, diabetes mellitus) se recomienda disponer de una biopsia pre-implante para poder realizar una valoración adecuada de la progresión de las mismas.

Desde finales de la década de los 80 del siglo pasado distintos grupos de investigación se han dedicado a estudiar la presencia de lesiones agudas y crónicas en los injertos renales con función estable mediante la realización de biopsias con el objetivo de caracterizar la presencia de lesiones subclínicas (a estas biopsias se las ha llamado biopsias “de protocolo” o “de seguimiento”) ⁽³⁶⁾. Para monitorizar desde el punto de vista histológico al injerto renal algunos grupos incluyen en el seguimiento de los pacientes la realización de biopsias renales de protocolo con el objetivo de diagnosticar la presencia de rechazo agudo subclínico (celular y/o humoral) y valorar la progresión de las lesiones crónicas (glomerulosclerosis, glomerulopatía del trasplante, fibrosis intersticial/atrofia tubular, hialinosis arteriolar, vasculopatía del injerto).

Además, estas biopsias se han utilizado en diversos ensayos clínicos como variable de eficacia primaria o secundaria con el objetivo de evaluar los cambios morfológicos en trasplantes renales bajo distintas pautas de inmunosupresión ⁽³⁷⁾ ⁽³⁰⁾ ⁽³⁸⁾.

1.2.1. SEGURIDAD DE LA BIOPSIA DE SEGUIMIENTO.

La biopsia renal percutánea es un procedimiento diagnóstico utilizado desde 1944 y una herramienta fundamental para el conocimiento de la patología renal y como guía para la toma de decisiones en la práctica clínica ⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾. Tradicionalmente, este procedimiento ha requerido la hospitalización del paciente. Sin embargo, durante las dos últimas décadas la realización de la biopsia con aguja automática guiada mediante ecografía ha permitido disminuir las complicaciones graves (fallecimiento y/o pérdida del injerto) asociadas al procedimiento⁽⁴¹⁾ ⁽³¹⁾. Estos cambios han favorecido la ambulatorización de la biopsia de riñón nativo y del aloinjerto renal, convirtiéndola en un procedimiento seguro en una población seleccionada de pacientes ⁽⁴²⁾ ⁽⁴³⁾.

La implementación de un programa de biopsias ambulatorias mejora la calidad de vida del paciente minimizando su estancia hospitalaria. Además, se asocia a una disminución significativa del coste del procedimiento y a una menor lista de espera para su realización ⁽⁴⁴⁾.

La introducción de la punción mediante aguja automática guiada por ecografía ha convertido la biopsia del aloinjerto, ya sea diagnóstica o de seguimiento, en un procedimiento seguro ⁽⁴⁰⁾⁽¹⁵⁾ y el índice de complicaciones graves (fallecimiento del paciente o pérdida del injerto) descrito en distintas series es inferior al 1 % ⁽⁴⁵⁾ ⁽⁴²⁾ ⁽⁴⁶⁾.

En estudios retrospectivos de series de biopsias del injerto renal realizadas en receptores adultos y pediátricos, se ha evaluado la seguridad del procedimiento ambulatorio. En una de las revisiones más amplias con 1670 biopsias, Schwarz et al. mostraron que la biopsia del injerto realizada como procedimiento ambulatorio es segura y que no existen diferencias en el índice de complicaciones independientemente de su indicación (por causa clínica o de protocolo). Además, de acuerdo con otros autores, con la utilización de una aguja calibre 16 G es posible obtener el mismo perfil de seguridad y una mejor adecuación de la muestra para su valoración histológica⁽⁴²⁾. A pesar de no existir homogeneidad entre los distintos centros sobre los criterios de contraindicación para su realización como procedimiento ambulatorio y el tiempo de observación del paciente tras la realización de la biopsia para la monitorización de las complicaciones, los resultados obtenidos en distintas series (tabla 3) sugieren que un período ventana de entre 4 y 8 horas post-biopsia bajo

evaluación de signos vitales y monitorización urinaria, asociado o no a control analítico y/o ecográfico, es suficiente para observar una complicación de sangrado asociada al procedimiento ^{(43) (47) (48)}.

El éxito de la implementación de un programa ambulatorio de un procedimiento de baja o mediana complejidad se fundamenta en la disminución del tiempo de espera, así como en la eficiencia y la seguridad que pueda conseguir. Además, produce un beneficio al paciente, al percibir una mejor calidad de vida y atención, a los profesionales, al simplificarles el proceso clínico, y a la institución, al aumentar la eficiencia de los procesos y reducir los costes de hospitalización. Para ello es necesaria la coordinación entre distintas especialidades y un elevado grado de protocolización del proceso clínico aplicable a un grupo de pacientes que reúnan características similares de bajo riesgo. Todo esto permite asegurar una estancia mínima de observación y una baja tasa de hospitalización por complicaciones ⁽⁴³⁾⁽⁴⁹⁾.

1.2.2. INFLAMACIÓN SUBCLÍNICA EN INJERTOS ESTABLES.

Desde principios de la década de los 90 se describió la presencia de lesiones de rechazo agudo celular en las biopsias de protocolo realizadas en injertos con función estable, a esta alteración se la denominó como rechazo agudo subclínico ⁽⁵⁰⁾. Las características inmunológicas del receptor tales como el grado de sensibilización, el re-trasplante, el número de incompatibilidades HLA o la presencia de episodios previos de rechazo agudo así como el tratamiento inmunosupresor se asocian con la presencia de rechazo agudo subclínico. Estas alteraciones son más frecuentes durante los primeros meses post-trasplante y su prevalencia disminuye de forma progresiva a partir del 6^o mes. En cambio, la presencia de lesiones crónicas aumenta rápidamente durante el primer año para hacerlo más lentamente a partir de entonces ⁽⁵¹⁾. Durante los últimos años, la llegada de nuevas técnicas para determinar la presencia de anticuerpos anti-HLA (Luminex) ha permitido describir patrones morfológicos distintos en pacientes sin anticuerpos anti-HLA donante específicos (DSA) (bajo riesgo inmunológico) y en pacientes con anticuerpos anti-HLA donante específicos (alto riesgo inmunológico). Los pacientes con anticuerpos anti-HLA no donante-específicos parecen comportarse desde el punto de vista de los hallazgos histológicos de forma parecida a los pacientes sin anticuerpos anti-HLA, aunque en estos el riesgo de desarrollar anticuerpos anti-HLA donante-específicos parece ser mayor. En este punto es importante destacar las diferencias entre el rechazo subclínico celular (mediado por linfocitos T) y el rechazo subclínico humoral (mediado por anticuerpos). En el primer caso, observaremos las lesiones características del

rechazo celular (inflamación intersticial y tubulitis) mientras que en el segundo predominarán los cambios del rechazo humoral con inflamación en la microcirculación (glomerulitis y capilaritis peritubular con/sin depósitos de la fracción C4d del complemento).

1.2.2.1. **Incidencia y factores de riesgo.**

En los pacientes sin DSA en el momento de la biopsia, la lesión aguda predominante es la del rechazo celular mediado por células T. Desde el punto de vista morfológico se caracteriza por la presencia de inflamación intersticial (i) asociada a distintos grados de tubulitis (t). En 2/3 de los casos se alcanza el diagnóstico de cambios "borderline" ($\geq i0t1$; $< i2t2$) mientras que en 1/3 de los casos se alcanza el diagnóstico de rechazo agudo celular ($\geq i2t2$). En cambio, la presencia de rechazo agudo subclínico con endotelialitis ($v \geq 1$) es excepcional ⁽⁵²⁾.

En los pacientes con DSA en el momento de la biopsia de protocolo la lesión predominante es la presencia de inflamación de la microcirculación (glomerulitis y capilaritis peritubular) asociada en alrededor del 50% de los casos a depósitos de C4d en los capilares peritubulares. Las biopsias realizadas al año del trasplante muestran la persistencia de inflamación de la microcirculación, la aparición de glomerulopatía del trasplante y una aceleración en la progresión de la vasculopatía del injerto ⁽³⁰⁾⁽⁵³⁾⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾. La presencia de depósitos de C4d es variable entre los distintos estudios, 57% en las 157 biopsias realizadas a los 3 y 12 meses en 80 pacientes por parte del grupo de París ⁽⁵⁵⁾ y entre el 20-30% en las 200 biopsias realizadas a 50 pacientes con prueba cruzada positiva sometidos a tratamiento desensibilizador por el grupo de Baltimore ⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾. En los pacientes sometidos a tratamiento desensibilizador se ha mostrado que en las biopsias tomadas tras la reperusión del injerto, la presencia de depósitos de C4d en los capilares peritubulares es el mejor predictor del posterior desarrollo de rechazo mediado por anticuerpos ⁽⁵⁸⁾. A pesar de que la inflamación de la microcirculación presenta una mejor asociación con la presencia de DSA y el posterior desarrollo de glomerulopatía del trasplante que los depósitos de C4d ⁽⁵⁵⁾, no debe obviarse que la presencia de C4d como marcador de activación del complemento se ha mostrado como una variable altamente específica de fracaso tardío del injerto en biopsias por indicación ⁽⁵⁹⁾. El rechazo subclínico se ha asociado tanto a variables del donante como del receptor como se resume en la tabla 2 del anexo.

Variables del donante

La mayor parte de trabajos disponibles en la literatura se han realizado con trasplantes procedentes de donante cadáver, por lo cual la información con trasplante

renal procedente de donante vivo es menor. Para comparar las diferencias según el tipo de donante nos es útil una de las primeras descripciones que valoró una serie de 10 trasplantes procedentes de donante vivo HLA-idéntico y 31 trasplantes procedentes de donante cadáver. En este trabajo se observó que la prevalencia de rechazo subclínico a los 3 y 12 meses era inferior en los receptores de un injerto de donante vivo ⁽⁶⁰⁾. Una de las experiencias más amplias es la reportada por Choi y cols. ⁽⁶¹⁾ que muestra en una serie de 304 biopsias de protocolo (195 de donante vivo emparentado y 109 de donante vivo no emparentado) una baja prevalencia de rechazo subclínico, siendo ésta menor en los receptores de un trasplante procedente de un donante vivo emparentado que en las de un receptor de un donante vivo no emparentado (10% vs. 19%). Por otra parte, en una serie japonesa con un número inferior de biopsias (127 casos) no se pudo demostrar una diferencia significativa en la incidencia de rechazo subclínico entre el donante vivo y el cadavérico⁽¹⁹⁾. Recientemente, el grupo de Oslo ha confirmado estos datos en una serie con casi 600 pacientes con biopsia de protocolo en los que ha observado que tanto en las biopsias sin fibrosis como en las biopsias con fibrosis la proporción de donantes vivos no es distinta entre las biopsias que no presentan inflamación y las que sí la presentan (38.4 vs. 41.4% y 23.9 vs. 24.1%) ⁽²⁸⁾

Finalmente, el grupo de Sydney ha reportado una mayor incidencia de rechazo subclínico en los pacientes trasplantados con un injerto procedente de donante cadáver fallecido por accidente cerebro-vascular que en los fallecidos por traumatismo cráneo-encefálico ⁽⁶²⁾.

Hasta la actualidad, no se ha podido relacionar el rechazo subclínico con otros factores del donante como la edad y el género.

Variables del receptor

Dado que tanto la compatibilidad HLA, el re-trasplante y el grado de sensibilización evaluado mediante el porcentaje de anticuerpos frente al panel (PRA) se han relacionado con la aparición de rechazo agudo clínico, distintos grupos han valorado la asociación entre estas variables y el rechazo subclínico.

La relación entre compatibilidad HLA y cambios histológicos del injerto debe ser valorada en series con un número elevado de pacientes. Uno de los trabajos con una serie amplia de más de 300 casos ⁽¹⁷⁾ muestra una asociación entre compatibilidad HLA y rechazo subclínico. Así, la incidencia de rechazo subclínico pasa del 3% en los pacientes HLA-DR idénticos al 21% en los pacientes sin ninguna identidad HLA-DR. En un trabajo reciente, se ha confirmado que por cada incompatibilidad en locus DR se duplica el riesgo de presentar inflamación subclínica en la biopsia de protocolo ⁽²⁸⁾.

Aunque la necrosis tubular aguda se ha relacionado con la aparición de rechazo agudo clínico ⁽²²⁾, ninguna de las variables clínicas asociadas a la lesión de isquemia-reperfusión (edad del donante, tiempo de isquemia fría, requerimientos de diálisis post-trasplante) se ha relacionado con la presencia de rechazo subclínico.

Uno de los hallazgos más consistentes en la literatura es la estrecha relación entre la presencia de episodios de rechazo clínico y el rechazo subclínico. Los pacientes que han presentado episodios de rechazo clínico antes de la biopsia tienen más riesgo de presentar rechazo subclínico. Además, se ha relacionado el hallazgo de rechazo subclínico con la ulterior aparición de episodios de rechazo agudo clínico ⁽⁶³⁾.

El grupo de Sydney ha mostrado que la presencia de rechazo subclínico persistente está estrechamente ligado a la presencia de rechazo agudo clínico, ya que aparece en el 38% de los pacientes con rechazo clínico pero tan solo en el 8% de los pacientes sin rechazo clínico ⁽⁶⁴⁾.

Los trabajos del grupo de París ⁽⁶⁵⁾ han mostrado una estrecha asociación entre la existencia de DSA preformados al trasplante y la aparición de rechazo subclínico mediado por anticuerpos (ABMR). En la amplia serie de 1001 biopsias realizadas al año del trasplante, la incidencia de ABMR subclínico fue del 14.2% y en el 78% de los casos ya presentaban DSA al momento del trasplante. En cambio, en los pacientes que presentaban una biopsia renal sin rechazo el 14% presentaban DSA al trasplante y en los pacientes con rechazo subclínico mediado por células T (TCMR) tan solo el 9% presentaban DSA al trasplante. Cabe destacar que la intensidad de dichos anticuerpos medida como el MFI (median fluorescence intensity) máximo de los DSA fue superior en los pacientes con ABMR subclínico (2.500 vs. 1000). La presencia de DSA preformados se asocia con los eventos sensibilizadores (trasplante renal previo y sexo femenino). Estas variables no se asocian con el rechazo subclínico celular.

Factores genéticos y rechazo subclínico

Se ha sugerido que las características genéticas del donante y/o receptor pueden modular la respuesta inmune y por lo tanto la aparición de rechazo agudo, tanto clínico como subclínico. Para ello, se ha estudiado la existencia de relaciones entre distintos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que pueden modular la producción de diversas citoquinas y la aparición de rechazo agudo post-trasplante. En este sentido, se ha demostrado una asociación entre el polimorfismo del codón 10 del exón 1 del TGF β 1 (factor de crecimiento transformante β) y una mayor prevalencia de rechazo subclínico ⁽²³⁾ de forma independiente a otras variables clínicas. Por otra parte, el grupo de Winnipeg ha mostrado una asociación entre los polimorfismos de distintas

citoquinas como TGF β 1, interferon- γ , IL-10 (interleuquina 10) y TNF α (factor de necrosis tumoral- α) y los datos histológicos en biopsias de protocolo realizadas a los 6 meses ⁽²⁴⁾. Estos autores relacionan el polimorfismo del codón 25 del TGF β 1 con una menor inflamación sugiriendo que los altos productores de esta citoquina presentan menos rechazo subclínico. Por otra parte, los polimorfismos asociados con mayor producción de interferon- γ , IL-10 y TNF α se asocian con un peor pronóstico. Sin embargo, sería necesario demostrar que estos polimorfismos se asocian a la producción de las citoquinas que codifican para poder extraer resultados concluyentes. Es importante recordar que estudios epidemiológicos con gran número de pacientes no han sido capaces de detectar ninguna relación entre estos polimorfismos y la supervivencia del injerto ⁽²⁵⁾.

1.2.2.2. Influencia del tratamiento inmunosupresor.

La frecuencia y gravedad del rechazo subclínico celular se correlaciona de forma estrecha con el tratamiento inmunosupresor de mantenimiento. Durante las últimas décadas, con la llegada de pautas de inmunosupresión más potentes la prevalencia de esta lesión ha disminuido de forma progresiva. Cuando se realizaba tratamiento de mantenimiento con ciclosporina y azatioprina estas alteraciones estaban presentes en más del 50% de los injertos durante los primeros meses post-trasplante. Posteriormente, con las pautas basadas en ciclosporina A en microemulsión asociado con micofenolato mofetilo (MMF) se redujo al 30% y, finalmente, las pautas de tratamiento actuales basadas en la combinación de tacrolimus con MMF o i-mTOR presentan tasas de rechazo agudo subclínico durante el primer año inferiores al 15% ⁽⁶⁶⁾.

La información disponible con pautas de tratamiento libres de anticalcineurínicos es menor. En un grupo de pacientes que recibieron tratamiento de mantenimiento con MMF y corticoides la prevalencia fue superior al 50% ⁽²⁰⁾. Los estudios realizados con inhibidores de i-mTOR sin anticalcineurínicos han arrojado resultados contradictorios, probablemente en relación con la reducción progresiva de los niveles diana. En un estudio prospectivo, aleatorizado, comparando una pauta basada en tacrolimus, MMF y corticoides (n=84) con una pauta basada en sirolimus, MMF y corticoides (n=81), la prevalencia de episodios de rechazo agudo clínico y subclínico durante el primer año no fue distinta (14% vs. 18%) entre ambas ramas de tratamiento ⁽²¹⁾. En cambio, en un subestudio del ensayo clínico CONCEPT (los pacientes fueron aleatorizados a los 3 meses a una pauta basada en sirolimus, MMF y corticoides o a seguir con ciclosporina, MMF y corticoides), las biopsias de protocolo al

año mostraron una mayor prevalencia de cambios borderline (16.2% vs. 5.1%) y de rechazo subclínico (29% vs. 10.2%) en los pacientes convertidos a sirolimus⁽²²⁾. Sin embargo, el inmunofenotipo de este infiltrado intersticial es distinto bajo distintas pautas de tratamiento y se ha postulado que en los pacientes tratados con sirolimus los infiltrados intersticiales ricos en células T reguladoras pueden tener un efecto protector sobre la disfunción crónica del injerto⁽²³⁾.

Hasta la actualidad no se dispone de información sobre si la exposición a los inmunosupresores (dosis y/o niveles de tacrolimus y/o MMF) se asocia con la presencia de inflamación subclínica.

1.2.2.3. Implicación sobre el pronóstico.

Se han llevado a cabo distintos trabajos con largas series de casos con seguimiento superior a los 10 años para evaluar si existe alguna relación entre los hallazgos en las biopsias de protocolo realizadas durante el primer año y el pronóstico del injerto. Estos estudios tienen diversas limitaciones entre las que cabe destacar los cambios en las pautas de tratamiento a lo largo del tiempo así como los cambios introducidos en el seguimiento post-trasplante, especialmente la introducción de las nuevas técnicas para detectar anticuerpos anti-HLA. En los trabajos publicados hasta 2010, no se disponía de la determinación de anticuerpos anti-HLA por técnica de Luminex, por lo cual no es posible diferenciar el rechazo subclínico mediado por células T (TCMR) del rechazo subclínico mediado por anticuerpos (ABMR).

En general, se puede afirmar que la presencia de episodios de rechazo agudo subclínico celular se ha asociado con la aparición de DSA *de novo*, con el desarrollo de rechazo crónico mediado por anticuerpos y con el fracaso tardío del injerto⁽⁶⁷⁾ ⁽⁶⁸⁾ ⁽³³⁾. En un estudio que incluyó 315 pacientes sin anticuerpos anti-HLA pre-trasplante, 47 desarrollaron DSA a los 4.6 años y la aparición de DSA se asoció con el número de incompatibilidades HLA, especialmente de clase II, con los episodios de rechazo clínico y subclínico y con la no adherencia al tratamiento inmunosupresor⁽⁶⁹⁾. Los pacientes con DSA presentaron una supervivencia a los 10 años muy inferior a los que no desarrollaron DSA (95% vs. 50%). En otro estudio⁽⁷⁰⁾ se revisaron más de 500 pacientes con una biopsia de protocolo durante los primeros 6 meses post-trasplante y en 109 de ellos se disponía de una biopsia tardía por disfunción realizada a los 7 años del trasplante. En los pacientes que presentaban rechazo crónico mediado por anticuerpos en la biopsia tardía (n=44), la presencia de rechazo subclínico en la biopsia de protocolo fue el doble de frecuente que en los pacientes que presentaban FI/AT (n=42) en la biopsia tardía (52.3% vs. 28.6%). En este estudio, los pacientes con

rechazo crónico presentaron una supervivencia del injerto inferior que los pacientes con FI/AT (58% vs. 21% a los 20 años del trasplante).

Recientemente, uno de los estudios con mayor tamaño de la muestra ha sido realizado por el grupo de París, en el que evaluaron 1001 biopsias de seguimiento realizadas al año del trasplante. En este estudio, 727 casos (72.7%) no presentaban signos de rechazo en la biopsia, 132 presentaban TCMR subclínico (13.2%) y 142 casos (14.2%) presentaban ABMR subclínico. La supervivencia del injerto a los 8 años fue del 90%, 88% y 56%, respectivamente. Es decir, la supervivencia de los injertos con TCMR no fue distinta de la de los pacientes que no presentaban rechazo subclínico al año del trasplante. Sin embargo, observaron que los pacientes que presentaban TCMR tenían peor pronóstico si desarrollaban DSA a lo largo del seguimiento. De hecho, la probabilidad (condicional a tener una biopsia de protocolo al año) de presentar glomerulopatía del trasplante a los 1000 días del trasplante fue del 12% en los pacientes sin rechazo subclínico, del 22% en los pacientes con TCMR subclínico y del 54% en los pacientes con ABMR subclínico ⁽⁶⁵⁾.

Finalmente, el grupo de la Clínica Mayo analizó en una serie de 1465 trasplantes renales realizados entre 1999 y 2008 si los datos derivados de la biopsia de protocolo al año y la presencia de DSA añadían capacidad predictiva sobre el fracaso del injerto a los 5 años ⁽⁷¹⁾. En esta cohorte, analizaron la capacidad predictiva del modelo de riesgo de Birmingham ⁽⁷²⁾ que incluye los siguientes datos al año: edad, sexo, raza, función renal, proteinuria y antecedente de rechazo agudo. Este modelo predice la supervivencia del injerto global tanto censurando la muerte del paciente como la supervivencia global (estadístico $c=0.84$ y 0.78 , respectivamente). La presencia de glomerulitis o fibrosis intersticial (g y ci scores de Banff) en la biopsia renal al año se asociaron con la pérdida del injerto a 5 años. La adición de estas variables mejora la capacidad predictiva sobre la supervivencia del injerto censurando la muerte a los 5 años (estadístico $c=0.90$), mejora la calibración del modelo (capacidad de modificar el riesgo de alto a bajo) y permite reclasificar el riesgo de fracaso del 29% de pacientes. En cambio, la adición de la presencia de DSA al año no mejora el poder predictivo o la reclasificación, pero mejora ligeramente la calibración del modelo.

1.2.2.4. Tratamiento de la inflamación subclínica

Durante las década de los 90 la introducción del diagnóstico de rechazo subclínico y sus potenciales efectos deletéreos a largo plazo condujo a que se realizara el primer ensayo clínico, prospectivo, aleatorizado, para evaluar si el

diagnóstico y tratamiento del rechazo subclínico durante los primeros meses post-trasplante contribuía a disminuir la progresión de las lesiones crónicas y la disfunción del injerto. Un grupo de 36 pacientes aleatorizados a ser biopsiados a los 0, 1, 2, 3 y 6 meses post-trasplante y a recibir tratamiento con pulsos de corticoides si presentaban rechazo subclínico se comparó con un grupo de 36 pacientes al que solo se le realizó biopsia a los 0 y 6 meses. Los pacientes del grupo experimental presentaron una menor progresión de las lesiones crónicas en la biopsia a los 6 meses y una mejor función renal a los 2 años ⁽⁷³⁾. En este estudio los pacientes recibieron tratamiento de mantenimiento con ciclosporina, azatioprina y corticoides y la prevalencia de rechazo subclínico fue superior al 30% durante los primeros meses. Posteriormente, el mismo grupo lideró un ensayo clínico similar en pacientes tratados con tacrolimus, MMF y corticoides. En este caso un grupo de 121 pacientes fue aleatorizado a biopsia a los 0, 1, 2, 3 y 6 meses y recibió tratamiento con pulsos de corticoides si presentaban rechazo subclínico y se comparó con un grupo de 119 pacientes a los que se realizó biopsia a los 0 y 6 meses. En este estudio la prevalencia de rechazo subclínico en el grupo experimental fue muy baja (4.6%) y no se pudo demostrar ningún beneficio a los 6 meses en la biopsia del injerto ni en la función renal en el grupo experimental ⁽⁷⁴⁾. Posteriormente, se publicaron los resultados de otro ensayo clínico en el que 52 pacientes fueron aleatorizados a realizar biopsia a los 1 y 3 meses y 50 pacientes actuaron como grupo control ⁽⁷⁵⁾. En este estudio los pacientes recibieron tratamiento de mantenimiento con ciclosporina asociada a MMF o azatioprina y, por lo tanto, la prevalencia de rechazo subclínico fue más elevada (cambios borderline 11.5% y 14% y rechazo subclínico 17.3% y 12%, a los 1 y 3 meses, respectivamente). En este ensayo clínico el tratamiento con pulsos de corticoides a los pacientes con rechazo subclínico y el ajuste de los niveles de ciclosporina a los pacientes con cambios borderline, se asoció a una mejor función renal a los 12 meses (creatinina sérica 1.20 ± 0.33 vs. 1.52 ± 0.41 mg/dL).

Algunos autores han sugerido que la monitorización del injerto durante los primeros meses post-trasplante para detectar o descartar la presencia de rechazo subclínico puede contribuir a individualizar el manejo de los pacientes. Así, en los pacientes a los que se diagnostica y trata de episodios de rechazo subclínico habría que monitorizarlos con biopsias más seguidas y, en cambio, los pacientes con biopsias sin rechazo se podrían beneficiar de reducciones de la inmunosupresión realizando biopsias más espaciadamente ⁽⁶³⁾. Parece evidente que para incluir estos conceptos en práctica clínica harían falta ensayos clínicos de difícil diseño.

Existe consenso en la literatura que el rechazo subclínico mediado por anticuerpos se asocia a un efecto deletéreo sobre la supervivencia del injerto. Sin embargo, hasta la actualidad no se han publicado resultados de ensayos clínicos prospectivos, aleatorizados para evaluar los potenciales beneficios de su tratamiento. Los tratamientos disponibles hasta la actualidad para el tratamiento del rechazo agudo mediado por anticuerpos o para desensibilizar a los pacientes con anticuerpos preformados (eliminación de anticuerpos mediante plasmaféresis o inmunoadsorción, inmunoglobulinas intravenosas, anticuerpos anti-linfocitos B, inhibidores del proteasoma como Bortezomib o inhibidores del complemento como Eculizumab) no han sido testados en ensayos clínicos ⁽⁵⁷⁾.

1.2.3. PROGRESIÓN DEL DAÑO CRÓNICO EN INJERTOS ESTABLES

Durante el primer año post-trasplante se produce un aumento progresivo de las lesiones crónicas, especialmente fibrosis intersticial / atrofia tubular (FI/AT), mientras que la progresión de la glomerulosclerosis y las lesiones vasculares es más lenta y tardía ⁽⁵¹⁾. Ha sido motivo de distintos trabajos evaluar la contribución de la respuesta inmune y la nefrotoxicidad por anticalcineurínicos en la progresión de estas lesiones crónicas. En un estudio que incluyó 256 pacientes tratados con tacrolimus, MMF y retirada rápida de corticoides, se demuestra en las biopsias realizadas durante los primeros 4 meses que la presencia de cambios borderline y de rechazo agudo subclínico (50 y 19 casos respectivamente) se asocia con una mayor proporción de cambios de IF/TA moderada en la biopsia de protocolo al año (15% en los casos sin rechazo subclínico, 34% en los casos con cambios borderline y 53% en los casos con rechazo subclínico)⁽⁷⁶⁾. Sin embargo, en la progresión de las lesiones de FI/AT también contribuye de forma significativa el tratamiento con anticalcineurínicos. Se ha demostrado en diversos ensayos clínicos que las pautas de tratamiento libres de anticalcineurínicos, bien sea basadas en i-mTOR o en belatacept, se asocian a una menor progresión de la FI/AT que las pautas basadas en ciclosporina ^{(77) (78) (79)}. En cambio, este beneficio no se pudo demostrar en un ensayo clínico que comparó pacientes tratados con tacrolimus, MMF y corticoides con pacientes tratados con sirolimus, MMF y corticoides, en el que tan solo se observó una menor progresión del engrosamiento vascular intimal en los pacientes tratados con sirolimus (80). A pesar de estos resultados que sugieren una menor nefrotoxicidad de tacrolimus que de ciclosporina, la progresión de las lesiones de FI/AT al año del trasplante no fue distinta en un ensayo clínico que comparó pacientes tratados con tacrolimus (n=97) o con ciclosporina (n=94), aunque la prevalencia de rechazo subclínico a los 6 meses se

redujo a la mitad con tacrolimus (38.8% vs 15.2%) ⁽⁸¹⁾. Por otra parte, en un estudio con biopsias seriadas realizadas durante el primer año se demuestra que los pacientes que se han mantenido con niveles más elevados de tacrolimus (>12 ng/mL) presentan una menor progresión de las lesiones crónicas ⁽⁸²⁾, sugiriendo que un buen control de la respuesta inmune reduce la progresión de las lesiones de FI/AT. Finalmente, en otro ensayo clínico se mostró que la combinación de tacrolimus con sirolimus (n=50) es más potente que tacrolimus con MMF (n=50) o ciclosporina con sirolimus (n=50) o MMF (n=50), ya que se asocia a la menor prevalencia de rechazo subclínico durante el primer año (<10%) y a una menor prevalencia de lesiones crónicas a los 5 años ⁽⁸³⁾. Además, se ha descrito que existe una interacción entre las lesiones preexistentes en el donante y el régimen de tratamiento. Así, en los injertos sin lesiones preexistentes la combinación tacrolimus, sirolimus y corticoides se acompaña de una menor progresión de la FI/AT; pero, en cambio, en injertos con lesiones pre-existentes la combinación tacrolimus, MMF y corticoides se asocia a una menor progresión ⁽⁸⁴⁾. Por lo tanto, el impacto que tiene el tratamiento con anticalcineurínicos en la progresión de las lesiones crónicas es difícil de interpretar. En un estudio con biopsias de protocolo a 3, 24 y 120 meses se observó que los pacientes tratados con ciclosporina (n=48) presentan una mayor progresión de las lesiones crónicas (glomerulosclerosis, fibrosis intersticial, atrofia tubular, engrosamiento intimal y hialinosis arteriolas) que los pacientes sin anticalcineurínicos (n=93); aunque ninguna de estas lesiones es específica ⁽⁶⁷⁾, ni tan solo los depósitos hialinos en la capa muscular de las arteriolas (68% en los tratados con ciclosporina vs. 28% en los no tratados).

Por lo tanto, podemos concluir que durante el primer año distintos insultos contribuyen a la progresión de la FI/AT, tanto el rechazo subclínico como el tratamiento con anticalcineurínicos, y a día de hoy todavía no sabemos qué pauta de tratamiento es mejor debido a la interacción entre las distintas variables. Sin embargo, debe destacarse que en pacientes de bajo riesgo inmunológico la progresión de la FI/AT entre el 1º y 5º año post-trasplante es leve con las pautas de inmunosupresión actuales basadas en tacrolimus y/o i-mTOR ⁽⁶⁸⁾.

1.2.4. INFLAMACIÓN SUBCLÍNICA Y DSA DE NOVO

Durante la última década se ha incorporado de forma progresiva la monitorización de anticuerpos anti-HLA durante el periodo post-trasplante. Desde que se dispone de las nuevas técnicas de Luminex® para la determinación de anticuerpos

anti-HLA se ha caracterizado la proporción de pacientes que desarrollan DSA *de novo*. En diversas series se ha demostrado que entre el 2 y el 20% de los pacientes desarrollarán DSA durante el primer año post-trasplante. Hasta la actualidad, en pocos estudios se ha evaluado la relación entre inflamación subclínica en las biopsias de protocolo y el desarrollo de DSA *de novo*. En la serie de 315 casos reportada por Wiebe C y cols ⁽⁶⁹⁾, se detectaron DSA *de novo* en 47 casos (15%) a los 4.6 ± 3.0 años del trasplante. A pesar de que la incidencia de rechazo subclínico (cambios borderline o TCMR) durante los primeros 6 meses fue superior en el grupo de pacientes que desarrolló DSA *de novo*, la diferencia no alcanzó significación estadística (26% vs. 15%; $p=0.10$). En cambio, se observó una asociación entre incidencia de rechazo clínico y la aparición de DSA *de novo* (28% vs. 13%; $p=0.015$). En el estudio reportado por el grupo de Oslo, con casi 600 biopsias de protocolo a las 6 semanas, se detectó la presencia de DSA en 53 casos (8.9%) al año del trasplante. Los factores de riesgo para el desarrollo de DSA fueron la presencia de inflamación subclínica ($[i+t] \geq 2$) tanto asociada como no asociada a fibrosis intersticial en la biopsia renal de protocolo a las 6 semanas (odds ratio [OR]: 5.49; intervalo confianza 95% [IC 95%]: 1.67-18.03 y OR: 4.09; 95% CI: 1.67-10.0; respectivamente) además del número de incompatibilidades HLA (OR: 1.95; IC 95%: 1.09-3.49). Finalmente, en la serie de 515 biopsias de protocolo a los 3-6 meses del trasplante reportadas por el grupo del Hospital de Bellvitge, se observó que la presencia de rechazo subclínico en la biopsia de protocolo precoz se asociaba al desarrollo de DSA y ABMR crónico (riesgo relativo: 2.52; IC 95%: 1.1– 6.3) ⁽⁷⁰⁾.

1.3. MONITORIZACIÓN INMUNOLÓGICA POST-TRASPLANTE

El trasplante de un aloinjerto se acompaña de la puesta en marcha de una respuesta compleja por parte del sistema inmune del receptor dirigida al reconocimiento del injerto “no propio” y en la que participan tanto la inmunidad innata como la inmunidad adquirida mediada por linfocitos T y mediada por anticuerpos. El objetivo del tratamiento inmunosupresor es conseguir un estado de tolerancia frente al injerto mientras que se preserve el estado de vigilancia inmunológica frente a infecciones y neoplasias. Desafortunadamente, este estado de tolerancia inmunológica es excepcional en trasplante renal y, en la actualidad, no disponemos de abordajes para alcanzarla. Por lo tanto, es necesario disponer de herramientas que nos permitan monitorizar desde el punto vista inmunológico al paciente y al injerto. Se han desarrollado diversas técnicas para monitorizar el estado global de inmunosupresión (Inmuknow®) ⁽⁸⁵⁾, la respuesta de células T y B de memoria donante-específica mediante ELISPOT ^{(86) (87) (88)} o la expresión génica de diversos marcadores relacionados con alorespuesta ^{(89) (90) (91)}, entre otros. Sin embargo, la única técnica que se ha incorporado a la práctica clínica desde los inicios del trasplante es la monitorización de anticuerpos anti-HLA.

1.3.1. ANTICUERPOS ANTI-HLA

Existen diversos métodos para detectar en el suero del receptor la presencia de anticuerpos contra los antígenos HLA expresados por las células del donante. Para demostrar la presencia de estos anticuerpos se han desarrollado durante las últimas décadas diversas técnicas, pasando de las más antiguas que eran muy específicas pero poco sensibles a las más modernas que son más sensibles pero menos específicas. Describimos aquí las técnicas más utilizadas:

1. Microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento (CDC)

En esta técnica, ampliamente conocida y clásicamente utilizada en los laboratorios de histocompatibilidad, se emplea un panel de linfocitos viables (alrededor de 60) con un fenotipo HLA conocido representativo de la población general, que se añaden en cada uno de los pocillos de una placa de Terasaki. Esta prueba no sólo determina la especificidad de los anticuerpos sino también el grado de reacción, lo que se conoce como %PRA (porcentaje de anticuerpos reactivos contra el panel), que representa el número de células del panel que reaccionan con el suero y permite

estimar la probabilidad de ser compatible con un potencial donante. Esta prueba presenta una elevada especificidad sobre el riesgo de rechazo mediado por anticuerpos, aunque es muy poco sensible. Una de sus ventajas es que permiten detectar anticuerpos con capacidad de fijar el complemento (de ahí su gran especificidad), pero no es capaz de detectar bajas concentraciones de anticuerpos o anticuerpos que no fijan el complemento (de ahí su baja sensibilidad). En la figura 2 se explica gráficamente como se realiza la prueba.

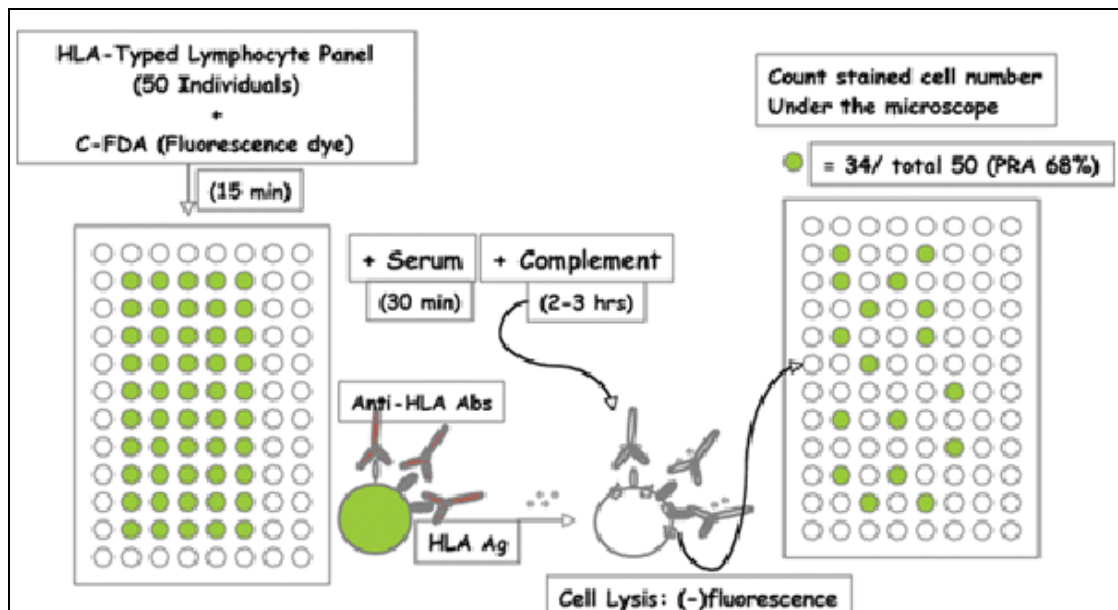


Figura 2. Ensayo de microlinfocitotoxicidad.

2. Citometría de flujo

La citometría de flujo detecta la presencia de anticuerpos anti-HLA mediante el uso de anticuerpos frente a inmunoglobulinas humanas conjugadas a fluorocromos, sin necesidad de que el complemento se fije. El empleo de fluorescencia es lo que hace esta técnica mucho más sensible que la CDC clásica. En un principio este método utilizaba, como en la CDC, un panel de linfocitos T (clase I) y B (clase II). Sin embargo, de este modo pueden detectarse autoanticuerpos dirigidos frente a otros antígenos distintos del HLA presente en esos linfocitos. Además, esta técnica depende de la disponibilidad de los linfocitos con las especificidades HLA deseadas. Para evitarlo, se ha ideado un sistema con micropartículas que llevan pegadas en su superficie moléculas de HLA-I y HLA-II. De este modo, se puede realizar la combinación de antígenos HLA que se desee y determinar la especificidad en un solo tubo. En ese tubo se incubarían las micropartículas con el suero a estudio y tras los lavados pertinentes se añadiría un anticuerpo anti-IgG humana conjugado a

fluorocromos. La presencia del anticuerpo se objetiva en el citómetro de flujo al incidir sobre la muestra un haz de láser, el cual excita el fluorocromo que va conjugado al anticuerpo y emite luz a una determinada longitud de onda. Esta señal luminosa se capta por unos detectores y un complejo sistema informático es capaz de transformar el mensaje luminoso al lenguaje informático, el cual se puede interpretar mediante el empleo de un software adecuado. En principio, se puede emplear cualquier citómetro de flujo disponible en el mercado. Posteriormente, se ha adaptado un sistema de citometría de flujo de cribado múltiple que consiste en un panel de micropartículas coloreadas cubiertas con antígenos HLA-I y -II. Se trata de la tecnología de nominada Luminex®, mediante la que se pueden realizar hasta 100 combinaciones de antígenos en una sola suspensión y un mismo ensayo de forma semiautomática. Una gran ventaja de la citometría de flujo es que permite cuantificar objetivamente la concentración de los anticuerpo anti-HLA mediante la intensidad media de fluorescencia que alcanza el suero (mean fluorescence intensity, MFI). En una monitorización post-trasplante, no sólo la presencia de anticuerpo, sino las variaciones de la MFI podrían servir teóricamente de marcador de la evolución del paciente y su injerto. Otra forma de medir la intensidad de la reacción es determinando el porcentaje de PRA a partir del porcentaje de células positivas para los Ac anti-HLA de clase I o de clase II. El último adelanto metodológico de la citometría de flujo, que ofrece un abanico muy amplio e ilimitado de antígenos HLA, es el empleo de antígenos únicos recombinantes. En función de donde se marca el umbral de fluorescencia a partir del cual se considera positiva la prueba, se obtendrán más antígenos prohibidos (prueba cruzada virtual). En la figura 3 se explica gráficamente como se realiza la prueba.

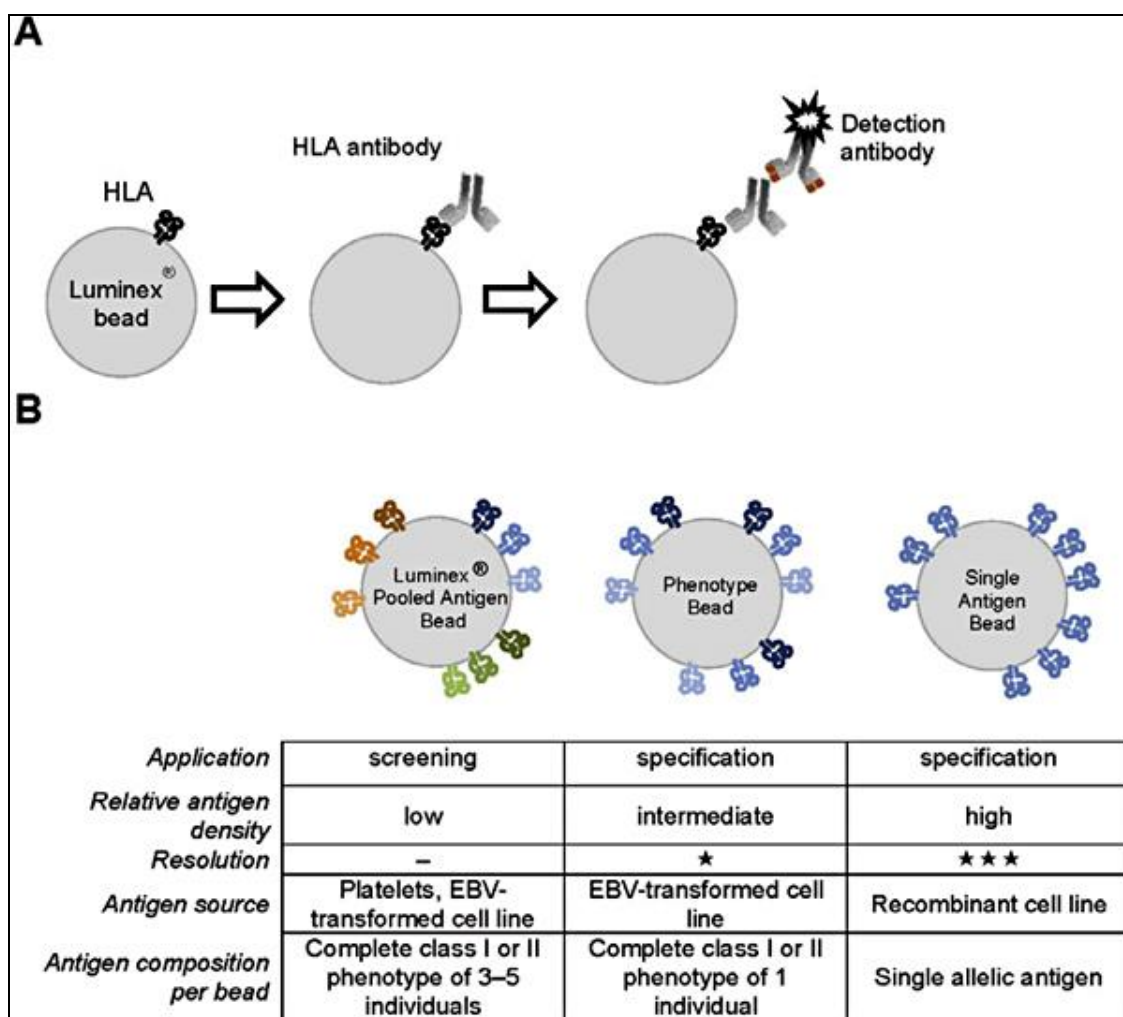


Figura 3. Estudio de la sensibilización HLA mediante técnicas de citometría de flujo.

3. Monitorización anticuerpos anti-HLA post-trasplante

En el trasplante renal la importancia de los anticuerpos anti-HLA dirigidos frente al donante se demostró hace casi 50 años cuando Patel y Terasaki mostraron las consecuencias de trasplantarse con una prueba cruzada positiva ⁽¹¹⁾. El impacto de los DSA pre-trasplante en la supervivencia del injerto ha sido bien descrito en la literatura y caracterizar a los pacientes en función de su riesgo inmunológico basándonos en la presencia de anticuerpos anti-HLA circulantes ha sido la práctica habitual de las unidades de trasplante. Sin embargo, a pesar de que se ha sugerido la importancia de los anticuerpos formados post-trasplante desde hace décadas ⁽⁹²⁾, ya que diversos estudios muestran una relación entre la detección precoz de DSA y la existencia de rechazo agudo ^{(93) (40) (10)}, su monitorización a medio y largo plazo no ha sido extendida

ni protocolizada hasta muy recientemente. Este hecho puede relacionarse con el peso del rechazo agudo celular en las primeras épocas, la falta de técnicas sensibles, específicas y coste-efectivas para su determinación y la ausencia de tratamientos específicos contra el daño humoral crónico.

Con el desarrollo de las técnicas de fase sólida para la determinación de anticuerpos en suero, hemos asistido a una importante expansión de la investigación en este campo: desde la descripción de la simple existencia de estos anticuerpos *de novo* y su potencial impacto en el injerto renal, hasta las tendencias más actuales que intentan determinar cuáles de estos anticuerpos son realmente determinantes de la disfunción renal. Los DSA dirigidos frente a antígenos del donante más estudiados son los anticuerpos anti-HLA, que pueden estar presentes pre-trasplante o aparecer *de novo* en cualquier momento tras el trasplante. Para que estos DSA puedan considerarse *de novo* es importante disponer de un estudio pre-trasplante adecuado, con técnicas suficientemente sensibles. En la era de detección de anticuerpos mediante técnicas basadas en la citotoxicidad, pasaban desapercibidos DSA presentes en el momento del trasplante. Desde la generalización del uso de técnicas de fase sólida para la detección de anticuerpos anti-HLA, varios trabajos han documentado la incidencia de aparición de estos anticuerpos *de novo* post-trasplante^{(94) (95)}. La variabilidad en la incidencia de DSA *de novo* (del 2% hasta el 20% en el primer año post-trasplante) depende de diversos factores, como el riesgo inmunológico del paciente, el tipo de inmunosupresión recibida, la frecuencia de monitorización pre-trasplante, la técnica de detección (diversos kits comerciales, procedimientos diferentes entre laboratorios), el punto de corte en la intensidad media de fluorescencia (MFI) escogido para definirlo como DSA, el tipo de valor empleado para su valoración (MFI crudo o normalizado) o los antígenos conocidos del donante (tipaje C, DQ-B, DQ-A y DP incluidos). Si se define como DSA pre-trasplante el que se presenta en estudio de antígeno aislado con un título de MFI superior a 1000, por ejemplo, la aparición de DSA *de novo* puede ser muy precoz debido a una respuesta de células B de memoria ante un antígeno conocido al haber infravalorado anticuerpos con MFI bajos^{(96) (97) (98) (99)}. Sin embargo, si se definen los DSA pre-trasplante con MFI bajos, como 500, la aparición de DSA *de novo* será menos frecuente y más tardía⁽⁶⁹⁾. En pacientes de bajo riesgo inmunológico y con terapia inmunosupresora consistente en tacrolimus, ácido micofenólico y esteroides, la incidencia de aparición de DSA *de novo* es del 2-10% al año. Aunque la cinética de aparición es variable, pueden

detectarse desde el primer año post-trasplante, y los más frecuentes son de clase II, especialmente frente a locus DQ ⁽⁹⁷⁾.

Los factores más frecuentemente asociados a la aparición de DSA *de novo*, son el número de incompatibilidades HLA entre donante y receptor (especialmente en clase II)^{(69) (100) (98)}, los episodios de rechazo agudo tanto clínico como subclínico ^{(101) (65) (102) (94)}, el retrasplante ⁽¹⁰³⁾, la no adherencia al tratamiento ⁽⁶⁹⁾, la edad joven, y el sexo femenino ^{(98) (100) (101)}. Los episodios de rechazo agudo celular (clínico o subclínico) pueden modificar la expresión de antígenos HLA por parte de las células endoteliales y potencialmente condicionar la activación T-dependiente de las células B para la producción de anticuerpos.

El gran avance que ha supuesto el desarrollo de las técnicas de fase sólida para mejorar la determinación y caracterización de los anticuerpos anti-HLA tanto pre como post-trasplante, ha dado paso a estudios cuyo objetivo es determinar cuáles son los anticuerpos con capacidad patogénica. Diversos estudios han analizado la capacidad de los anticuerpos anti-HLA de fijar complemento en plataforma Luminex, tanto pre como post-trasplante, para relacionarla con resultados del trasplante (rechazo, supervivencia, etc.). Se han utilizado para ello diversas técnicas: el test de fijación de C4d en muestras pre-trasplante (104), el test de C1q (105), y el test de C3d ⁽¹⁰⁶⁾. En líneas generales, la capacidad de fijar complemento de los anticuerpos anti-HLA *de novo* post-trasplante se asocia a mayor capacidad patogénica de los mismos. El estudio más importante describe una cohorte de más 1000 pacientes en la que los que desarrollaron DSA al año del trasplante presentaron una supervivencia del injerto inferior en comparación con aquellos que no (54% vs 93% a 5 años, respectivamente) 51. Sin embargo, este hecho solo se confirmaba si los DSA eran capaces de fijar complemento (C1q), con un riesgo casi cinco veces superior de pérdida del injerto en el análisis multivariante. Los pacientes que presentaban peor supervivencia del injerto son aquellos con DSA C1q negativos en el pre-trasplante que se convierten en C1q positivos en el post-trasplante y los que presentaban MFI más elevados son los que presentaban mayor capacidad de fijar complemento. Además de asociarse a peor supervivencia del injerto, la presencia de DSA C1q positivos se asoció a mayor incidencia de rechazo agudo, inflamación microvascular y depósito de C4d 51. Otros trabajos han reproducido estos hallazgos en cohortes de pacientes más limitadas^{(107) (108)}.

Finalmente, otra característica asociada a la capacidad de fijar complemento y, por tanto, determinante de la patogenicidad de los anticuerpos es el subtipo de inmunoglobulina. Existen 4 subclases de IgG, con distinta capacidad de activar complemento; la IgG1 y la IgG3 son más potentes que las IgG2 e IgG4. Los DSA *de novo* IgG1 e IgG3 se han asociado a una peor supervivencia del injerto renal ⁽¹⁰⁹⁾ ⁽¹¹⁰⁾ ⁽¹¹¹⁾, aunque también existen otros trabajos que han relacionado los DSA isotipo IgM 58 o subclase IgG 4⁽¹¹²⁾ con rechazo mediado por anticuerpos y fracaso del injerto. En el mejor de estos estudios, el tipo de DSA IgG3, el nivel de MFI y la capacidad de fijar C1q se asociaron en un modelo multivariante a pérdida del injerto⁽¹⁰³⁾.

1.3.2. SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

La cuantificación de distintas subpoblaciones linfocitarias mediante técnicas de citometría de flujo se ha asociado tras el trasplante tanto con la aparición de episodios de rechazo agudo como con la aparición de infecciones. Tras el trasplante, el riesgo de rechazo mediado por células T (TCMR) está modulado por las características biológicas del donante y del receptor. En este último, la retención de toxinas urémicas y citoquinas asociada a la enfermedad renal crónica conduce a un estado de senescencia inmunológica que se caracteriza por linfopenia de células T y una mayor diferenciación de células T con aumento de las células T de memoria y disminución de las células T naïve que comportan una disfunción de la respuesta mediada por linfocitos T ⁽¹¹³⁾ ⁽¹¹⁴⁾. En el donante, el período de agonía y la muerte cerebral se asocian a un estado inflamatorio con infiltración de macrófagos, daño endotelial y expresión de antígenos por las células tubulares renales que aumentan la inmunogenicidad del injerto, el riesgo de retraso en la función del injerto y la aparición de episodios de TCMR. Este estado de senescencia inmunológica asociado a la enfermedad renal crónica va a favorecer la aparición de infecciones bacterianas y virales y podría asociarse a un menor riesgo de rechazo agudo⁽¹¹⁵⁾. Tras el trasplante, el tratamiento inmunosupresor de mantenimiento modula la respuesta inmune modificando la diferenciación y proliferación de los distintos subtipos de linfocitos circulantes. El rechazo agudo se desarrolla cuando los alo-antígenos del donante presentados por las células presentadoras de antígeno (CPAs) a través de las moléculas HLA de clase I y clase II activan la respuesta inmune contra el injerto. Esta respuesta conduce a una activación de las células T naïve que se diferenciarán en distintas subpoblaciones incluyendo linfocitos T citotóxicos (CD8), linfocitos T cooperadores (CD4); tanto Th1, Th2 como Th17; o en células inmunoreguladoras

Treg. La respuesta inmune contra el injerto renal se caracteriza por un componente reactivo contra el injerto mediado por linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos y un componente protector mediado por linfocitos T reguladores. El balance entre estos dos componentes de la respuesta inmune puede afectar de forma significativa la supervivencia del injerto y es, en parte, modulado por el tratamiento inmunosupresor. Tanto tacrolimus como MMF muestran un efecto similar sobre la respuesta mediada por células T, modificando la transcripción de genes Th1 y preservando los fenotipos moleculares de la respuesta mediada por células Th2/Treg. Aunque ambos fármacos atenúan la respuesta mediada por linfocitos Th17 tras la activación de los linfocitos T, MMF ejerce un efecto inhibitor más potente sobre dicha respuesta. Así pues, se ha propuesto que la combinación tacrolimus/MMF favorece un balance adecuado de la respuesta inmune y ofrece una protección óptima del injerto. Además, en los protocolos de tratamiento basados en la minimización de tacrolimus, MMF puede contribuir a un mejor control de la alorespuesta mediada por células Th17 (116).

Finalmente, a largo plazo también se producen modificaciones en las subpoblaciones celulares circulantes. Así, el estado de tolerancia operacional en receptores de trasplante renal se ha relacionado con la sobre-expresión de genes relacionados con células B y se ha descrito un aumento de los linfocitos B naïve y linfocitos B de transición en la circulación periférica. No ha sido bien descrito hasta la actualidad como se modifica esta respuesta bajo distintos regímenes de tratamiento (117).

1.4. ESTUDIO DEL FENOTIPO MOLECULAR EN BIOPSIAS RENALES

A principios de este siglo se completó el Proyecto Genoma Humano, que demostró que nuestro genoma comprende alrededor de 30.000 genes, y se abrió la puerta para desarrollar nuevas posibilidades en el conocimiento de la fisiopatología humana. No solo el número de genes, sino la forma en que están distribuidos en el genoma, la presencia de variantes alélicas o de elementos repetitivos, las duplicaciones de genes o la metilación de secuencias reguladoras añaden gran complejidad a la interpretación del genoma. Además, a nivel transcripcional y post-transcripcional encontramos splicing alternativos, edición del RNA, fosforilaciones, acetilaciones, etc, que aportan diversidad a las proteínas. Los conocimientos derivados de la genómica (estudio del genoma en su conjunto), la transcriptómica (conjunto de transcritos que se expresan en su conjunto) y la proteómica (estudio de las proteínas que se expresan en un momento determinado), han contribuido a tener un mejor conocimiento de las bases moleculares del rechazo agudo y crónico del injerto. La introducción de técnicas de biología molecular mediante técnicas de RT-PCR al estudio de las biopsias renales permitió en sus inicios buscar distintos marcadores moleculares del rechazo agudo como perforina, granzima B y ligando de Fas ⁽¹¹⁸⁾ y delimitó el papel central del factor transformante beta en la progresión de la fibrosis ⁽¹¹⁹⁾

Una de las áreas de más interés ha sido el de la transcriptómica que consiste en estudiar qué porción del genoma es transcrito a ARN mensajero (ARNm), es decir, qué material genético es expresado en un tipo celular bajo unas condiciones dadas. Así pues, el concepto de transcriptoma surge para representar todo este ARNm transcrito en ciertas circunstancias, de forma global. La transcriptómica permite cuantificar el nivel de expresión de genes, empleando técnicas que permiten analizar miles de moléculas de ARNm al mismo tiempo, mediante una técnica basada en microarrays (chips).

1.4.1. MICROMATRICES DE OLIGONUCLEOTIDOS: CONCEPTOS GENERALES

Un chip de ADN es una superficie sólida a la cual se une una colección de fragmentos de ADN. Las superficies empleadas para fijar el ADN son muy variables y pueden ser de vidrio, plástico o silicona. Los chips de ADN se usan para analizar la expresión diferencial de genes, y se monitorizan de manera simultánea los niveles de

miles de ellos. Su funcionamiento consiste, básicamente, en medir el nivel de hibridación entre la sonda específica (“probe”, en inglés), y la molécula diana (“target”), y se miden mediante fluorescencia a través de un análisis de imagen que indica el nivel de expresión del gen. Suelen utilizarse para identificar genes con una expresión diferencial en condiciones distintas. Por ejemplo, para detectar genes que producen ciertas enfermedades mediante la comparación de los niveles de expresión entre células sanas y células que están desarrollando ciertos tipos de enfermedades. Los chips de ADN se fabrican usando una gran variedad de tecnologías. El gran desarrollo de esta técnica ha llegado al normalizarse el uso de robots que se encargan de la mayor parte del proceso de manipulación de los chips. El análisis de expresión o análisis del transcriptoma tiene por objeto establecer un patrón o perfil de los genes transcritos presentes en un tipo de células o tejido determinado.

El ensayo de expresión comienza con la extracción del ARN de la muestra escogida (tejido, cultivo celular, biopsia, etc). El paso más importante para asegurar un experimento exitoso es el aislamiento del ARN ya que un ARN intacto garantizará la generación de datos de alta calidad. Tras la homogenización del tejido se procede al aislamiento de ARN al que se debe realizar un chequeo de su cantidad y calidad. El primer paso del procedimiento de marcado es la síntesis del ADNc del ARN usando la transcriptasa reversa y un iniciador oligo-DT. A continuación, el ADNc sirve como plantilla en una reacción de transcripción in vitro que produce cantidades amplificadas de ARNm antisentido marcado con biotina, al que se denomina ARNc que será el objetivo del estudio mediante microarrays. Antes de proceder a la hibridación debe evaluarse la calidad del ARNc marcado y posteriormente se procede a la hibridación en la placa del chip. Finalmente, el chip se tiñe con una molécula fluorescente (estreptavidina-ficoeritrina) que se une a la biotina que proporciona una señal que emite luz cuando se escanea el chip con un láser confocal y se registra el patrón de distribución de la señal en la matriz.

La parte más compleja es la interpretación de los datos obtenidos. Para ello, es necesaria la integración de los datos clínicos, histológicos y los que se derivan de los estudios del transcriptoma.

1.4.2. FENOTIPO MOLECULAR EN BIOPSIAS TRASPLANTE RENAL

El análisis de microarrays origina gran cantidad de datos, es decir, muchas medidas por muestra, lo cual representa un reto para su análisis. Las moléculas se pueden analizar como elementos individuales o como conjuntos de genes y relacionarlos con otros hallazgos de la biopsia (lesiones elementales, diagnóstico) o del paciente (función renal, supervivencia). Entre los objetivos de los análisis se encuentra la identificación de patrones y grupos en los datos, la comparación entre clases definiendo diferencias entre grupos de muestras bien definidas (por ejemplo, entre rechazo mediado por células T o por anticuerpos) o la predicción de clase de tal forma que las biopsias similares se agrupen conjuntamente. Finalmente, se pueden construir clasificadores capaces de diferenciar unos grupos de otros (fracaso del injerto, deterioro función renal).

Una de las grandes aportaciones en este campo ha sido realizada por el Alberta Transplant Applied Genome Center (ATAGC) liderado por Phil Halloran. Este grupo ha propuesto que los cambios moleculares en la enfermedad deben reflejar procesos biológicos que son estereotípicos para distintas enfermedades. Tanto en animales como en humanos, la lesión tisular se traduce en la entrada en los tejidos de células T y macrófagos, la liberación de interferón-gamma producirá cambios en el epitelio, el estroma y en la microcirculación. Este grupo, utilizando modelos de trasplante en ratón, cultivos celulares y en ocasiones extrayendo información de trabajos de otros grupos, han descrito conjuntos de genes que se asocian con cada uno de estos procesos y los han denominado transcritos basados en patogénesis ⁽¹²⁰⁾. En la tabla siguiente se muestran los PBTs descritos y su descripción ^{(121) (122) (123) (124) (125) (126) (127) (128) (129) (130)}

1.4.3. FENOTIPO MOLECULAR DEL RECHAZO CELULAR Y HUMORAL

Durante los últimos años el grupo del ATAGC ha validado la utilidad de estos PBTs en la evaluación de las biopsias renales realizadas por disfunción del injerto. Han identificado que los transcritos derivados de células endoteliales, células NK e inducibles por interferón- γ permiten clasificar las biopsias como ABMR de forma independiente a la presencia de DSA, la histología o el depósito de C4d. Además, el score molecular predice la supervivencia del injerto ⁽¹³¹⁾. De forma similar, han evaluado la utilidad del estudio molecular para clasificar a las biopsias como TCMR. A pesar de tener una sensibilidad y un valor predictivo positivos bajos (50 y 62%,

respectivamente), permite clasificar a los casos con la misma precisión que la valoración por distintos patólogos (45-50% de concordancia en la evaluación por tres patólogos). Los casos con mayor grado de discordancia entre la evaluación del fenotipo molecular y la histología son aquellos que muestran cambios “borderline”, cambios con fibrosis e inflamación o lesión de endotelialitis aislada (132). Finalmente, esta evaluación se ha trasladado a la clínica en un estudio en el que más de 500 biopsias realizadas en diversos centros fueron enviadas y evaluadas mediante el microscopio molecular en el ATAGC. En este estudio, la concordancia entre el estudio molecular y la histología fue del 77% para TCMR, 77% para ABMR y 76% para descartar rechazo. Además, hubo más concordancia entre la evaluación clínica y el estudio molecular (87%) que entre la evaluación clínica y la histología (80%)⁽¹³³⁾.

1.4.4. MICROARRAYS Y BIOPSIAS DE SEGUIMIENTO

Existen en la literatura pocos trabajos en los que se haya utilizado material procedente de biopsias de seguimiento para analizar la expresión génica en estos pacientes con función renal estable. De hecho, el grupo del ATGAC propone que las biopsias de seguimiento no son el mejor contexto para evaluar las aportaciones del estudio del transcriptoma ⁽¹³⁴⁾. Argumentan que las biopsias de seguimiento, sin indicación clínica, se realizan con el objetivo de detectar enfermedades silentes y que el tratamiento de las alteraciones observadas va dirigido a prevenir su expresión clínica. Sin embargo, cuestionan estas hipótesis argumentando que la existencia de enfermedad silente sin fenotipo clínico es cuestionable y que las enfermedades presenten en dichas biopsias habrían dado en poco tiempo una expresión clínica conduciendo a una biopsia de indicación. Afirman que la presencia de inflamación en las biopsias de seguimiento tempranas se asocia especialmente a marcadores de daño/reparación tisular. La necrosis tubular aguda se parece en su expresión molecular al rechazo celular mediado por células T porque ambas producen inflamación intersticial y tubulitis y, por lo tanto, los análisis de expresión génica pueden conducir a errores de interpretación. Además, postulan que el rechazo mediado por células T clínico tiene muy buen pronóstico si se trata de forma adecuada (pulsos de esteroides o sueros anti-linfocitarios) cuando aparece clínicamente y que, por lo tanto, su detección subclínica aporta poco. La presencia de cambios moleculares asociados al rechazo mediado por anticuerpos podría ser útil en los pocos pacientes con anticuerpos HLA donante-específicos preformados.

Sin embargo, otros grupos han analizado mediante microarrays los hallazgos en biopsias de seguimiento. El primer estudio publicado comparó las biopsias de seguimiento a los 2 años del trasplante en pacientes incluidos en un ensayo clínico en el que los pacientes se aleatorizaron a recibir tratamiento de mantenimiento con ciclosporina o sirolimus (asociado en ambas ramas a MMF y corticoides)(78) . La rama de sirolimus presentó mejor función renal a los 2 años (84 vs. 60 mL/min/1.73 m²) y menor prevalencia de lesiones crónicas (33% vs. 79% de biopsias con fibrosis intersticial/atrofia tubular y score de cronicidad 1.5 ± 2.7 vs. 3.2 ± 0.6). En un subgrupo de pacientes (19 con sirolimus y 22 con ciclosporina) realizaron análisis mediante microarrays. Observaron que había casi 400 genes que se expresaban de forma distinta en ambos grupos, especialmente genes relacionados con regulación de la transcripción/ligamiento DNA (35 genes), fibrosis y remodelado tisular (27 genes), respuesta inmune/inflamatoria (25 genes), transporte proteico intracelular (25 genes), señales de transducción (23 genes) y crecimiento celular (18 genes). Cuando compararon los casos con IF/TA moderada/severa con los casos sin IF/TA obtuvieron resultados similares y observaron una expresión diferente de los genes relacionados con respuesta inmune/inflamatoria (23 genes), adhesión celular/remodelado de matriz intersticial (15 genes), síntesis proteica (20 genes), transcripción/ligamiento DNA (5 genes) y metabolismo celular (16 genes). Los autores confirmaron mediante PCR cuantitativa que existe una mayor expresión de genes relacionados con IF/TA en otros trabajos como metaloproteinasa de matriz 7 (MMP-7), inhibidor de la metaloproteinasa de matriz 1 (TIMP-1), CCL5 (RANTES), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), colágeno III, quemoquina quimioatrayente de macrófagos y su receptor (MCP-1/CCR2), fibronectina y factor de necrosis tumoral α (TNF- α). El receptor de angiotensina II no alcanzó significación mediante microarray y sí mediante PCR. En cambio, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) no mostraron diferencias con ninguno de ambos métodos. En su conjunto, interpretan que el grupo de pacientes tratado con sirolimus presenta un mejor control de la respuesta inmune y una menor expresión de genes relacionados con progresión de la fibrosis.

Posteriormente, Mengel M y cols ⁽¹³⁵⁾ analizaron mediante PBTs 107 biopsias de seguimiento realizadas a las 6 semanas del trasplante. El objetivo era evaluar si las lesiones silentes de inflamación mononuclear intersticial y tubulitis representan episodios de TCMR, una forma incompleta de TCMR o si responden a la lesión de isquemia/reparación post-trasplante. Los PBT relacionados con inflamación (QCAT,

QCMAT, GRIT) estaban sobre-expresados al igual que en las biopsias por causa en los casos etiquetados como cambios borderline o rechazo subclínico. El grado de inflamación subclínica se correlacionó con la presencia de función retrasada del injerto y con el número de diálisis realizadas y no se correlacionó con la progresión de la fibrosis en la biopsia a los 6 meses ni con la función renal a los 24 meses. Los autores concluyeron que aunque el fenotipo molecular detecta la presencia de inflamación mediada por células T, esta se halla relacionada con lesión/reparación tisular asociada al estrés tisular post-trasplante y que, en cambio, no se asocia con el pronóstico del injerto a medio plazo ⁽¹³⁵⁾.

En cambio, Scherer A y cols ⁽¹³⁶⁾ compararon la expresión génica en biopsias de seguimiento realizadas a los 3 meses en pacientes sin fibrosis (ci=0, n=20) en los que la biopsia a los 6 meses no mostraba fibrosis intersticial (ci-score 0; n=8) y los que mostraban fibrosis leve (ci-score=1; n=12). Su análisis de expresión génica mostró que los pacientes con progresión de la fibrosis entre los 3 y los 6 meses presentaban en la biopsia inicial una mayor expresión de transcritos relacionados con activación de linfocitos T y B y con procesos relacionados con fibrosis, y una menor expresión de genes relacionados con transporte y metabolismo celular.

En resumen, en las biopsias de seguimiento en trasplante renal realizadas durante los primeros meses se observa una sobreexpresión de genes relacionados con la lesión de isquemia/reparación tisular y se asocia a una mayor progresión de la IF/TA. No se ha evaluado si un mejor control de la alorespuesta puede atenuar estos cambios y disminuir el riesgo de progresión de la lesiones crónicas y la aparición de anticuerpos anti-HLA de novo.

2. HIPÓTESIS

1. La monitorización histológica mediante biopsias de protocolo en injertos estables es un procedimiento seguro que permite caracterizar la evolución de las lesiones agudas (inflamación subclínica) y crónicas (progresión de la fibrosis) y evaluar la eficacia del tratamiento inmunosupresor de mantenimiento. La aplicación de técnicas de biología molecular al estudio de dichas biopsias permite caracterizar los mecanismos que participan en la evolución de dichas lesiones.

2. La expresión génica de biomarcadores de tolerancia y de las subpoblaciones linfocitarias circulantes asociadas en injertos estables aumenta a lo largo del tiempo post-trasplante y se relaciona con el tratamiento inmunosupresor de mantenimiento.

3. En el injerto con disfunción crónica, la glomerulopatía del trasplante en ausencia de anticuerpos anti-HLA y en ausencia de activación del complemento representa un fenotipo distinto del rechazo humoral crónico activo.

3. OBJETIVOS

3.1. Evaluar la seguridad y eficacia de un régimen ambulatorio de biopsias del injerto renal en pacientes con función estable y con disfunción crónica.

3.2. Evaluar la relación entre distintos regímenes de tratamiento basados en tacrolimus y micofenolato y la presencia de inflamación subclínica y/o progresión de la fibrosis intersticial / atrofia tubular en receptores de bajo riesgo inmunológico con función renal estable.

3.3. Evaluar el inmunofenotipo celular y el fenotipo molecular en biopsias renales realizadas en injertos con función estable y su relación con el tratamiento inmunosupresor y la progresión de las lesiones crónicas.

3.4. Evaluar la expresión génica de biomarcadores de tolerancia y de las subpoblaciones linfocitarias circulantes en distintas cohortes de pacientes con función estable en relación al tiempo de seguimiento post-trasplante y el tratamiento de mantenimiento.

3.5. Evaluar el fenotipo histológico e inmunológico en injertos con disfunción crónica por glomerulopatía del trasplante y su impacto sobre la supervivencia del injerto.

4. ARTICULOS PUBLICADOS

4.1. **Torres-Rodríguez IB**, Castella-Fierro E, Serres-Creixans X, Salcedo-Allende M, Azancot-Rivero MA, Perelló-Carrascosa M, Sellares-Roig J, Cantarell-Aixandri C, Moreso-Mateos F, Serón-Micas D. Seguridad y eficacia de la biopsia ambulatoria en trasplante renal. Nefrología. 2014 Nov 17; 34 (6): 749-55. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2014.Jul.12509.

Resumen. La biopsia renal es una herramienta imprescindible para el diagnóstico de las distintas patologías que afectan al injerto renal y se ha propuesto como una método para monitorizar a los injertos renales con función estable. Habitualmente, este procedimiento va ligado a un ingreso hospitalario dado que se asocia a un riesgo de complicaciones (hematoma, fístula arterio-venosa y otras) que pueden poner en compromiso la seguridad del injerto y del paciente. Sin embargo, la realización de la biopsia bajo control ecográfico con aguja automática ha reducido el número de complicaciones y su realización como procedimiento ambulatorio reduce el tiempo de espera, mejora la calidad de vida del paciente y reduce los costes para el sistema sanitario. En este trabajo, se evalúan los resultados de un programa de biopsias renales sobre el injerto renal, tanto diagnósticas como de monitorización, y se propone que en un elevado porcentaje de casos puede realizarse de forma ambulatoria sin comprometer la eficacia y seguridad del procedimiento.

Seguridad y eficacia de la biopsia ambulatoria en trasplante renal

Irina B. Torres-Rodríguez¹, Eva Castella-Fierro², Xavier Serres-Creixans², Maite Salcedo-Allende³, María A. Azancot-Rivero¹, Manel Perelló-Carrascosa¹, Joana Sellares-Roig¹, Carme Cantarell-Aixandri¹, Francesc Moreso-Mateos¹, Daniel Serón-Micas¹

¹ Servicio de Nefrología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona; ² Servicio de Radiología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona; ³ Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona.

Nefrología 2014;34(6):749-55

doi:10.3265/Nefrologia.pre2014.Jul.12509

RESUMEN

Antecedentes: La biopsia del aloinjerto renal se realiza habitualmente con el paciente hospitalizado. **Objetivo:** Evaluar la seguridad y eficacia de un programa de biopsias ambulatorio en receptores de trasplante renal. **Métodos:** En diciembre de 2011 se inició un programa ambulatorio de biopsias en trasplante renal. Se contraindica la biopsia ambulatoria en los casos siguientes: 1) tratamiento anticoagulante, 2) trombocitopenia < 50 000/mm³, 3) Índice de masa corporal > 35 kg/m², 4) hipertensión arterial no controlada. Se compara la seguridad y eficacia de las biopsias realizadas bajo hospitalización en el periodo 2007-2011 (n = 124) con las biopsias ambulatorias realizadas durante el periodo 2011-2013 (n = 219) y las realizadas en este mismo periodo bajo hospitalización (n = 42). **Resultados:** Entre diciembre de 2011 y diciembre de 2013 se han indicado 230 biopsias desde la consulta externa y se han realizado 219 (95 %) en régimen ambulatorio. La incidencia de complicaciones mayores (necesidad de transfusión y/o embolización) ha sido de 0,8 % para el periodo 2007-2011 y de 2,4 % para las realizadas bajo hospitalización del periodo 2011-2013 (p = 0,475). No se observaron complicaciones mayores en el grupo de pacientes con biopsias realizadas de forma ambulatoria. La tasa de complicaciones menores (hematuria macroscópica, hematoma o fistula que no requirieron transfusión ni embolización) no ha sido distinta entre los grupos (3,2 %, 7,1 % y 2,7 %, respectivamente). La adecuación de la muestra obtenida según los criterios de Banff no ha sido distinta entre los grupos (p = 0,052). **Conclusión:** La realización ambulatoria de la biopsia de injerto renal es un procedimiento seguro y eficaz.

Palabras clave: Trasplante renal. Biopsia renal ambulatoria. Seguridad.

Correspondencia: Daniel Serón Micas

Servicio de Nefrología.

Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Universitat Autònoma de Barcelona.

Passeig Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona.

dseron@hebron.net

Safety and efficacy of outpatient biopsy in renal transplantation

ABSTRACT

Background: In many centers patients are hospitalised to perform a renal allograft biopsy. **Aim:** To evaluate the safety and efficacy of outpatient renal allograft biopsies. **Methods:** Since December 2011 we perform renal allograft biopsies as an outpatient procedure. **Exclusion criteria for performing an outpatient biopsy included:** 1.) anticoagulant treatment, 2.) thrombocytopenia <50,000/mm³, 3.) body mass index >35kg/m² and 4.) uncontrolled hypertension. The number and severity of complications were compared with an historical cohort of 124 biopsies done between 2007 and 2011 when all patients were hospitalised for the procedure and with 42 patients biopsied during hospitalisation between 2011 and 2013. **Results:** Between 2011 and 2013, 210 (95%) out of 230 biopsies indicated in the outclinic were performed as an outpatient procedure (95%). The incidence of major complications (bleeding requiring blood transfusion and/or embolisation) was 0.8% between 2007 and 2011 and 2.4% in biopsies between 2011 and 2013 in hospitalised patients (p=0.475). No major complications were observed in the outpatient biopsy group. Minor complications (hematuria, hematoma or fistula not requiring transfusion or embolisation) were also not different between groups (3.2%, 7.1% and 2.7%; respectively). Sample size adequacy according to the Banff criteria was not different among groups (p=0.052). **Conclusion:** Ambulatory renal allograft biopsy is a safe and efficient procedure.

Keywords: Renal transplantation. Outpatient renal graft. Safety.

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, la necesidad de atender una creciente lista de espera quirúrgica para procesos de baja o mediana complejidad ha favorecido el desarrollo de programas de

originales breves

ambulatorización de procedimientos intervencionistas, reuniendo condiciones de eficiencia y seguridad, con un elevado grado de satisfacción por parte del paciente y de los profesionales implicados¹.

La biopsia renal percutánea es un procedimiento diagnóstico utilizado desde 1944 y una herramienta fundamental para el conocimiento de la patología renal y como guía para la toma de decisiones en la práctica clínica^{2,3}. Tradicionalmente, este procedimiento ha requerido la hospitalización del paciente. Sin embargo, durante las dos últimas décadas la realización de la biopsia con aguja automática guiada por ecografía ha permitido disminuir las complicaciones graves (fallecimiento y/o pérdida del injerto) asociadas al procedimiento^{4,5}. Estos cambios han favorecido la ambulatorización de la biopsia de riñón nativo y del aloinjerto renal, convirtiéndola en un procedimiento seguro en una población seleccionada de pacientes^{6,7}.

La implementación de un programa de biopsias ambulatorias mejora la calidad de vida del paciente minimizando su estancia hospitalaria. Además, resulta en una disminución significativa del coste del procedimiento y en una menor lista de espera para su realización¹.

Por estos motivos, desde diciembre de 2011 se ha implementado en nuestro servicio un programa de biopsias ambulatorias del injerto renal. El objetivo de nuestro estudio es evaluar la seguridad y la eficacia del procedimiento, comparando la incidencia y la gravedad de las complicaciones con una cohorte histórica en la que el procedimiento se realizó con el paciente hospitalizado.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio de cohortes en el que se comparan la incidencia y la gravedad de las complicaciones asociadas a la biopsia del injerto realizada en régimen de hospitalización durante los períodos enero de 2007-noviembre de 2011 y diciembre de 2011-diciembre de 2013 con la realizada en régimen ambulatorio durante el período diciembre de 2011-diciembre de 2013.

Procedimiento de la biopsia

La biopsia renal ambulatoria se indica desde la Consulta Externa. Se contraindica su realización en las siguientes circunstancias: 1) tratamiento anticoagulante con dicumarínicos, 2) trombocitopenia $< 50\ 000/\text{mm}^3$, 3) obesidad con índice de masa corporal $> 35\ \text{kg}/\text{m}^2$, 4) hipertensión arterial no controlada con tratamiento médico. En los pacientes que reciben tratamiento con antiagregantes plaquetarios se interrumpe la medicación una semana antes y se reintroduce a las 72 horas si no ha habido complicaciones.

El paciente es admitido el mismo día del procedimiento en la unidad de hemodiálisis. Tras la obtención del consentimiento informado, se canaliza una vena periférica y se obtienen muestras para hemograma completo con recuento de plaquetas, parámetros de coagulación y reserva para banco de sangre. Los pacientes a quienes se indica la hospitalización por presentar contraindicaciones para la realización de la biopsia de forma ambulatoria ingresan el día previo al procedimiento y se dan de alta después de 24 horas de observación. Si el paciente sigue tratamiento con anticoagulantes orales, este se interrumpe una semana antes y se introduce heparina de bajo peso molecular, que se interrumpe 24 horas antes de la biopsia.

En los pacientes con filtrado glomerular $< 30\ \text{ml}/\text{min}/1,73\ \text{m}^2$ estimado mediante la fórmula CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) y/o que presentan una alteración conocida de la coagulación, se administra desmopresina $0,3\ \mu\text{g}/\text{kg}$ una hora antes del procedimiento. Además, todos los pacientes reciben diazepam $5\ \text{mg}$ vía oral 30 minutos antes del procedimiento y atropina subcutánea $0,5\ \text{mg}$ en el momento de la biopsia.

La biopsia renal la realiza el radiólogo utilizando una aguja automática de calibre 16 (BARD® MONOPTY®) bajo control ecográfico a tiempo real y se obtienen de forma rutinaria dos cilindros para estudio mediante microscopía óptica e inmunofluorescencia. Además, en todas las biopsias de seguimiento se obtiene un tercer cilindro para estudios de biología molecular. En un grupo de 42 biopsias realizadas durante el período 2007-2011 también se obtuvo un cilindro adicional para biología molecular⁸. Después del procedimiento, el paciente permanece en reposo durante 6 horas mientras se monitoriza la diuresis y la presión arterial, y se realiza un hemograma de control a las 4 horas. Si no se han detectado complicaciones inmediatas, es dado de alta a su domicilio, recomendando reposo relativo durante 72 horas.

Si se observan complicaciones inmediatas como hematoma subcapsular sin signos de sangrado activo en el control ecográfico posbiopsia y/o hematuria macroscópica pospunción renal, se indica ampliación del tiempo de observación u hospitalización según los signos de gravedad.

Evaluación de las complicaciones

Después de la biopsia se evalúan las siguientes complicaciones: a) complicaciones mayores: hematuria macroscópica, hematoma y/o fístula arterio-venosa, que requieran transfusión de sangre o tratamiento intervencionista; y b) complicaciones menores: hematuria macroscópica autolimitada y/o hematoma subcapsular sin compromiso hemodinámico.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como frecuencias para las variables cualitativas y como la media \pm desviación estándar para las variables continuas. La comparación entre grupos se ha realizado con el test X^2 para las variables cualitativas y mediante el análisis de la varianza para la comparación de medias con el test post hoc de Scheffé para comparaciones individuales entre grupos. Todos los análisis son bilaterales y se considera significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Pacientes

Durante el período de estudio se han realizado 385 biopsias del injerto renal. En el período comprendido entre enero de 2007 y noviembre de 2011 se realizaron 124 biopsias en régimen de hospitalización. En el período comprendido entre diciembre de 2011 y diciembre de 2013 se llevaron a cabo un total de 261 biopsias, de las cuales 219 (84 %) fueron en régimen ambulatorio. Durante este mismo período se realizó la biopsia en régimen de hospitalización en 42 casos

(16 %) por los motivos siguientes: a) la biopsia se indica en pacientes hospitalizados ya sea por retraso de la función renal ($n = 31$), b) el paciente ingresa de forma programada porque existe una contraindicación para realizar la biopsia ambulatoria ($n = 11$), tal como se muestra en la figura 1. Las contraindicaciones para la biopsia ambulatoria fueron las siguientes: tratamiento con anticoagulantes sistémicos ($n = 2$), obesidad ($n = 2$), trombocitopenia ($n = 3$), contexto socio-familiar inadecuado para asegurar la monitorización del paciente durante las 24 horas posbiopsia ($n = 3$) y por residencia insular ($n = 1$).

En la tabla 1 se describen las características demográficas y clínicas de los tres grupos de pacientes. Las diferencias en la función renal y la proteinuria entre grupos se relacionan con la indicación de esta. Es de destacar que en el grupo de biopsias ambulatorias el 53 % se indicaron por disfunción del injerto y el 47 % fueron biopsias de seguimiento a los 3 o 12 meses del trasplante.

Complicaciones posbiopsia

Durante el período comprendido entre enero de 2007 y noviembre de 2011 se registró una complicación mayor

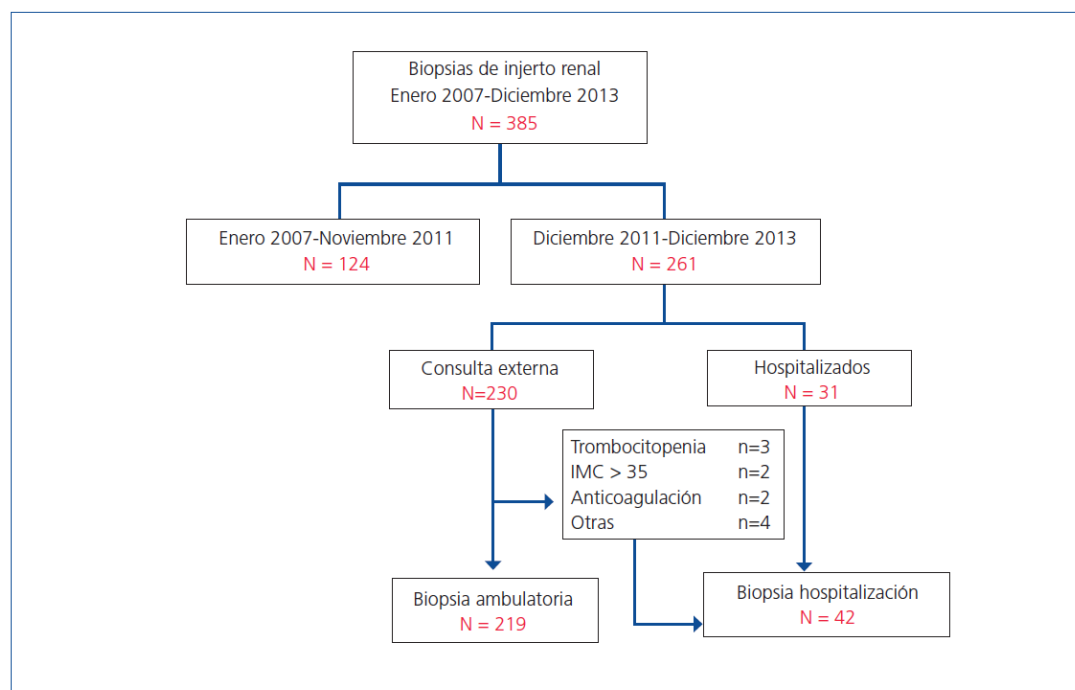


Figura 1. Diagrama de flujo de las biopsias realizadas durante el período 2007-2013.

IMC: Índice de masa corporal.

originales breves

Tabla 1. Variables demográficas, indicación de la biopsia y datos analíticos en el momento de la biopsia

Variable	Hospitalizados 2007-2011	Hospitalizados 2011-2013	Ambulatorios 2011-2013	p
N	124	42	219	
Edad	47,8 ± 14,8	51,3 ± 17,1	51,0 ± 15,0	0,147
Género (varón/mujer)	91/33	18/24	165/54	< 0,001
Nefropatía GN/NTIC/PQR/ND/NAE/NF/Otras	42/15/17/4/1/38/7	11/4/9/5/1/8/4	63/17/19/16/5/78/21	0,147
Trasplante (1/> 1)	101/23	38/4	185/34	0,224
Indicación biopsia (FRI/DA/DC/seguimiento)	19/36/62/7	15/22/4/0	0/46/58/102	< 0,001
Tiempo (meses)	40,8 ± 60,3	26,9 ± 69,6	28,4 ± 45,5	0,094
Creatinina (mg/dl)	2,9 ± 2,1	3,6 ± 2,3 ^a	1,6 ± 0,6 ^{a,b}	< 0,001
Proteinuria (g/día)	1,3 ± 1,7	0,5 ± 1,0 ^a	0,8 ± 1,3 ^a	< 0,001

DA: disfunción aguda; DC: disfunción crónica y/o proteinuria; FRI: función retrasada del injerto; GN: glomerulonefritis;

NAE: nefroangioesclerosis; ND: nefropatía diabética; NF: no filiada; NTIC: nefropatía túbulo-intersticial; PQR: poliquistosis renal.

^a p < 0,05 frente a hospitalizados 2007-2011.

^b p < 0,05 frente a hospitalizados 2011-2013 mediante el test de Scheffé.

(0,8 %) en un paciente que requirió embolización por punción de la arteria epigástrica con sangrado intraabdominal con hipotensión arterial. Como complicaciones menores se observaron tres hematomas sin compromiso hemodinámico y sin requerimientos transfusionales y un paciente presentó hematuria macroscópica autolimitada (3,2 %).

Durante el período comprendido entre diciembre de 2011 y diciembre de 2013 en los 219 pacientes en los que se realizó la biopsia en régimen ambulatorio se registraron 6 (2,7 %) complicaciones menores (2 hematurias autolimitadas y 4 hematomas subcapsulares sin compromiso hemodinámico). Un paciente con hematuria autolimitada y dos pacientes con hematoma subcapsular se dieron de alta a las 6 horas de la biopsia. Se decidió la hospitalización de un paciente con hematuria macroscópica y 2 pacientes con hematoma perirrenal. Los pacientes se dieron de alta a las 24 horas y un paciente con hematoma perirrenal se fue a las 48 horas, ya que su domicilio estaba a 200 km del hospital.

En los 42 pacientes biopsiados en régimen de hospitalización durante el período 2011-2013 se observó una complicación mayor (2,4 %) que requirió embolización por sangrado de la pared abdominal con compromiso hemodinámico y 3 pacientes (7,1 %) presentaron complicaciones menores: hematoma subcapsular no complicado (n = 2) y hematuria autolimitada (n = 1). En la tabla 2 se resumen las complicaciones de los tres grupos de pacientes.

Número de cilindros obtenidos y adecuación de la muestra

El número de cilindros obtenidos en las biopsias ambulatorias fue significativamente superior al de los pacientes ingresados, dado que en las biopsias de seguimiento se obtiene un cilindro adicional para biología molecular. Aunque en el cilindro obtenido para microscopía óptica el número de glomérulos fue significativamente inferior en las biopsias ambulatorias, esta diferencia no alcanzó la significación estadística cuando se evaluó la adecuación de la muestra según los criterios de Banff⁹, tal como se muestra en la tabla 2.

DISCUSIÓN

La biopsia del aloinjerto renal es un procedimiento útil para el conocimiento y la caracterización de los eventos que le suceden al injerto renal y sirve de guía para las intervenciones terapéuticas. La introducción de la punción mediante aguja automática guiada por ecografía ha convertido la biopsia del aloinjerto, ya sea diagnóstica o de seguimiento, en un procedimiento seguro^{3,6}.

En el presente estudio, en el que se evalúan retrospectivamente las complicaciones asociadas a la realización de biopsias del injerto en pacientes hospitalizados (períodos 2007-2011 y 2011-2013) y ambulatorios (período 2011-2013), se demuestra que no existen diferencias en la incidencia de complicaciones entre ambos períodos de tiempo y que la tasa de complicaciones graves fue inferior al 1 %, tal como se

Tesis doctoral: Valor predictivo del fenotipo molecular sobre la progresión de las lesiones renales en biopsias de seguimiento en trasplante renal
Doctorando: Irina B. Torres Rodríguez

Irina B. Torres-Rodríguez et al. Biopsia renal ambulatoria

originales breves

Tabla 2. Complicaciones asociadas a la biopsia renal y rentabilidad de esta en cada uno de los grupos estudiados

Variable	Hospitalizados 2007-2011	Hospitalizados 2011-2013	Ambulatorios 2011-2013	P
N	124	42	219	
Complicaciones				
Ninguna	119	38	213	
Embolización/sangrado	1	1	0	
Hematuria macroscópica	1	1	2	
Hematoma	3	2	4	0,475
N.º cilindros	1,99 ± 0,16	1,92 ± 0,44	2,30 ± 0,5^{a,b}	< 0,001
N.º glomérulos	13,6 ± 7,3	14,5 ± 10,5	11,6 ± 5,9^a	< 0,001
Adecuación de la muestra				
Inadecuada	17	3	36	
Marginal	20	12	60	
Adecuada	87	27	123	0,052

El tamaño de la muestra se ha evaluado según los criterios de Banff (inadecuada, < 7 secciones glomerulares y/o ausencia de arteria; marginal, 7-9 secciones glomerulares con al menos una arteria; adecuada, ≥ 10 secciones glomerulares con al menos una arteria).

^a p < 0,05 frente a hospitalizados 2007-2011.

^b p < 0,05 frente a hospitalizados 2011-2013 mediante el test de Scheffé.

ha descrito en otras series de biopsias. En ningún caso se ha producido el fallecimiento del paciente o la pérdida del injerto^{5,6,10}.

En distintos estudios retrospectivos de series de biopsias del injerto renal realizadas en receptores adultos y pediátricos, se ha evaluado la seguridad del procedimiento ambulatorio. En una de las revisiones más amplias con 1670 biopsias, Schwarz et al. mostraron que la biopsia del injerto realizada como procedimiento ambulatorio es segura y que no existen diferencias en el índice de complicaciones independientemente de su indicación (por causa clínica o de seguimiento). Además, de acuerdo con otros autores, con la utilización de una aguja calibre 16 G es posible obtener el mismo perfil de seguridad y una mejor adecuación de la muestra para su valoración histológica⁶. A pesar de no existir homogeneidad entre los distintos centros sobre los criterios de contraindicación para su realización como procedimiento ambulatorio y el tiempo de observación del paciente tras la realización de la biopsia para la monitorización de las complicaciones, los resultados obtenidos en distintas series (tabla 3) sugieren que un período ventana de entre 4 y 8 horas posbiopsia bajo evaluación de signos vitales y monitorización urinaria, asociado o no a control analítico y/o ecográfico, es suficiente para observar una complicación de sangrado asociada al procedimiento^{6,7,11,12}.

El éxito de la implementación de un programa ambulatorio de un procedimiento de baja o mediana complejidad se fundamenta en la disminución del tiempo de espera, así como en la eficiencia y la seguridad que pueda conseguir. Además, produce un

beneficio al paciente, al percibir una mejor calidad de vida y atención, a los profesionales, al simplificarles el proceso clínico, y a la institución, al aumentar la eficiencia de los procesos y reducir los costes de hospitalización. Para ello es necesaria la coordinación entre distintas especialidades y un elevado grado de protocolización del proceso clínico aplicable a un grupo de pacientes que reúnan características similares de bajo riesgo. Todo esto permite asegurar una estancia mínima de observación y una baja tasa de hospitalización por complicaciones^{7,13}.

En nuestra experiencia, se ha de destacar que desde la implementación de la biopsia ambulatoria tan solo ha ocurrido una complicación mayor de las 261 realizadas (0,38 %); se trataba de un paciente que ya estaba hospitalizado y al que se realizó la biopsia por disfunción aguda del injerto. Durante este mismo período, debemos señalar que el 95 % de las biopsias indicadas desde la consulta se realizaron como un procedimiento ambulatorio. Ninguno de estos pacientes presentó una complicación mayor. Se decidió el ingreso por complicaciones menores detectadas durante el período de monitorización (6 horas) en dos pacientes con hematoma subcapsular y en uno con hematuria macroscópica, lo que representa una tasa de hospitalización del 1,37 %, similar a la observada en otras series (tabla 3). En los pacientes que no presentaron complicaciones durante el período de monitorización no se observaron complicaciones tardías.

Las indicaciones de biopsia más frecuentes en los pacientes hospitalizados durante el período 2011-2013 fueron el retraso en la función del injerto y la disfunción aguda. Solo en 11 de 230 pacientes (5 %) en los que se

originales breves

Tabla 3. Porcentaje de complicaciones, tiempo de observación y complicaciones posteriores al período de observación, índice de hospitalización y adecuación de la muestra en distintas series de biopsias ambulatorias del aloinjerto renal

Variable	Schwarz et al.	Birk et al.	Yablon et al.	Torres et al.
Calibre de la aguja	18 G/16 G	16 G	15 G	16 G
N	1222/448	131	124	219
Complicación mayor (%)				
Intervención y/o transfusión	0,2/0,4	0	3,2	0
Cateterismo urinario	0,9/0,2	2,3	2,8	0
Complicación menor (%)				
Hematuria macroscópica	3,7/2,9	8,4	3,2	1,0
Hematoma	2,0/3,8	0	0	1,8
Fistula arterio-venosa	8,0/4,5	0,8	0	0
Tiempo de observación	4 h	4 h	8 h	6 h
Complicaciones posteriores tiempo de observación	1 (trombosis venosa femoral)	1 (fistula)	1 (hematuria)	0
Índice de hospitalización (%)	1,8/2,2	3,1	3,2	1,4
Adecuación de la muestra (%)				
Inadecuada	48/25	5	No evaluado	16,4
Adecuada	52/75	95		83,6

Schwarz et al. realizaron 1171 biopsias de seguimiento y 499 biopsias por causa en receptores adultos de trasplante renal⁶. Birk et al. llevaron a cabo 113 biopsias de seguimiento y 18 biopsias por causa en receptores de trasplante renal pediátrico mayores de 5 años¹¹. Yablon et al. realizaron 124 biopsias por causa en receptores adultos de trasplante renal¹². En nuestra serie contamos con 103 biopsias de seguimiento y 116 biopsias por causa.

indicó la biopsia desde la consulta externa se decidió el ingreso por presentar contraindicaciones clínicas o socio-familiares.

De las 219 biopsias realizadas en régimen ambulatorio, un total de 102 (47 %) fueron de seguimiento. En estos casos se obtiene un tercer cilindro para estudios de biología molecular, y es por este motivo por el que el número medio de cilindros en los pacientes ambulatorios fue significativamente superior. A pesar de la obtención de un cilindro adicional en estos pacientes de bajo riesgo, no se observó un mayor número de complicaciones.

Cabe destacar que el número de muestras de tejido renal definidas como marginales y adecuadas para realizar un diagnóstico fue un poco inferior en los pacientes ambulatorios, aunque su diferencia no alcanzó la significación estadística y no fue clínicamente relevante, ya que en todos los casos se pudo realizar el diagnóstico.

CONCLUSIÓN

La biopsia del aloinjerto renal realizada en régimen ambulatorio es un procedimiento seguro cuando se aplica a un

subgrupo de pacientes de bajo riesgo, mejora la calidad de vida de estos, disminuye la lista de espera para su realización y reduce los costes de hospitalización.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración del personal de enfermería de la Unidad de Hemodiálisis del Hospital Vall d'Hebron que ha contribuido en el cuidado de los pacientes.

Conflictos de interés

Los autores declaran los siguientes conflictos de interés potenciales:

- Reciben becas: I.B Torres ha recibido una beca predoctoral del Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR). M.A Azancot ha recibido una beca predoctoral FIS (I11/0246). Este trabajo ha contado con la ayuda del Instituto Carlos III (becas PI10/2496, PIE13/00027), de la RED de Investigación Renal (REDinREN 12/0021/0013) y de una beca de la Sociedad Española de Trasplante-Novartis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romero Simo M, Aguayo Albasini JL. Major ambulatory surgery and clinical pathways: a stimulating combination. *Cir Esp* 2010;88:228-31.
2. Alwall N. Aspiration biopsy of the kidney, including i.a. a report of a case of amyloidosis diagnosed through aspiration biopsy of the kidney in 1944 and investigated at an autopsy in 1950. *Acta Med Scand* 1952;143:430-5.
3. Henderson LK, Nankivell BJ, Chapman JR. Surveillance protocol kidney transplant biopsies: their evolving role in clinical practice. *Am J Transplant* 2011;11:1570-5.
4. Burstein DM, Korbet SM, Schwartz MM. The use of the automatic core biopsy system in percutaneous renal biopsies: a comparative study. *Am J Kidney Dis* 1993;22:545-52.
5. Furness PN, Philpott CM, Chorbadjian MT, Nicholson ML, Bosmans JL, Corthouts BL, et al. Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates. *Transplantation* 2003;76:969-73.
6. Schwarz A, Gwinner W, Hiss M, Radermacher J, Mengel M, Haller H. Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies. *Am J Transplant* 2005;5:1992-6.
7. McMahon GM, McGovern ME, Bijol V, Benson CB, Foley R, Munkley K, et al. Development of an outpatient native kidney biopsy service in low-risk patients: a multidisciplinary approach. *Am J Nephrol* 2012;35:321-6.
8. Halloran PF, Pereira AB, Chang J, Matas A, Picton M, De Freitas D, et al. Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: an international prospective study (INTERCOM). *Am J Transplant* 2013;13:2865-74.
9. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55:713-23.
10. Tapia-Canelas C, Zometa R, López-Oliva MO, Jiménez C, Rivas B, Escuin F, et al. Complications associated with renal graft biopsy in transplant patients. *Nefrología* 2014;34:115-9.
11. Birk PE, Blydt-Hansen TD, Dart AB, Kaita LM, Proulx C, Taylor G. Low incidence of adverse events in outpatient pediatric renal allograft biopsies. *Pediatr Transplant* 2007;11:196-200.
12. Yablon Z, Recupero P, McKenna J, Vella J, Parker MG. Kidney allograft biopsy: timing to complications. *Clin Nephrol* 2010;74:39-45.
13. Corapi KM, Chen JL, Balk EM, Gordon CE. Bleeding complications of native kidney biopsy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2012;60:62-73.

4.2. Moreso F, **Torres IB**, Martínez-Gallo M, Benlloch S, Cantarell C, Perelló M, Jimeno J, Pujol-Borrell R, Serón D. Gene expression signature of tolerance and lymphocyte subsets in stable renal transplants: Results of a cross-sectional study. *Transplant Immunol.* 2014 Jun; 31 (1): 11-16. doi: 10.1093/ajtp/2014.04.008.

Resumen. En este estudio transversal cruzado realizado en 45 pacientes trasplantados renales con función renal estable tratados con inhibidores de calcineurina en distintos momentos de la evolución post-trasplante, 1 año (n=15), 5 años (n=14) y 10 años (n=16) y en pacientes tratados con azatioprina seguidos por 30 años (n=8), evaluamos la presencia de una firma génica relacionada con tolerancia. Como grupo control se han considerado controles sanos (n=10) y pacientes con rechazo crónico humoral (n=15). Hemos confirmado que la expresión en sangre periférica de los genes IGKV1D-13 e IGKV4-1 por RT-PCR distingue a los pacientes tolerantes (n=10) de los pacientes trasplantados con función renal estable (n=10) de una muestra de pacientes cedida por la International Tolerance Network. La firma de tolerancia fue definida a partir de la expresión de ambos genes en pacientes tolerantes. En los pacientes tratados con inhibidores de calcineurina, la firma génica de tolerancia y la expresión de linfocitos B mostró un incremento tiempo-dependiente no observado en pacientes tratados con aziatropina ($p=0.01$). La firma de tolerancia génica fue observada en el 7% a los 5 y 25% a los 10 años post-trasplante. En 15 de los 16 pacientes trasplantados a los 10 años tratados con inhibidores de calcineurina, se realizó una nueva determinación a los 3 meses. En 2 pacientes se demostró la firma de tolerancia génica en ambas determinaciones. Esta firma de tolerancia se asoció con un incremento del número total de células B, B naïve y B transicionales ($p<0.05$). Nuestros datos sugieren que la expresión génica y su asociación con las poblaciones de linfocitos B aumentan durante el seguimiento en los pacientes tratados con inhibidores de calcineurina y a los 10 años, dos pacientes expresaron de manera consistente la firma génica de tolerancia.



Gene expression signature of tolerance and lymphocyte subsets in stable renal transplants: Results of a cross-sectional study



Francesc Moreso^{a,*}, Irina B. Torres^a, Monica Martínez-Gallo^b, Susana Benlloch^c, Carme Cantarell^a, Manel Perelló^a, José Jimeno^c, Ricardo Pujol-Borrell^b, Daniel Seron^a

^a Nephrology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Immunology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^c Pangaea Biotech S.L., Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2014

Received in revised form 12 April 2014

Accepted 23 April 2014

Available online 5 May 2014

Keywords:

Renal transplantation

Operational tolerance

Immunosuppression

Chronic rejection

Lymphocyte subpopulations

B cells

ABSTRACT

Background: In kidney transplants operational tolerance has been associated with up-regulation of B cell differentiation genes and an increased number of total, naive and transitional peripheral B cells. The aim is to evaluate tolerance biomarkers in different cohorts of stable renal transplants under immunosuppression.

Methods: This is a cross-sectional study conducted in renal transplants. We evaluate genetic tolerance signature and lymphocyte subsets in stable transplants treated with calcineurin inhibitors (CNI) at 1 (n = 15), 5 (n = 14) and 10 (n = 16) years, and azathioprine-treated transplants followed 30 years (n = 8). Healthy volunteers (n = 10) and patients with chronic rejection (n = 15) served as controls.

Results: We confirm that peripheral expression of IGKV1D-13 and IGKV4-1 genes by RT-PCR distinguish tolerant (n = 10) from stable transplants (n = 10) provided by the International Tolerance Network. Tolerance signature was defined as the lowest expression for both genes in tolerant patients. In CNI-treated patients, genetic signature of tolerance and B cells showed a time-dependent increase not observed in azathioprine-treated patients (p < 0.01). Genetic tolerance signature was observed in 0% at 1, 7% at 5 and 25% at 10-years while it was not observed in azathioprine-treated and chronic rejection patients. Fifteen out of 16 CNI-treated transplants at 10 years were reevaluated 3 months apart. Nine did not show the tolerance signature in any determination, 4 in one and 2 in both determinations. Genetic signature of tolerance was associated with an increase of total, naive and transitional B cells (p < 0.05).

Conclusions: IGKV1D-13 and IGKV4-1 gene expression and its linked B cell populations increase during follow up in CNI-treated patients. At 10 years, 2 out of 15 CNI treated patients consistently express biomarkers associated with true tolerance. In azathioprine-treated patients these biomarkers were down-regulated.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Renal transplantation is the best available treatment for end-stage renal disease [1]. Short term graft survival has significantly improved thanks to the introduction of new immunosuppressive agents, but improvement of long term survival has been rather moderate [2,3]. Chronic humoral rejection, interstitial fibrosis/tubular atrophy, recurrence of the primary disease and death with a functioning graft constitute the major causes for late graft failure [4–6]. Long term immunosuppression, that is associated with complications such as cardiovascular disease, cancer, infections, diabetes, nephrotoxicity and inadequate control of the alloimmune response, may constitute a barrier to improve long term outcome [7–9]. Protocols using mild

immunosuppressive regimens have been introduced in an attempt to reduce these side effects, but insufficient immunosuppression is associated with an increased risk for acute and chronic rejections [10,11]. The description of cases of operational tolerance, i.e., stable renal function lasting for at least one year after discontinuation of immunosuppression with preserved renal function, has arisen the interest of the transplant community.

Operational tolerance is a very rare condition in kidney recipients [12] but it is frequent in liver transplants [13]. Tolerance in kidney recipients is associated with up-regulation of multiple B cell differentiation genes and increased number of total, naive and transitional peripheral B cells, HLA-DR⁺CD4⁺ T cells and natural killer cells (NK) in comparison to stable grafts receiving immunosuppression or patients suffering from acute or chronic rejection [14–16]. Newell et al. reported that the over-expression of just three B cell-related genes (IGKV1D-13, IGKV4-1 and IGLL1) was sufficient to distinguish tolerant patients from stable renal allografts under immunosuppression. Additionally, the identification

* Corresponding author at: Nephrology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119–129, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: + 34 93 274 60 79. E-mail address: fjmoreso@vhebron.net (F. Moreso).

Tesis doctoral: Valor predictivo del fenotipo molecular sobre la progresión de las lesiones renales en biopsias de seguimiento en trasplante renal

Doctorando: Irina B. Torres Rodríguez

12

F. Moreso et al. / *Transplant Immunology* 31 (2014) 11–16

of these markers of operational tolerance also in some patients with stable grafts and still under immunosuppression suggested that it might be possible to identify those patients that could benefit from reduction or withdrawal of immunosuppression. Approximately, 3–4% of stable renal allografts under immunosuppression express this tolerance signature [12]. Living donation, older recipient age, good HLA matching and, especially, long-term follow up, were factors associated with this situation [17,18].

Clinical trials in liver transplantation have shown that immunosuppression can be withdrawn in approximately one third of patients [19,20]. A major difference between liver and renal transplantations is that acute rejection is not associated, if promptly treated, with a reduction in allograft long-term survival as it is the case in kidney transplantation. Thus, designing clinical trials to evaluate the utility of a tolerance signature to guide immunosuppression weaning protocols in kidney transplants constitutes a major goal in this field.

2. Objective

To evaluate the expression of the gene expression of tolerance signature previously described by Newell et al. [16] and B lymphocyte subsets in five groups of renal transplant patients receiving different immunosuppressive regimens at different times of follow up.

3. Patients and methods

3.1. Study design

This is a cross-sectional study to evaluate total blood candidate gene expression profiles and lymphocytes subsets previously associated with operational tolerance in stable renal transplants under immunosuppression. Healthy subjects and patients with chronic rejection served as controls. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitari Vall d'Hebron. All patients gave written informed consent to participate in the study.

3.2. Patients

Patients with stable renal function (estimated glomerular filtration rate by MDRD-4 formula >40 mL/min and proteinuria below 0.3 g/day) receiving as maintenance immunosuppression the combination of a calcineurin inhibitor (either tacrolimus or cyclosporine) and an anti-metabolite agent (either mycophenolate mofetil or enteric-coated mycophenolic acid) seen at our outpatient clinic between 1 and 30 of November 2011 were invited to participate. The following groups of patients with stable renal function were selected: a) follow up between 12 and 30 months (ST-CNI-1y); b) follow up between 60 and 84 months (ST-CNI-5y) and c) follow up between 120 and 144 months (ST-CNI-10y). Additionally, we also recruited d) a group of stable patients treated with azathioprine and prednisone (ST-AZA) with a very long follow up (between 325 and 364 months), e.) a group of patients diagnosed with chronic humoral rejection (CR) during the last year and f) a group of healthy controls (HC). The diagnosis of chronic humoral rejection was based on the presence of donor specific HLA antibodies (DSA) detected by the Luminex assay and a renal allograft biopsy showing typical rejection lesions (transplant glomerulopathy and/or microcirculation inflammation regardless of the presence of C4d deposition in peritubular capillaries). Patients from ST-CNI-10y group were re-assessed again, three months later, in February 2012.

3.3. Gene expression analysis

Total RNA was obtained using the ABI Tempus whole blood collection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Blood collection was performed following the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using M-MLV

retrotranscriptase enzyme. Template cDNA was added to Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a 12.5 μ l reaction with specific primers and probe for each gene. The primers and probe sets for IGKV1D-13 and IGKV4-1 were purchased as Custom TaqMan® Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and IGLL1 as Assay-on-Demand™ (Hs00252263_m1) according to their Ref Seq in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>; for endogenous housekeeping genes for controls were purchased as in the catalog of Assays-on-Demand™ (Hs99999907_m1 for B2M, Hs00920495_m1 for TBP and Hs01122445_g1 for YWHA). The sequence of primers and probes of Custom TaqMan® Expression Assays are given in Supplementary Table S1.

Gene expression was measured by qPCR using the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the comparative Cq method. Final results were determined as follows: $2^{-(\Delta Cq_{\text{sample}} - \Delta Cq_{\text{calibrator}})}$, where ΔCq values of the calibrator and sample are determined by subtracting the Cq value of the target gene from the geometric mean of three constitutive genes (YWHAZ, BM2 and TBP). Commercial RNA control was used as calibrator (Fist Choice Human Brain Reference RNA; Ambion). The calculations were done following the manufacturer's recommendations contained in Technical Bulletin #2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.4. Validation of gene analysis determined by RT-PCR in a sample of patients from the International Tolerance Network

In order to validate gene expression measures for these genes from Sequenom MassARRAY QGE platform, 30 blood samples provided by the Tolerance Network (ITN) to Pangaea Biotech from 10 tolerant patients (TOL-INT), 10 stable patients (ST-INT) under immunosuppression and 10 healthy controls (HC-INT) were analyzed. IGLL1 gene was not amplified with employed primers. Accordingly, in this study the characterization of tolerance signature relied on IGKV1D-13 and IGKV4-1 gene expression. Correlation plots of log₂-converted data confirmed that IGKV1D-13 and IGKV4-1 genes by RT-PCR accurately distinguish tolerant transplants (TOL-ITN) from stable transplants under immunosuppression (ST-ITN). As it is shown in Fig. 1, the cut-off value to allocate patients in TOL-ITN was established as $\log_2(2^{-(\Delta \Delta Cq)})$ IGKV1D-13 and IGKV4-1 > 7.75 .

3.5. Peripheral blood lymphocyte subset immunophenotyping

For lymphocyte phenotyping on whole blood the following monoclonal antibodies multitest panels CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4APC and CD3-FITC/CD16-PE + 56/CD45-PerCP/CD19-APC (Becton Dickinson) were used. Regulatory T cells (Treg) were identified by staining with FoxP3-PE/CD4-FITC/CD25-APC/CD3-PerCP. For B cell subsets, PBMCs were isolated by density gradient centrifugation in Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences) and stained for CD19-PE/Cy7/IgD-PE/IgM-APC and CD27-FITC, CD24-FITC, CD38-APC and CD86-PerCP-Cy5 in different panels. The following cell subsets were characterized: B naïve (CD19 + IGD + CD27-), B memory (CD19 + IGD + CD27 +), B class switch (CD19 + IGD-CD27-), B transitional (CD19 + CD38 + CD24 + High), Bregs (CD19 + CD38 + CD24 + High) and Tregs (FOXP3 + GATED IN CD3 + CD4 + CD25 high).

Flow cytometric analysis was carried out on a BD FACSCANTOII and data were analyzed with FlowJo software (TriStar, Inc., Ashland, OR, USA).

3.6. HLA antibodies by Luminex assay

Anti-HLA antibodies were measured by the Luminex® technique. The assay applied was LIFECODES LifeScreen Deluxe (Gen-Probe, CA). Patients' Class I and II HLA antibodies were detected using beads coated with purified class I and II antigens. In patients with positive Class I and/or II HLA antibodies, donor specificity was evaluated by LIFECODES LSA

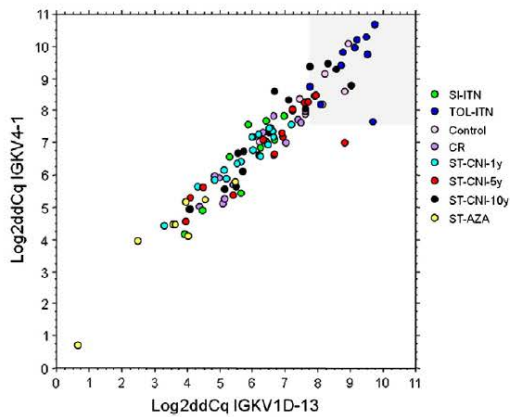


Fig. 1. Correlation plot of log₂ converted data of IGKV1D-13 and IGKV4-1 gene expression by RT-PCR in the evaluated groups. Samples provided by the ITN allowed one to define the tolerant area (gray). The cut-off value to allocate patients in the tolerant gray area was established as log₂(2^{-(ΔΔCq)}) IGKV1D-13 and IGKV4-1 > 7.75. There was one out of 14 transplants (7%) from the ST-CNI-5y group and 4 out of 16 transplants (25%) from the ST-CNI-10y group located within the tolerant area. SI-ITN, samples from patients stable under immunosuppression provided by the ITN; TOL-ITN, samples from tolerant patients provided by the ITN; HC, healthy controls; CR, chronic rejection; ST-CNI-1y, stable patients under calcineurin-based immunosuppression 1 year; ST-CNI-5y, stable patients under calcineurin-based immunosuppression 5 years; ST-CNI-10y, stable patients under calcineurin-based immunosuppression 10 years; ST-AZA, stable under azathioprine-based immunosuppression.

Class I and II Single Antigens. Tests were carried out according to the manufacturer's instructions, using goat anti-human IgG conjugated to phycoerythrin as secondary antibody. For the analysis the Quicktype for Lifematch version 2.5 software was used.

3.7. Statistics

Results were expressed as frequencies for categorical variables and as mean ± standard deviation for normally distributed variables. For

comparison between categorical and continuous normally distributed variables the Chi-squared test and the analysis of variance with post hoc Scheffé's test for individual comparisons, were used respectively. Relationships between quantitative variables were analyzed by Pearson's regression analysis. All p values were two tailed and a p-value < 0.05 was considered significant.

4. Results

4.1. Patients

During the study period we selected 79 renal transplant recipients and 10 healthy controls. Demographic and clinical characteristics of patients are given in Table 1 and Supplementary Table S2. Patients treated with azathioprine were younger at the time of transplantation, had a higher rate of hepatitis viral infection and a lower number of HLA mismatches. Of notice, there were 5 out of 8 azathioprine treated patients who received corticosteroid pulses for a suspected episode of acute rejection during the early post-transplant period. Degree of sensitization, re-transplants and number of acute rejection episodes were higher in patients with chronic rejection. As expected, patients with chronic rejection had poorer graft function, higher proteinuria and lower hemoglobin. Total number and differential count of leukocytes was not different among groups (Supplementary Table S2). Class I and/or class II Donor Specific Antibodies (DSA) were present in all patients with chronic rejection (Table 1). Two out of 14 ST-CNI-5y patients had HLA class I and II antibodies that were donor specific in one case. One out of 16 ST-CNI-10y patient had non donor-specific HLA class I and II antibodies.

4.2. Gene expression analysis

Healthy controls had the highest IGKV1D-13 and IGKV4-1 gene expression levels while AZA treated patients had the lowest expression levels (Table 2). Correlation plots of log₂ converted data of IGKV1D-13 and IGKV4-1 expression showed that there were no patients from the CR, ST-CNI-1y and ST-AZA groups located within the "tolerant" area. But there was one out of 14 transplants (7%) from the ST-CNI-5y group and 4 out of 16 transplants (25%) from the ST-CNI-10y group located within the tolerant area (Fig. 1).

4.3. Lymphocyte subsets

Different lymphocyte subsets were analyzed (Fig. 2 and Table 3). Interestingly, the number of B lymphocytes, especially CD19 + IgM + IgD - CD27 - naïve B cells, increased during follow up in CNI treated patients (Fig. 2a to c). Transitional B cells were significantly higher in ST-CNI-5y than in patients with chronic rejection. On the contrary, patients from ST-AZA group showed a very low number of total and naïve B cells and an increased number of regulatory T cells (Fig. 2d).

There was a positive correlation between the total number of B cells and log₂(2^{-(ΔΔCq)}) for IGKV1D-13 (r = 0.76; p < 0.001) and IGKV4-1 genes (r = 0.75; p < 0.001).

Table 1

Demographic data from controls, donors and transplant recipients as well as transplant-related variables and analytical data in studied groups. CR, chronic rejection; ST-CNI, stable under calcineurin inhibitor treatment; ST-AZA, stable under azathioprine treatment. GN, chronic glomerulonephritis; CTIN, chronic tubule-interstitial nephritis; ADPKD, adult dominant polycystic kidney disease; DN, diabetic nephropathy. HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; Tx, transplantation; HLA mm, number of ABDR HLA donor-recipient mismatches; PRA, panel reactive antibodies by complement dependent cytotoxicity; ATG, anti-thymocyte globuline; anti-IL2R, anti-interleucine 2 receptor antibodies; TAC, tacrolimus; CsA, cyclosporine A; e-GFR-MDRD-4; estimated glomerular filtration rate by the Modification Diet of Renal Disease 4 formula. *p < 0.05 vs. healthy controls; ^bp < 0.05 vs. CR group; ^cp < 0.05 vs. ST-CNI-1y; ^dp < 0.05 vs. ST-CNI-5y; ^ep < 0.05 vs. ST-CNI-10y by Scheffé's test.

Variable	Healthy control (n = 10)	CR (n = 15)	ST-CNI-1y (n = 16)	ST-CNI-5y (n = 14)	ST-CNI-10y (n = 16)	ST-AZA (n = 8)	P
Age	40 ± 11	50 ± 10 ^a	60 ± 16 ^{ab}	52 ± 12 ^a	58 ± 10 ^a	58 ± 7 ^a	<0.001
Gender (m/f)	5/5	7/8	13/3	8/6	13/3	3/5	0.0667
Renal disease (GN/CTIN/ADPKD/DN/vascular/other/unknown)	-	4/3/1/1/0/2/4	3/2/4/1/1/4/1	6/1/0/3/0/0/4	6/3/1/5/1/0/0	3/3/0/0/1/1/0	0.0263
Hepatitis (no/HBV/HCV)	-	11/2/2	15/0/1	13/0/1	16/0/0	4/2/2	0.0480
1st Tx/re-Tx	-	8/7	16/0	11/3	14/2	8/0	0.0061
Donor age	-	39 ± 14	56 ± 19 ^b	39 ± 14 ^c	36 ± 15 ^c	36 ± 9 ^c	0.0037
HLA mm	-	4.2 ± 1.1	4.1 ± 0.9	4.0 ± 1.3	3.4 ± 1.3	2.6 ± 1.2 ^{b,c,d}	0.0174
Peak PRA (%)	-	29 ± 34	0 ^b	6 ± 14 ^b	2 ± 6 ^b	3 ± 8 ^b	<0.001
Induction (no/ATG/anti-IL2R)	-	7/3/5	2/1/13	6/0/8	11/0/4	8/0/0	<0.001
TAC/CsA	-	14/1	16/0	14/0	15/1	-	0.57
Corticosteroids (no/yes)	-	5/10	2/14	9/5	4/12	0/8	0.28
TAC levels (ng/mL)	-	6.5 ± 1.9	8.1 ± 1.9 ^b	6.3 ± 1.4 ^c	6.5 ± 1.3 ^c	-	0.0124
Acute rejection (no/I/II/humoral/not biopsied)	-	6/2/1/4/2	16/0/0/0/0	12/2/0/0/0	16/0/0/0/0	3/0/0/0/5	<0.001
Creatinine (mg/dL)	-	2.4 ± 1.3	1.3 ± 0.4 ^b	1.2 ± 0.5 ^b	1.1 ± 0.4 ^b	1.0 ± 0.2 ^b	<0.001
e-GFR-MDRD-4 (mL/min)	-	33 ± 14	63 ± 21 ^b	71 ± 27 ^b	76 ± 26 ^b	69 ± 16 ^b	<0.001
Proteinuria (g/day)	-	1.4 ± 1.9	0.2 ± 0.1 ^b	0.2 ± 0.1 ^b	0.1 ± 0.1 ^b	0.1 ± 0.0 ^b	<0.001
Class I HLA antibodies (neg/pos)	-	4/11	16/0	12/2	15/1	8/0	<0.001
Class II HLA antibodies (neg/pos)	-	2/13	16/0	12/2	15/1	8/0	<0.001
Follow up (months)	-	99 ± 76	22 ± 4	71 ± 8	133 ± 7	347 ± 26	-

Tesis doctoral: Valor predictivo del fenotipo molecular sobre la progresión de las lesiones renales en biopsias de seguimiento en trasplante renal
 Doctorando: Irina B. Torres Rodríguez

Table 2

$\log_2(2^{(-\Delta\Delta Cq)})$ of the IGKV1D-13 and IGKV4-1 mRNA genes in peripheral blood. CR, chronic rejection; ST-CNI, stable under calcineurin inhibitor treatment; ST-AZA, stable under azathioprine treatment; SI-ITN, samples from patients stable under immunosuppression provided by the ITN; TOL-ITN, samples from tolerant patients provided by the ITN. ^ap < 0.05 vs. healthy controls; ^bp < 0.05 vs. CR group; ^cp < 0.05 vs. ST-CNI-1y; ^dp < 0.05 vs. ST-CNI-5y; ^ep < 0.05 vs. ST-CNI-10y; ^fp < 0.05 vs. ST-AZA; ^gp < 0.05 vs. SI-ITN by Scheffé's test.

Variable	Healthy control (n = 10)	CR (n = 15)	ST-CNI-1y (n = 16)	ST-CNI-5y (n = 14)	ST-CNI-10y (n = 16)	ST-AZA (n = 8)	SI-ITN (n = 10)	TOL-ITN (n = 10)	p-Value
IGKV1D-13	7.66 ± 0.94	6.17 ± 1.40 ^a	5.74 ± 0.99 ^a	6.52 ± 1.49 ^a	6.59 ± 1.36 ^{ac}	3.55 ± 1.45 ^{abc,de}	5.78 ± 0.98 ^{a,f}	9.00 ± 0.67 ^{abc,de,fg}	<0.0001
IGKV4-1	8.19 ± 1.01	6.73 ± 1.39 ^a	6.57 ± 0.83 ^a	6.94 ± 1.28 ^a	7.42 ± 1.47	4.24 ± 1.55 ^{abc,de}	6.25 ± 1.25 ^{a,f}	9.47 ± 0.98 ^{abc,de,fg}	<0.0001

4.4. Lymphocyte subsets and genetic signature of tolerance in ST-CNI-10y

Fifteen out of the 16 patients in the ST-CNI-10y group were reevaluated 3 months later (November 2011 and February 2012). There were two patients in whom $\log_2(2^{(-\Delta\Delta Cq)})$ for IGKV1D-13 and IGKV4-1 genes was >7.75 in both studies while there were four patients with $\log_2(2^{(-\Delta\Delta Cq)})$ for IGKV1D-13 and IGKV4-1 genes >7.75 in only one of the two studies. In the remaining 9 patients genetic signature of tolerance was not observed in any of both determinations. We study the relationship between these 3 groups of patients and the number of different lymphocyte subsets expressed as the mean number of cells obtained at both time points. As shown in Table 4, total B cells and memory B cells were significantly lower in patients not expressing the tolerance signature in comparison to the other two groups. Naive, class-switch and transitional B cells were significantly higher in patients expressing the genetic signature of tolerance. The total number of T lymphocytes and different T cell subsets were not different between these 3 groups (data not shown).

5. Discussion

In the present study we evaluated the expression of IGKV1D-13 and IGKV1-4 genes in different groups of renal transplants patients as markers of operational tolerance. Patients from local cohorts and from the Immune Tolerance Network have been evaluated. A third gene (IGLL1) included in the report of Newell et al. [16] which

follows the present study, was not included due to amplification failure by RT-PCR.

We confirm that it was possible on the basis of IGKV1D-13 and IGKV1-4 gene expression levels to accurately differentiate true operational tolerant from stable transplants under immunosuppression evaluated by the ITN. Based on this first analysis, we arbitrarily set the threshold of tolerance as the lower level of IGKV1D-13 and IGKV1-4 gene expression found among truly tolerant patients, and below it, we considered patients as non-tolerant. We have applied a strict definition of tolerance to avoid an area of uncertainty between the true tolerant patients with relatively low expression of both genes and the stable patients under immunosuppression with a relatively high expression of them. We reasoned that in a hypothetical weaning trial, it is more risky to misclassify a non-tolerant than a tolerant patient.

Operational tolerance in kidney transplants is more often detected in patients that have carried the graft for a long time [17,18]. Likewise, in liver transplants, the probability of acute rejection during immunosuppression weaning protocols is higher in patients with a short follow up [20]. In the present study, the proportion of CNI treated patients fulfilling the definition of tolerance based on IGKV1D-13 and IGKV1-4 gene

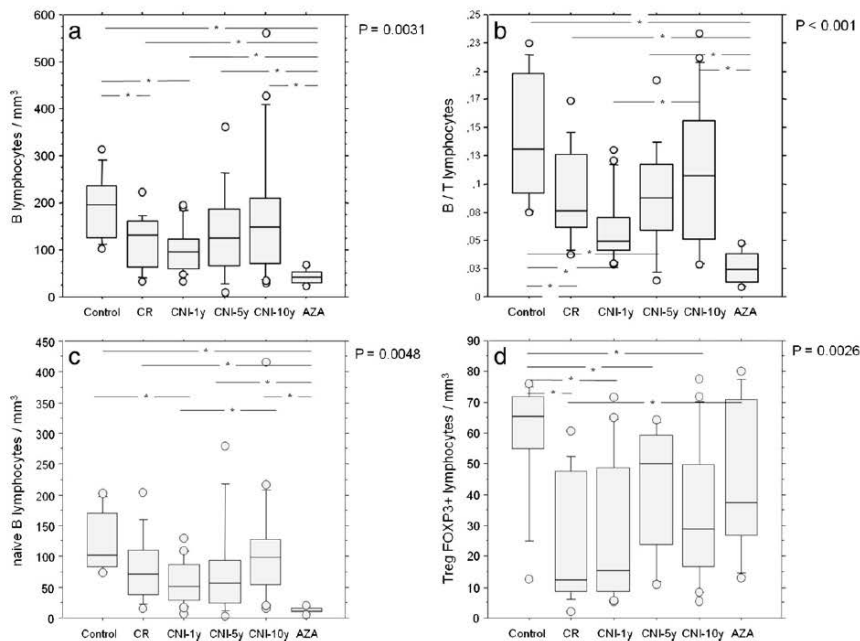


Fig. 2. Lymphocyte subsets in the evaluated groups. Total B lymphocytes (2a), B/T lymphocyte ratio (2b), naïve B lymphocytes (2c) and T reg FOXP3 positive cells (2d). * p value < 0.05 by Scheffé's post hoc test for individual comparisons. HC, healthy controls; CR, chronic rejection; ST-CNI-1y, stable under calcineurin-based immunosuppression 1 year; ST-CNI-5y, stable under calcineurin-based immunosuppression 5 years; ST-CNI-10-y, stable under calcineurin-based immunosuppression 10 years; ST-AZA, stable under azathioprine-based immunosuppression.

Tesis doctoral: Valor predictivo del fenotipo molecular sobre la progresión de las lesiones renales en biopsias de seguimiento en trasplante renal
 Doctorando: Irina B. Torres Rodríguez

Table 3
 Lymphocyte subsets in peripheral blood. CR, chronic rejection; ST-CNI, stable under calcineurin inhibitor treatment; ST-AZA, stable under azathioprine treatment. ^ap < 0.05 vs. healthy controls; ^bp < 0.05 vs. CR group; ^cp < 0.05 vs. ST-CNI-1y; ^dp < 0.05 vs. ST-CNI-5y; ^ep < 0.05 vs. ST-CNI-10y. For cell phenotype definition see text.

Variable	Healthy control (n = 10)	CR (n = 15)	ST-CNI-1y (n = 16)	ST-CNI-5y (n = 14)	ST-CNI-10 (n = 16)	AZA (n = 8)	p
T lymphocytes ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1.49 ± 0.58	1.43 ± 0.73	1.76 ± 0.76	1.49 ± 0.62	1.53 ± 0.66	1.91 ± 0.77	ns
Th lymphocytes ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.97 ± 0.42	0.84 ± 0.54	0.87 ± 0.48	0.84 ± 0.42	0.98 ± 0.38	0.99 ± 0.63	ns
Tc lymphocytes ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.49 ± 0.18	0.54 ± 0.37	0.84 ± 0.49 ^{ab}	0.58 ± 0.28	0.55 ± 0.42 ^c	0.85 ± 0.40	0.0792
B lymphocytes ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.19 ± 0.07	0.12 ± 0.06 ^a	0.10 ± 0.05 ^a	0.13 ± 0.09 ^a	0.17 ± 0.14 ^a	0.04 ± 0.02 ^{abd,e}	0.003
NK cells ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0.16 ± 0.05	0.12 ± 0.06	0.39 ± 0.30 ^{ab}	0.19 ± 0.11 ^c	0.29 ± 0.22 ^b	0.25 ± 0.46	0.028
B/T ratio (%)	0.14 ± 0.05	0.09 ± 0.04 ^a	0.06 ± 0.03 ^a	0.09 ± 0.05 ^a	0.11 ± 0.06 ^c	0.03 ± 0.01 ^{abd,e}	<0.001
B naïve (/mm ³)	121 ± 49	80 ± 55	58 ± 36 ^a	81 ± 79	112 ± 96 ^c	12 ± 5 ^{abd,e}	0.0048
B memory (/mm ³)	33 ± 26	11 ± 11 ^a	14 ± 9 ^a	13 ± 10 ^a	19 ± 18 ^a	8 ± 7 ^a	0.0038
B Class switch (/mm ³)	31 ± 17	19 ± 20	20 ± 16	26 ± 23	33 ± 38	16 ± 6	ns
B transitional (/mm ³)	35 ± 21	14 ± 12 ^a	20 ± 16	33 ± 32 ^b	27 ± 21	14 ± 5 ^{ad}	0.0537
B regulatory (/mm ³)	11 ± 7	5 ± 10	4 ± 4	8 ± 10	7 ± 7	4 ± 8	ns
Th CD25high (/mm ³)	86 ± 33	45 ± 30 ^a	81 ± 59 ^b	60 ± 38	75 ± 38	104 ± 80 ^{ad}	0.0795
T regulatory (/mm ³)	52 ± 24	14 ± 17 ^a	26 ± 35 ^a	21 ± 13 ^a	22 ± 14 ^a	40 ± 29 ^b	0.0026

expression is increased in the cohorts of patients with longer follow up, further suggesting that tolerance signature arises late after transplantation. However, it should be noticed that the cross-sectional design of our study is inherently biased since patients not reaching 1, 5 and 10 years of follow up with stable function are not considered. Anyway, our cross sectional design allows to describe the prevalence of tolerance signature in stable grafts at different time points. Despite this limitation, we interpret that weaning protocols for stable kidney transplant should be aimed at patients with a long follow up. We confirmed that the expression of IGKV1D-13 and IGKV1-4 genes was the highest in tolerant patients from the ITN and significantly higher in healthy controls in comparison to CNI treated patients either stable or diagnosed of chronic rejection. Tolerance signature was also markedly influenced by the type of immunosuppression regimen administered i.e., none of the azathioprine treated patients showed a tolerance signature despite a prolonged follow up of nearly 30 years in some cases. Of notice, in azathioprine-treated patients IGKV1D-13 and IGKV1-4 gene expression was even lower than in patients with chronic rejection.

It has been previously shown that peripheral total, naïve and transitional B cells are increased in true tolerant patients [16]. In the present study, we also observed that these cell populations were increased in stable grafts treated with CNI and, accordingly, there was a significant correlation between these B cell populations and the expression of IGKV1D-13 and IGKV1-4 genes, our biomarkers of tolerance. On the contrary, in azathioprine treated patients, naïve and transitional cells were even lower than in patients with chronic rejection.

Taken together, our data suggest that apart from time of follow up, the type of immunosuppressive regime modulates B cell subpopulations and their linked biomarkers after transplantation. The explanation for these differences is not obvious. The groups of patients differed in some demographic features, donor age, patient age at transplant, number of HLA mismatches, the number of acute rejection episodes and time of follow up but they are not likely to explain for the above described marked differences in B cells and their linked biomarkers. In healthy controls there was an inverse correlation between age and B

cell subpopulations (data not shown) but age among the transplant groups was too similar to account for the differences in the B cell biomarkers. More likely the reason for the special characteristics of stable azathioprine treated recipients arises for intrinsic differences between azathioprine and CNI on the immune system as demonstrated in experimental settings [21]. On the other hand, it has been proposed that long term surviving grafts in patients on AZA constitute just a selection of cases with a favorable immune adaptation to the graft regardless the immunosuppression protocols and may possess some unique immunological characteristics. Of interest AZA but not CNI treated stable patients had a higher number of regulatory peripheral T-lymphocytes than patients with chronic rejection. This finding suggests that different immunosuppressive schedules modulate the immune cell populations that participate in the graft acceptance. This observation deserves further investigation.

The reason of IGKV1D-13 and IGKV1-4 genes overexpression in operational tolerant patients remains unexplained. Newell et al. [16] invoked the possibility that this gene families are expanded in the naïve and transitional B cells which being poor antigen presenting cells favor tolerance rather than an effector immune response. Yet the role of these cell subsets in the regulation of the immune response is not well established. Alternatively, the expansion may be due to a superantigen effect [22], to the expansion of putative IgG4 memory B cells [23] or other regulatory-B cells [24], but this is speculative and all needs further investigation.

In the ST-CNI-10y cohort, genetic signature of tolerance and B cell populations were determined 3 months apart. It is remarkable that despite our stringent definition of the genetic signature of tolerance, two out of 15 patients consistently showed this signature. Additionally, there were 4 patients showing this genetic signature in one determination. Of note, in these 4 patients, B cells subsets were also expanded and even some B cell populations were not different from patients with a consistent expression of the genetic signature of tolerance suggesting that there is a grading of the expression of tolerance biomarkers. According to this observation we interpret that clinical trials aimed to

Table 4
 B cell subsets in calcineurin inhibitor treated patients at 10 years of follow up. Number of cells is calculated as the mean of the two studies done 3 months apart. ^ap < 0.05 vs. no signature of tolerance in any determination; ^bp < 0.05 vs. signature of tolerance in one determination by Scheffé's test.

B cells	No signature of tolerance in any determination (n = 9)	Signature of tolerance in 1 determination (n = 4)	Signature of tolerance in 2 determinations (n = 2)	p-Value
Total B cells (/mm ³)	95 ± 55	232 ± 74 ^a	344 ± 255 ^a	0.0138
Naïve B cells (/mm ³)	46 ± 30	96 ± 17	158 ± 151 ^a	0.0468
Memory B cells (/mm ³)	5 ± 14	19 ± 13 ^a	19 ± 8 ^a	0.0204
Class-switch B cells (/mm ³)	8 ± 7	28 ± 25	42 ± 26 ^a	0.0353
Transitional B cells (/mm ³)	12 ± 10	23 ± 11	29 ± 2 ^a	0.0848
Regulatory B cells (/mm ³)	3 ± 2	5 ± 2	8 ± 10	0.18

Tesis doctoral: Valor predictivo del fenotipo molecular sobre la progresión de las lesiones renales en biopsias de seguimiento en trasplante renal

Doctorando: Irina B. Torres Rodríguez

16

F. Moreso et al. / *Transplant Immunology* 31 (2014) 11–16

immunosuppression weaning should include only patients with a consistent tolerance signature for safety reasons.

In summary, we have confirmed in a different setting that the expression of IGKV1D-13 IGKV1-4 genes and its linked B cell populations are increased in stable CNi treated patients with longer follow up. At 10 years, 2 out of 15 CNi-treated patients consistently express biomarkers associated with true tolerance. However, the genetic signature of tolerance and B cell subsets were down-regulated in stable AZA treated patients followed for a very long period of time, suggesting that type of treatment also influences tolerance signature.

Conflict of interest

None to declare.

Authors' contribution to the research

Francesc Moreso and Daniel Serón contributed to the design, analysis, interpretation of data, and contributed in drafting the article and in the final approval.

Irina B. Torres contributed in the acquisition and analysis of data and final approval.

Monica Martinez-Gallo, Carme Cantarell and Manel Perelló contributed in the acquisition of data and final approval.

Susana Benlloch and José Jimeno contributed to the design, acquisition of data, analysis and interpretation of data and final approval.

Ricardo Pujol Borrell contributed to interpretation of data, in drafting the article and final approval.

Acknowledgments

IB Torres was supported by a Vall Hebron Research Institute grant. This study was partly supported by a Fondo Investigación Sanitaria (PI10-02496) and a REDinREN Instituto Carlos III RD 12/0021/0013 grant.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2014.04.008>.

References

- [1] Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999;341:1725–30.
- [2] Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long term renal allograft survival: have we made significant progress or is time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004;4:1289–95.
- [3] Seron D, Moreso F, Arias M, Campistol JM, Curto J, Hernandez D, et al. Estimation of renal allograft half-life: fact or fiction? *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:3013–8.
- [4] Registre de Malalts Renals de Catalunya. In: Servei Catala de la Salut, Organització Catalana de Trasplantaments (OCATT), editors. Statistical Report 2009; August 2011 [Barcelona].
- [5] Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349(24):2326–33.
- [6] Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004;78:557–65.
- [7] Miller LW. Cardiovascular toxicities of immunosuppressive agents. *Am J Transplant* 2002;2:807–18.
- [8] London NJ, Farmery SM, Will EJ, Davison AM, Lodge JPA. Risk of neoplasia in renal transplant patients. *Lancet* 1995;346:403–6.
- [9] United States Renal Data System. *USRDS 2008 Annual Data Report*. Available at: www.usrds.org. [Accessed November 8, 2009].
- [10] Hazzan M, Labelette M, Copin MC, Glowacki F, Provôt F, Pruv FR, et al. Predictive factors of acute rejection after early cyclosporine withdrawal in renal transplant recipients who receive mycophenolate mofetil: results from a prospective randomized trial. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2509–16.
- [11] 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 non-adherence. *Am J Transplant* 2012;12:388–99.
- [12] Brouard S, Le Bars A, Dufay A, Gosselin M, Foucher Y, Guillet M, et al. Identification of a gene expression profile associated with operational tolerance among a selected group of stable kidney transplant recipients. *Transpl Int* 2011;24:536–47.
- [13] Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tison G, Lerut J, et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* 2008;118:2845–57.
- [14] Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104(39):15448–53.
- [15] Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 1848–1861;120(6):2010.
- [16] Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gislis TD, Bouncier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 1836–1847;120(6):2010.
- [17] Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, Subra JF, Legendre C, Noël C, et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006;6:736–46.
- [18] Brouard S, Pallier A, Renaudin K, Foucher Y, Danger R, Devys A, et al. The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am J Transplant* 2012;12:3296–307.
- [19] Benitez C, Lozano JJ, Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Lopez M, Rodríguez A, et al. Use of transcriptional biomarkers to identify liver transplant recipients who can successfully discontinue immunosuppressive therapy (abstr 213). Paper presented at: American Transplant Congress; May 20–Jun 3, 2009; Boston, MA, 9. *Am J Transplant*; 2009, p. 252.
- [20] Benitez C, Londoño MC, Miquel R, Manzia TM, Abalde JG, Lozano JJ, et al. Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology* 2013;58(5):1824–35.
- [21] Salinas-Carmona MC, Perez LI, Galan K, Vazquez AV. Immunosuppressive drugs have different effect on B lymphocyte subsets and IgM antibody production in immunized BALB/c mice. *Autoimmunity* 2009;42(6):537–44.
- [22] Gronwall C, Kosakovsky Pond SL, Young JA, Silverman GJ. In vivo VL-targeted microbial superantigen induced global shifts in the B cell repertoire. *J Immunol* 2012;189(2):850–9.
- [23] Karagiannis P, Gilbert AE, Josephs DH, et al. IgG4 subclass antibodies impair antitumor immunity in melanoma. *J Clin Invest* 2013;123(4):1457–74.
- [24] Mauri C. Regulation of immunity and autoimmunity by B cells. *Curr Opin Immunol* 2010;22:761–7.

4.3. **Torres IB**, Salcedo M, Moreso F, Sellares J, Castella E, Azancot MA, Perello M, Cantarell C, Seron D. Comparing transplant glomerulopathy in the absence of C4d deposition and donor-specific antibodies to chronic antibody-mediated rejection. Clin Transplant. 2014 Oct; 28 (10): 1148-54. doi: 10.1111/ctr.12433.

Resumen. En este estudio retrospectivo observacional realizado en pacientes trasplantados renales, se han evaluado 67 pacientes con una biopsia por disfunción tardía (>6 meses) realizadas entre enero de 2007 y diciembre de 2010 y se han clasificado según los criterios de Banff. Hemos considerado como una categoría distinta a los pacientes que presentaban cambios de glomerulopatía del trasplante sin evidencia de depósito de C4d y sin anticuerpos anti-HLA en ausencia de cambios de microangiopatía trombótica, infección por el virus de la hepatitis C o recurrencia de la enfermedad de base. Se realizó determinación de anticuerpos anti-HLA por tecnología Luminex y se cuantificó el infiltrado celular del injerto mediante inmunohistoquímica. Finalmente comparamos los pacientes con glomerulopatía del trasplante que cumplían criterios de rechazo crónico humoral (n=17) con aquellos que presentaban glomerulopatía del trasplante aislada (n=12). Nuestros resultados demostraron que los pacientes que presentaban glomerulopatía del trasplante aislada recibieron injertos de donantes más añosos, y mostraron menor inflamación en los compartimentos glomerular, intersticial y en capilares peritubulares. Se ha concluido que la glomerulopatía del trasplante aislada está asociada con una inflamación menos severa en la microcirculación y con una mejor supervivencia del injerto que los pacientes con rechazo crónico humoral.

Comparing transplant glomerulopathy in the absence of C4d deposition and donor-specific antibodies to chronic antibody-mediated rejection

Torres IB, Salcedo M, Moreso F, Sellarés J, Castellá E, Azancot MA, Perelló M, Cantarell C, Serón D. Comparing transplant glomerulopathy in the absence of C4d deposition and donor-specific antibodies to chronic antibody-mediated rejection.

Abstract: Introduction: Transplant glomerulopathy (TG) is the characteristic lesion of chronic antibody-mediated rejection (AMR). However, in some patients presents with no circulating HLA antibodies or C4d positivity.

Aim: Patients with TG accomplishing criteria for chronic AMR were compared to patients with isolated TG.

Patients and Methods: We reviewed late (>6 months) graft biopsies performed between 2007 and 2010 (n = 75). Biopsies with C4d-negative TG and no circulating donor-specific antibody were called isolated TG (n = 12), and chronic AMR was defined according to Banff consensus (n = 17). HLA antibodies were evaluated by Luminex technology. Immunohistochemistry was performed to quantify graft infiltrating cells.

Results: Patients with isolated TG were older (52 ± 14 vs. 35 ± 14 ; $p = 0.0048$), received grafts from older donors (54 ± 16 vs. 41 ± 18 ; $p = 0.0554$), and displayed a lower inflammation in the glomerular (g-score: 0.5 ± 0.5 vs. 1.0 ± 0.9 ; $p = 0.0865$; CD3 positive cells/glomeruli: 1.5 ± 2.9 vs. 4.4 ± 4.1 ; $p = 0.0147$), interstitial (i-score: 1.2 ± 0.9 vs. 1.9 ± 1.0 ; $p = 0.0685$; CD45 positive cells/hpf: 18 ± 11 vs. 57 ± 68 ; $p = 0.0132$), and peritubular capillary (ptc-score 0.2 ± 0.6 vs. 1.1 ± 0.9 ; $p = 0.0089$; CD45 positive cells/hpf: 3.7 ± 3.1 vs. 10.1 ± 7.4 ; $p = 0.0290$) compartments. Fifteen grafts were lost and graft survival was significantly lower in patients with chronic AMR ($p = 0.0122$).

Conclusion: Isolated TG is associated with less severe allograft inflammation and with a better outcome than chronic AMR.

Irina B. Torres^a, Maite Salcedo^b, Francesc Moreso^a, Joana Sellarés^a, Eva Castellá^c, M. Antonieta Azancot^a, Manel Perelló^a, Carme Cantarell^a and Daniel Serón^a

^aDepartment of Nephrology, ^bDepartment of Pathology and ^cDepartment of Radiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma Barcelona, Barcelona, Spain

Key words: transplant glomerulopathy – donor-specific antibodies – chronic antibody-mediated rejection

Corresponding author: Dr. Francesc Moreso, Department of Nephrology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 274 60 79; fax: +34 93 489 44 38; e-mail: fjmoreso@vhebron.net

Conflict of interest: None

Accepted for publication 4 August 2014

Renal transplantation is the best treatment for end-stage renal disease (1). The introduction of new immunosuppressive drugs has led to a reduction of acute rejection rate and an improvement of one-yr graft survival. However, long-term outcomes have been only marginally modified (2, 3). The main causes of late graft failure are death with a functioning graft, chronic antibody-mediated rejection (AMR), and recurrent or *de novo* glomerulonephritis (4, 5).

Chronic AMR was defined at the 2005 Banff meeting as the presence of suggestive morphological features (transplant glomerulopathy [TG], peritubular capillary basement membrane multilayering, transplant vasculopathy, and interstitial

fibrosis/tubular atrophy), C4d deposition in the peritubular capillaries and the presence of donor-specific antibodies (DSA). Patients with only two of these criteria were considered suspicious for chronic AMR (6). Recently, the sensitivity of C4d deposition as a diagnostic marker for AMR has been questioned. In late biopsies for cause, microcirculation inflammation (glomerulitis and peritubular capillary inflammation) was strongly associated with the presence of DSA and graft outcome regardless of C4d status, suggesting the existence of C4d-negative AMR (7). This notion has been reinforced by the observation that endothelial activation in patients with TG and DSA was associated with worse outcomes but not with

Torres et al.

C4d deposition. Similarly, in sensitized patients, surveillance biopsies show that microcirculation inflammation is associated with an increased risk for progression of chronic damage including TG, irrespective of C4d deposition (8, 9). All this evidence has led to the acceptance of the category of C4d-negative AMR in the last update of the Banff classification (10).

Transplant glomerulopathy has been considered the characteristic lesion of chronic AMR. It is recognized by the presence of glomerular capillary double contours without immune deposits. It is a time-dependent entity that is rarely diagnosed clinically during the first year post-transplant in cross-match negative patients and the reported prevalence in clinical indication biopsies varies from 2% to 7% (11), although this might be an underestimation as surveillance biopsy studies show that its prevalence at five yr post-transplant increases to 20% (12, 13). Electron microscopy studies in protocol biopsies have shown that morphologic changes associated with the subsequent development of overt TG can be seen within the first one to three months post-transplantation (12, 14).

A variable proportion of patients with TG, ranging between 20% and 60%, do not display anti-HLA antibody (DSA or non-DSA) or C4d deposition, suggesting that other mechanisms different from HLA antibody-mediated damage may trigger this histological lesion (15, 16). In the present study, we compare clinical characteristics, histological lesions, and outcome in patients presenting for late biopsies for cause displaying TG with or without HLA donor-specific antibodies.

Patients and methods

Evaluation of biopsies by optical microscopy

We reviewed from our pathology files late (>6 months) renal transplant biopsies performed between January 2007 and December 2010. Biopsies were processed for routine light microscopy and stained with hematoxylin-eosin, periodic acid Schiff (PAS), Masson's trichrome, and silver-methenamine. Sample adequacy and renal lesions were evaluated and diagnosed according to the Banff criteria in the absence of any clinical information (10). Additionally, interstitial inflammation in areas of interstitial fibrosis (i-IFTA) and tubulitis in areas of tubular atrophy (t-IFTA) were also evaluated according to the schema defined by Mannon et al. (17). To evaluate tubular damage, isometric vacuolization, acute tubular

injury, and tubulo-interstitial calcification were also graded.

The presence of thrombotic microangiopathy defined by glomerular thrombi or mucoid intimal thickening in arteries/arterioles or red blood cell fragments in the wall of arteries/arterioles was evaluated in all biopsies.

A slide was stained for evaluating BK polyomavirus nephropathy using an anti-SV40 antibody (18).

Immunofluorescence studies

In all cases, a core of tissue was embedded in OCT, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C . For immunofluorescence studies, 3- μm cryostat sections were stained with FITC-conjugated anti-human IgG, IgA, IgM, C3, κ and λ light chain (Dako, Barcelona, Spain). A three-step indirect immunofluorescence with a monoclonal antibody against C4d was employed (Biogenesis, Vitro SA, Sevilla, Spain). C4d deposition in peritubular capillaries was graded according to the recent updated Banff criteria: Minimal or no deposition of C4d in peritubular capillaries was considered negative (C4d0; C4d1), whereas focal or diffuse C4d (C4d2; C4d3) was considered positive (10).

Immunohistochemistry

Biopsies were processed for immunohistochemistry studies as previously described (19). The following graft infiltrating cells were evaluated: all leukocytes (CD45), T lymphocytes (CD3), B lymphocytes (CD20), monocytes/macrophages (CD68), plasma cells (CD138), and NK cells (CD56). At 400 \times magnification, a count was made of the number of positive cells for each antibody in the glomerular tuft, tubulo-interstitial area, and peritubular capillaries. The results were expressed as the mean number of positive cells per glomerular section and the mean number of positive cells per field at 400 \times in the interstitial and capillary compartments. All available glomeruli and the whole cortex were counted.

HLA antibodies

Anti-HLA antibodies at the time of biopsy were determined by Luminex methodology. Class I and II antibodies using mixed beads coated with purified class I and II antigens were determined with LIFECODES LifeScreen Deluxe (GenProbe, Sand Diego, CA, USA). In patients with positive class I and/or class II HLA antibodies, specificity was evaluated by single antigen tech-

Transplant glomerulopathy and DSA

nique (LIFECODES LSA Class I and II single antigen that comprises over 90 different HLA-A, HLA-B, and HLA-Cw recombinant antigens and over 60 HLA-DRB, -DQB, and -DPB recombinant antigens).

HLA typing for A, B, and DR loci were available for all donors. Before 2002, HLA characterization was based on serotyping and on DNA-based HLA-typing techniques thereafter. In patients with positive HLA-DQ, the presence/absence of DSA was assigned according to linkage disequilibrium for DR-DQ types (20). When only donor HLA serotyping was available, DSA was assigned according to the genetic linkage for the HLA-DR serogroups (21).

A second blood sample to evaluate the presence of DSA was obtained approximately two yr after biopsy.

Clinical variables and definitions

The following clinical variables were collected in all cases: demographic characteristics of donors and recipients, primary renal disease, serology of hepatitis B and C virus, number of transplant, HLA A-B-DR mismatches as well as induction and maintenance immunosuppression. After transplant, the presence of delayed graft function and biopsy proven acute rejection evaluated according to the Banff criteria were recorded. At the time of biopsy, serum creatinine and proteinuria were determined.

Chronic AMR was defined according to the Banff criteria (10), that is, biopsies displaying TG plus microvascular inflammation plus DSA regardless of C4d deposition in peritubular capillaries. On the other hand, isolated TG was defined as biopsies displaying TG without evidence of C4d deposition (C4d0; C4d1 by immunofluorescence) and without DSA at the time of biopsy.

Statistics

Results are expressed as raw numbers for categorical variables and as the mean \pm standard deviation for continuous variables. Comparison between groups for categorical variables was done by Fisher's exact test. Comparison between groups for ordinal and continuous not normally distributed variables was done by Mann-Whitney's *U*-test. Comparison between groups for continuous normally distributed variables was done by Student's *t*-test. Graft survival was calculated by the Kaplan-Meier method, and comparison between groups was done by log-rank test. All tests are two-tailed and a *p*-value < 0.05 was considered significant.

Results

Patients and biopsies

During the study period, 75 biopsies for cause were performed in 67 patients. In 59 cases, there was one biopsy and in eight cases there were two biopsies per patient. According to the Banff criteria, biopsies were classified as follows: acute cellular rejection ($n = 8$), acute AMR ($n = 2$), acute tubular injury ($n = 2$), chronic calcineurin inhibitor toxicity ($n = 1$), BK virus nephropathy ($n = 6$), recurrent/*de novo* glomerulonephritis ($n = 18$), IF/TA ($n = 8$) and chronic AMR ($n = 17$). Also, patients fulfilling the criteria for isolated TG ($n = 12$) were considered as a separate diagnostic category (TG without evidence of C4d deposition and without DSA at the time of biopsy). One patient displaying TG without C4d deposition and without DSA at the time of biopsy but with a previous biopsy showing microcirculation inflammation with C4d deposition and without DSA was not considered for this study as it not accomplished criteria for chronic AMR (absence of DSA) and it cannot be considered isolated TG due to histological findings in the previous biopsy.

Finally, for the present study, only patients with chronic AMR ($n = 17$) and isolated TG ($n = 12$) were considered. These patients had only one biopsy performed during the study period.

Clinical data from patients with chronic AMR and isolated TG

Demographics and clinical evolution after renal transplantation in patients diagnosed with chronic AMR and isolated TG are shown in Table 1. Patients with isolated TG received grafts from older donors and were older than patients with chronic AMR. The proportion of patients who had glomerulonephritis as the primary disease was lower in patients with chronic AMR. On the contrary, the proportion of re-transplants, patients with chronic hepatitis C virus infection, and patients with previous episodes of acute cellular rejection was higher in patients with chronic AMR, although these differences were on the verge of significance.

Timing of biopsy, serum creatinine, and proteinuria at the time of biopsy were not different between groups (Table 1). Patients with isolated TG tended to have a higher systolic blood pressure at the time of biopsy and to receive a higher number of antihypertensive drugs than patients with chronic AMR. All patients with the diagnosis of chronic AMR had DSA at the time of biopsy (class

Tesis doctoral: Valor predictivo del fenotipo molecular sobre la progresión de las lesiones renales en biopsias de seguimiento en trasplante renal
Doctorando: Irina B. Torres Rodríguez

Torres et al.

Table 1. Demographics, clinical evaluation, and clinical data at the time of biopsy from patients diagnosed with isolated transplant glomerulopathy (TG) and chronic antibody-mediated rejection (AMR)

Variable	Isolated TG (n = 12)	Chronic AMR (n = 17)	p-Value
Donor age (yr)	54 ± 16	41 ± 18	0.0554
Patient age (yr)	52 ± 14	35 ± 14	0.0048
Patient gender (m/f)	11/2	11/7	Ns
Primary renal disease			
Glomerular	5	1	0.0782
Chronic tubulo-interstitial nephritis	0	6	
Adult polycystic kidney disease	2	2	
Diabetes mellitus	1	1	
Unknown origin	3	3	
Other	1	4	
HCV serology (negative/positive)	12/0	12/5	0.0558
Number of transplant (1/>1)	12/0	12/5	0.0558
Pre-transplant PRA (%)	0	13 ± 29	Ns
A + B + DR mismatches	3.4 ± 1.6	3.8 ± 0.9	Ns
Induction treatment (none/anti-IL2 receptor antibodies/Thymoglobulin)	2/8/2	9/7/1	Ns
Maintenance treatment (FK + MMF/others)	11/1	13/5	Ns
Delayed graft function (no/yes)	8/4	11/6	Ns
Acute rejection (no/yes)	12/0	12/5	0.0558
Timing of biopsy (months after transplant)	68 ± 53	90 ± 75	Ns
Serum creatinine at biopsy (mg/dL)	2.1 ± 0.7	2.6 ± 2.3	Ns
Proteinuria at biopsy (g/d)	1.4 ± 1.3	1.3 ± 1.2	Ns
Mean blood pressure at biopsy (mmHg)	102 ± 12	104 ± 10	Ns
Systolic blood pressure (mmHg)	151 ± 16	140 ± 13	0.0602
Number of antihypertensive drugs at biopsy	2.4 ± 1.4	1.4 ± 1.3	0.080

PRA, panel reactive antibodies; HVC, hepatitis C virus; FK+MMF, tacrolimus combined with mycophenolate mofetil.

I, n = 2; class II, n = 8; and class I/II, n = 7). All patients diagnosed with isolated TG had a negative staining for C4d (C4d0) and no circulating HLA antibodies.

The determination of HLA antibodies was repeated in 23 of 29 patients at 20 ± 8 months (range 4–29 months). In the isolated TG group, HLA antibodies remained negative in 10 of 12 cases. Of these two cases, one patient had DSA class II (DQB1*06:02 with a MFI 10241) detected 28 months after the biopsy, and in the other the determination of HLA antibodies could not be performed as the patient was on dialysis. In 13 of 17 patients with chronic AMR, HLA antibodies were

Table 2. Scoring of Banff lesions and non-standardized lesions in biopsies classified as isolated transplant glomerulopathy (TG) and chronic antibody-mediated rejection (AMR)

Variable	Isolated TG (n = 12)	Chronic AMR (n = 17)	p-Value
Number of glomerular sections	15 ± 4	17 ± 10	Ns
% Glomerulosclerosis	22 ± 12	29 ± 22	Ns
g-score	0.5 ± 0.5	1.0 ± 0.9	0.0865
i-score	1.2 ± 0.9	1.9 ± 1.0	0.0685
t-score	0.2 ± 0.4	0.6 ± 1.1	Ns
i + t	1.5 ± 1.2	2.5 ± 1.8	Ns
v-score	0.2 ± 0.7	0.5 ± 0.9	Ns
ah-score	1.2 ± 1.2	2.0 ± 1.1	Ns
cg-score	1.6 ± 0.7	1.9 ± 0.9	Ns
ci-score	1.5 ± 0.7	1.9 ± 0.5	0.0640
ct-score	1.5 ± 0.7	1.5 ± 0.9	Ns
cv-score	1.5 ± 1.1	1.6 ± 0.7	Ns
ptc-score	0.2 ± 0.6	1.1 ± 0.9	0.0089
g + ptc	0.7 ± 0.7	2.1 ± 1.5	0.0072
mm-score	0.8 ± 1.0	1.3 ± 1.0	Ns
i-IFTA	1.8 ± 1.3	2.1 ± 1.7	Ns
t-IFTA	0.4 ± 0.5	0.8 ± 0.7	Ns
ati-score	0.6 ± 0.7	0.5 ± 0.9	Ns
iv-score	0.5 ± 0.7	0.2 ± 0.3	0.0528
tic-score	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	Ns

Abbreviations of individual scores g, i, t, v, ah, cg, ci, ct, cv, ptc, and mm are as per Banff criteria. I-IFTA, inflammation in areas of interstitial fibrosis/tubular atrophy; t-IFTA, tubulitis in areas of interstitial fibrosis/tubular atrophy; ati, acute tubular injury; iv, isometric vacuolization; tic, tubulo-interstitial calcification.

repeated and remained positive in 11 cases. Two of 13 patients were negative in the follow-up DSA determination. In one patient non-adherence was documented, in whom HLA antibodies were determined after the reintroduction of immunosuppression and the other received treatment with immunoglobulins and rituximab. In the remaining four patients with chronic AMR, HLA antibody testing was not repeated because of graft failure.

Histological data from patients with chronic AMR and isolated TG

Banff scores as well as scores for non-standardized lesions in biopsies from patients with isolated TG and chronic AMR are shown in Table 2. Lesions suggestive of thrombotic microangiopathy were not observed in any of them and immunofluorescence studies discarded the presence of glomerulonephritis. Patients with chronic AMR had a higher degree of microcirculation inflammation while degree of interstitial inflammation was of borderline significance.

Eight of 17 cases (47%) diagnosed with chronic AMR showed a positive C4d staining in the peritubular capillaries (two diffuse and six focal).

Transplant glomerulopathy and DSA

To further investigate characteristics of the graft infiltrating cells in patients diagnosed with isolated TG and chronic AMR, an immunohistochemistry study was conducted in biopsies with sufficient tissue for evaluation (10/12 cases with isolated TG and 11/17 cases with chronic AMR). The severity of inflammation was higher in patients diagnosed with chronic AMR in the glomerular, interstitial, and peritubular compartments (Table 3). However, the proportion of different immunophenotypes of graft infiltrating cells (T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes/macrophages, plasma cells, and NK cells) was not different in any renal compartment between both groups.

Outcome of patients with chronic AMR and isolated TG

During follow-up (36 ± 18 months), 13 of 17 cases with chronic AMR and two of 12 cases with isolated TG lost their graft and returned to dialysis. Additionally, one patient with chronic AMR died due to post-transplant lymphoma with a functioning graft and one patient with isolated TG died due to lung carcinoma. Death-censored graft survival was significantly lower in patients with chronic AMR ($p = 0.0122$) (Fig. 1).

Table 3. Number of graft infiltrating cells in the glomerular, interstitial, and peritubular capillary compartments in patients diagnosed with isolated transplant glomerulopathy (TG) and chronic antibody-mediated rejection (AMR)

Variable	Isolated TG (N = 10)	Chronic AMR (N = 11)	p-Value
CD45/glomeruli	2.6 ± 2.0	7.1 ± 6.6	0.1147
CD3/glomeruli	1.5 ± 2.9	4.4 ± 4.1	0.0147
CD20/glomeruli	0.03 ± 0.21	0.20 ± 0.25	Ns
CD68/glomeruli	1.3 ± 2.9	0.4 ± 0.6	Ns
CD138/glomeruli	1.3 ± 3.9	0	Ns
CD56/glomeruli	0.20 ± 0.63	0	Ns
CD45 interstitium	18 ± 11	57 ± 68	0.0132
CD3 interstitium	26 ± 21	50 ± 57	Ns
CD20 interstitium	8 ± 14	17 ± 19	0.0671
CD68 interstitium	1.6 ± 2.1	1.4 ± 1.7	Ns
CD138 interstitium	2.0 ± 2.3	5.9 ± 7.3	Ns
CD56 interstitium	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.5	Ns
CD45 in peritubular capillaries	3.7 ± 3.1	10.1 ± 7.4	0.0290
CD3 in peritubular capillaries	4.3 ± 4.3	9.0 ± 7.0	Ns
CD20 in peritubular capillaries	1.8 ± 3.7	1.8 ± 1.6	Ns
CD68 in peritubular capillaries	0.3 ± 0.6	0.3 ± 0.4	Ns
CD138 in peritubular capillaries	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.1	Ns
CD56 in peritubular capillaries	0	0.1 ± 0.1	Ns

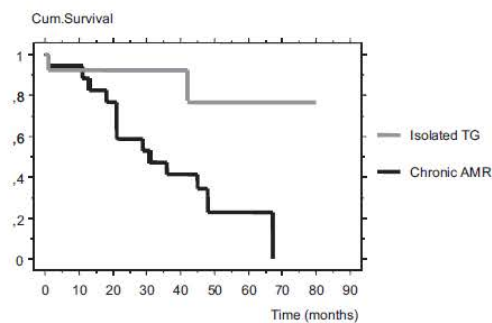


Fig. 1. Cumulative survival after biopsy in patients diagnosed with isolated transplant glomerulopathy (TG) and in patients diagnosed with chronic antibody-mediated rejection (AMR). Log-rank test p-value = 0.0122.

Discussion

The present study aimed to characterize kidney transplant recipients who displayed TG in a late biopsy for clinical indication. Two main differences between chronic AMR and isolated TG were observed: microcirculation inflammation was more severe and death-censored graft survival was lower in patients with chronic AMR. Although the number of retransplants and episodes of previous acute rejection was higher in patients who had AMR, these differences were not significant.

Transplant glomerulopathy has been considered the hallmark of chronic AMR (6). This entity is currently the major cause of graft loss in late kidney transplantation (4, 5). Although the presence of alloantibodies is considered to be the main cause of this histologic pattern, it is not specific for AMR and TG can occur in other settings. A variable proportion of patients with TG (20–60%) do not display DSA or C4d deposition (14, 15), suggesting that other mechanisms different from antibody-mediated injury may trigger this lesion. The differential diagnosis should include immune complex glomerulonephritis (GN), smoldering thrombotic microangiopathy, or hepatitis C virus (HCV) infection (21). In the present study, 41% of cases were diagnosed as isolated TG, but none of these patients had a hepatitis C virus positive serology or presented lesions suggestive of thrombotic microangiopathy, discarding these possible etiological explanations. Although the proportion of patients with a glomerulonephritis as the primary disease was higher in patients with isolated TG, immunofluorescence studies were negative in both groups.

The histological markers of activity in chronic AMR are C4d deposition in peritubular capillaries

Torres et al.

and microcirculation inflammation. The main cell types involved are monocytes and NK cells, although neutrophils and T cells can also be found (22, 23). In the present study microvascular inflammation (glomerulitis and peritubular capillary inflammation), either evaluated according to the Banff criteria or in immunohistochemistry stained sections, was less severe in isolated TG, suggesting a less intense endothelial insult regardless of the mechanism leading to the appearance of glomerular double contours.

The reported incidence of C4d positivity in TG biopsies is quite variable, probably reflecting differences in C4d-detection methods and defining criteria for C4d positivity. Also, serial biopsies performed in patients with TG have shown that C4d can fluctuate at different time points (24). For instance, the Edmonton group found that more than half of TG cases were C4d negative, despite in 73% of them HLA antibodies were detected (16). C4d positivity in renal allograft biopsies not only depends on the capacity of the antibodies to fix complement (25, 26) but also on the circulating antibody levels (8, 27), which can change with time (26, 28). We re-evaluated the presence of DSA at approximately two yr after the biopsy and all patients with chronic AMR remained DSA positive while only one patient (out of 11) in the isolated TG group became DSA positive. This finding suggests that at least in a proportion of patients with isolated TG, intermittent DSA response might contribute to the presence of glomerular double contours. We hypothesize that in these patients the presence of isolated TG may be due to a low intensity DSA exposure, so that at the time of biopsy DSA circulating levels might have been too low to be detected. On the other hand, biopsies with isolated TG where DSA cannot be found could represent AMR in a smoldering or inactive stage where some of its features have disappeared (11) or perhaps a different disease mechanism involving endothelial damage. Also, it is possible that in some patients, DSA are not detected because they are absorbed by the allograft (29). Taken together, these results suggest that a single biopsy with a single determination of DSA may be insufficient to reach an adequate characterization of the mechanisms leading to these evolving histological lesions. Non-HLA antibodies (30–33) have been also associated with TG, but unfortunately, in the present study we have not determined the presence of non-HLA antibodies and we cannot discard this alternative explanation as responsible for the TG pattern.

Aging is associated with a decreased endothelial injury threshold and decreased endothelial repair

capacity (34, 35), and it is a well-known risk factor for hypertension (36). In the present study, we observed that donors and recipients were older in patients with isolated TG, and that this also was related with a higher degree of hypertension. This finding suggests that the association of both conditions (donor age and hypertension) might constitute a risk factor for double contour appearance.

Limitations of the present study are the lack of electron microscopy studies to further characterize microcirculation modifications and the relative small sample size; however, the number of events during follow-up was very high in patients with chronic AMR. Despite chronic AMR has been predominantly associated with microcirculatory macrophage infiltration (22, 23), we observed that T-lymphocytes constitute the main graft infiltrating cells in both studied groups. Nevertheless, this result is in agreement with some reports showing that chronic AMR is also associated with cellular infiltration (T cells and NK cells) and chronic inflammation (37).

In summary, we describe that isolated TG in the absence of HCV positive serology, histological signs of thrombotic microangiopathy or immune complex glomerulonephritis is associated with a better graft survival and less severe inflammation than chronic AMR.

Acknowledgements

This study was partly supported by a Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) PI10/02496 and PIE13/00027, a Sociedad Española de Trasplante (SET) and a REDinREN RD/0021/0013 grants. IB Torres was supported by a Vall Hebron Research Institute grant and MA Azancot was supported by an FIS grant I11/0246.

Authors' contributions

Irina B. Torres and Francesc Moreso: participated in research design, performance of the research, data analysis and writing of the paper; Maite Salcedo, Eva Castellá, M. Antonieta Azancot, Manel Perelló, and Carme Cantarell: participated in performance of the research; Joana Sellarés: participated in data analysis and writing of the paper; Daniel Serón: participated in research design, data analysis, and writing of the paper.

References

1. EVANS RW, MANNINEN DL, GARRISON LP Jr et al. The quality of life of patients with end-stage renal disease. *N Engl J Med* 1985; 312: 553.
2. MORESO F, ALONSO A, GENTIL MA et al. Improvement in late renal allograft survival between 1990 and 2002 in

Transplant glomerulopathy and DSA

- Spain: results from a multicentre case-control study. *Transpl Int* 2010; 23: 907.
3. MATAS AJ, SMITH JM, SKEANS MA et al. OPTN/SRTR 2011 annual data report: kidney. *Am J Transplant* 2013; 13(Suppl 1): 11.
 4. EL-ZOGHBY ZM, STEGALL MD, LAGER DJ et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* 2009; 9: 527.
 5. SELLAES J, DE FREITAS DG, MENGEL M et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 2012; 12: 388.
 6. SOLEZ K, COLVIN RB, RACUSEN LC et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7: 518.
 7. EINECKE G, SIS B, REEVE J et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009; 9: 2520.
 8. LOUPY A, HILL GS, SUBERBIELLE C et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am J Transplant* 2011; 11: 56.
 9. HAAS M, MONTGOMERY RA, SEGEV DL et al. Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. *Am J Transplant* 2007; 7: 576.
 10. HAAS M, SIS B, RACUSEN LC et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014; 14: 272.
 11. HUSAIN S, SIS B. Advances in the understanding of transplant glomerulopathy. *Am J Kidney Dis* 2013; 62: 352.
 12. WAVAMUNNO MD, O'CONNELL PJ, VITALONE M et al. Transplant glomerulopathy: ultrastructural abnormalities occur early in longitudinal analysis of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2007; 7: 2757.
 13. COSIO FG, GLOOR JM, SETHI S, STEGALL MD. Transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2008; 8: 492.
 14. HAAS M, MIROCHA J. Early ultrastructural changes in renal allografts: correlation with antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2011; 11: 2123.
 15. SIS B, CAMPBELL PM, MUELLER T et al. Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *Am J Transplant* 2007; 7: 1743.
 16. AKALIN E, DINAHAHI R, DIKMAN S et al. Transplant glomerulopathy may occur in the absence of donor-specific antibody and C4d staining. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 1261.
 17. MANNON RB, MATAS AJ, GRANDE J et al. Inflammation in areas of tubular atrophy in kidney allograft biopsies: a potent predictor of allograft failure. *Am J Transplant* 2010; 10: 2066.
 18. DRACHENBERG CB, HIRSCH HH, RAMOS E, PAPADIMITRIOU JC. Polyomavirus disease in renal transplantation: review of pathological findings and diagnostic methods. *Hum Pathol* 2005; 36: 1245.
 19. MORESO F, SERON D, O'VALLE F et al. Immunophenotype of glomerular and interstitial infiltrating cells in protocol renal allograft biopsies and histological diagnosis. *Am J Transplant* 2007; 7: 2739.
 20. KLITZ W, MAIERS M, SPELLMAN S et al. New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens* 2003; 62: 296.
 21. MARSH SG. Nomenclature for factors of the HLA system, update September 2004. *Tissue Antigens* 2004; 64: 713.
 22. FAHIM T, BOHMIG GA, EXNER M et al. The cellular lesion of humoral rejection: predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant* 2007; 7: 385.
 23. HIDALGO LG, SIS B, SELLAES J et al. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2010; 10: 1812.
 24. SIS B, JHANGRI GS, RIOPEL J et al. A new diagnostic algorithm for antibody-mediated microcirculation inflammation in kidney transplants. *Am J Transplant* 2012; 12: 1168.
 25. REGELE H, BOHMIG GA, HABICHT A et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2371.
 26. TERASAKI PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 665.
 27. COSIO FG, LAGER DJ, LORENZ EC, AMER H, GLOOR JM, STEGALL MD. Significance and implications of capillaritis during acute rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2010; 89: 1088.
 28. COLVIN RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1046.
 29. HEINEMANN FM, ROTH I, REBMANN V, ARNOLD ML, SPRIEWALD BM, GROSSE-WILDE H. Characterization of anti-HLA antibodies eluted from explanted renal allografts. In CECKA JM, TERASAKI PI (eds). *Clinical Transplants. UCLA Tissue Typing Laboratory: Los Angeles, CA; 2006: 371.*
 30. TERASAKI PI, OZAWA M, CASTRO R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant* 2007; 7: 408.
 31. DINAHAHI R, GEORGE A, TRETIN A et al. Antibodies reactive to non-HLA antigens in transplant glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1168.
 32. JOOSTEN SA, SUPKENS YW, VAN HAM V et al. Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2005; 5: 383.
 33. DRAGUN D, HEGNER B. Non-HLA antibodies post-transplantation: clinical relevance and treatment in solid organ transplantation. *Contrib Nephrol* 2009; 162: 129.
 34. KURZ DJ, DECARY S, HONG Y, TRIVIER E, AKHMEDOV A, ERUSALIMSKY JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 2417.
 35. REINDERS ME, RABELINK TJ, BRISCOE DM. Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 932.
 36. MANGRAY M, VELLA JP. Hypertension after kidney transplant. *Am J Kidney Dis* 2011; 57: 331.
 37. DEAN PG, PARK WD, CORNELL LD, GLOOR JM, STEGALL MD. Intra-graft gene expression in positive cross-match kidney allografts: ongoing inflammation mediates chronic antibody-mediated injury. *Am J Transplant* 2012; 12: 1551.

5. DISCUSIÓN CONJUNTA

El trasplante renal es el tratamiento de elección para la enfermedad renal crónica terminal ya que ofrece una mejor supervivencia y una mejor calidad de vida que las técnicas de diálisis. Sin embargo, los pacientes portadores de un injerto renal deben recibir un tratamiento inmunosupresor a largo plazo dirigido a facilitar la aceptación del mismo y este tratamiento inmunosupresor presenta múltiples efectos secundarios. Con la introducción de nuevos tratamientos se ha conseguido prevenir la aparición de rechazo agudo en un elevado porcentaje de casos y se trata con éxito en muchas ocasiones a los pacientes que lo presentan, lo cual ha mejorado la supervivencia del injerto a corto plazo. Sin embargo, no se ha conseguido prevenir la aparición del rechazo crónico y no disponemos de fármacos efectivos para su tratamiento. Además, estas pautas de tratamiento eficaces para la prevención del rechazo agudo se asocian a múltiples toxicidades que se acompañan de un elevado riesgo de mortalidad de origen infeccioso, cardiovascular y neoplásico. Por lo tanto, es necesario disponer de herramientas que contribuyan a conocer cuál es el grado de respuesta que presenta el receptor frente al injerto. En la práctica clínica, la monitorización de esta respuesta frente al injerto se ha realizado tradicionalmente mediante la monitorización de la función renal (creatinina sérica, proteinuria) y la monitorización farmacocinética de los tratamientos que recibe el receptor (niveles valle de los fármacos de estrecho rango terapéutico). Durante la última década se han incorporado como nuevas herramientas la monitorización de la replicación de diversos virus relacionados con el trasplante (citomegalovirus y virus del poliooma humano BK) y la monitorización inmunológica mediante la determinación seriada de anticuerpos anti-HLA con las nuevas técnicas de Luminex (una herramienta muy sensible pero poco específica). En la presente tesis se han evaluado los siguientes aspectos:

1. Monitorización histológica e inmunológica durante el primer año post-trasplante en pacientes de bajo riesgo inmunológico.

La incorporación de la monitorización histológica mediante biopsias de protocolo sigue siendo tema de debate después de 30 años de historia y se realiza en pocos centros en la actualidad. Uno de los objetivos de la presente tesis ha sido evaluar la incorporación de esta herramienta en la monitorización de una amplia serie de pacientes. Se ha cuestionado si este procedimiento es útil en los pacientes de bajo

riesgo inmunológico dado que la presencia de inflamación subclínica es baja, el procedimiento es invasivo y se asocia a un coste elevado para el sistema sanitario. En el primer artículo de la presente tesis (I.B. Torres-Rodríguez y cols. Nefrología 2014) se muestra que la técnica es segura y se puede reducir su coste realizando el procedimiento de forma ambulatoria confirmando los resultados de estudios previos⁽⁴²⁾ ⁽⁴⁵⁾. Nuestro estudio confirma que la incidencia de inflamación subclínica es baja (alrededor del 15%) en los pacientes que reciben la inmunosupresión de mantenimiento estándar en la actualidad basada en la combinación de tacrolimus, MMF y corticoides ⁽¹³⁷⁾ ⁽⁷⁴⁾.

La evaluación de nuestra serie de pacientes nos ha mostrado que en los pacientes que reciben tratamiento con tacrolimus, MMF y prednisona existe una asociación entre los niveles valle de tacrolimus al momento de biopsia y la presencia de inflamación subclínica. Este hallazgo tiene elevada trascendencia clínica, ya que a raíz de los resultados del ensayo clínico ELITE-Symphony ⁽¹³⁸⁾ se ha preconizado una minimización del tratamiento con tacrolimus para reducir sus múltiples toxicidades. Una diferencia importante entre nuestra serie de pacientes y la del ensayo clínico referenciado es la dosis de MMF de mantenimiento. En el ensayo clínico la dosis de mantenimiento es de 2 g al día y se reduce en caso de toxicidad (gastrointestinal o hematológica), mientras que en nuestro centro se utiliza un régimen con una dosis menor (2 g al día el primer mes y 1 g al día a partir del 2º mes) con el objetivo de evitar la aparición de la toxicidad asociada a este tratamiento. Para subsanar las limitaciones de nuestro estudio, era necesario evaluar los resultados de otro centro que disponga de biopsias de protocolo en un perfil de pacientes similar (pacientes de bajo riesgo inmunológico) tratados con tacrolimus y MMF siguiendo la dosificación recomendada en el ensayo clínico. El grupo de trasplante de Noruega, con el que nuestro centro presenta una colaboración en investigación, dispone de esta serie de pacientes, por lo cual se ha evaluado en su serie si también existe esta asociación entre la pauta de tratamiento y la aparición de inflamación subclínica. El análisis de sus datos permite confirmar los resultados de nuestra serie de pacientes. Es importante destacar que en su serie de pacientes la presencia de inflamación subclínica en la biopsia temprana se asocia con la dosis de MMF mientras que en la biopsia tardía se asocia con los niveles de tacrolimus al igual que en nuestra serie. Es decir, la minimización de ambos fármacos se acompaña de un mayor grado de inflamación subclínica. Estos resultados concuerdan con los de un estudio de registro que muestran que en los pacientes que al año del trasplante reciben una dosis de MMF < 1.5 g/día, la minimización de

tacrolimus (niveles valle < 5 ng/mL) se asocia con una peor supervivencia del injerto y, en cambio, en los pacientes que reciben una dosis de MMF ≥ 1.5 g/día no existe una relación entre los niveles valle de tacrolimus (< ó > 5 ng/mL) y la supervivencia del injerto. Recientemente, se han publicado los resultados de un ensayo clínico dirigido a testar esta hipótesis. Los pacientes fueron aleatorizados al 3º mes a mantener unos niveles valle de tacrolimus > 7 ng/mL o en el rango 3-7 ng/mL. La dosificación de MMF fue según práctica habitual del centro, pero cabe destacar que al año del trasplante la dosis media era de 1.2 g/día. Los resultados de este ensayo clínico confirman los de nuestro estudio, ya que la prevalencia de rechazo clínico y subclínico al año del trasplante fue menor en los pacientes aleatorizados a una mayor exposición a tacrolimus.

En las dos series de pacientes evaluadas, también se realizó una monitorización de los DSA al momento de cada una de las biopsias. En nuestra serie de pacientes no observamos ningún caso con DSA de novo, mientras que en la serie de Oslo hasta el 7.2% de los pacientes presentan DSA de novo. Las diferencias en la técnica de evaluación de los DSA entre ambos centros nos impiden sacar conclusiones sobre este punto. En Noruega se utiliza una plataforma para la determinación de anticuerpos anti-HLA (One Lambda) con mayor sensibilidad que la que se utiliza en nuestro centro (Gen-Prove). Además, la aparición de DSA de novo al año del trasplante se ha relacionado también con la no adherencia al tratamiento ⁽⁶⁹⁾ y en ninguna de ambas series se ha evaluado el grado de adherencia al tratamiento durante el período de estudio. De todas formas, estos resultados coinciden con los de un ensayo clínico en el que se muestra que la minimización de tacrolimus (niveles diana 3-7 ng/mL entre el 3º y 12º mes) se asocia a un 6.9% de pacientes que presentan DSA al año, mientras que en los pacientes que recibieron tacrolimus a dosis plenas (niveles diana > 7 ng/mL entre el 3º y 12º mes) no presentaron DSA al año. El impacto de los DSA de novo sobre la supervivencia del injerto ha sido demostrada en otras series de pacientes ^{(65) (111)} y no se ha podido evaluar en nuestra serie dado el corto período de seguimiento.

Uno de los objetivos de la presente tesis era evaluar si la presencia de inflamación subclínica temprana se asocia con un mayor grado de progresión de la FI/AT. El análisis de nuestra serie tiene poco poder estadístico (66 pacientes con biopsias pareadas) y la relación existente entre el grado de inflamación observado en la biopsia temprana y el grado de FI/AT en la biopsia tardía (it-score = 0.63 ± 0.85 en la biopsia temprana en los pacientes con FI/AT ≥ 2 en la biopsia tardía vs. it-score =

0.13 ± 0.34 en la biopsia temprana en los pacientes con FI/AT < 2 en la biopsia tardía, p=0.009) no se pudo confirmar en el análisis multivariado (p=0.074). Además, estos datos no se pudieron confirmar en la cohorte de Oslo, en la que no se observa una asociación entre el grado de inflamación en la biopsia temprana y el grado de FI/AT en la biopsia tardía (it-score = 0.81 ± 1.29 en la biopsia temprana en los pacientes con FI/AT ≥ 2 en la biopsia tardía vs. it-score = 0.58 ± 1.38 en la biopsia temprana en los pacientes con FI/AT < 2 en la biopsia tardía, p=0.1709). En esta última serie de pacientes, observamos que el grado de inflamación en la biopsia tardía se asocia con el grado de FI/AT en la misma biopsia (0.17 ± 0.67 en los pacientes con FI/AT <2 y 0.88 ± 1.35 en los pacientes con FI/AT ≥ 2, p<0.001). Sin embargo, en ninguna de ambas series pudimos demostrar una asociación entre la inmunosupresión de mantenimiento y la progresión de la FI/AT. En las dos series de pacientes la progresión de esta lesión se halla en relación especialmente con las variables demográficas del donante (vivo vs. cadáver, edad, sexo), sugiriendo que los injertos con FI/AT pre-existente son más susceptibles a la lesión de isquemia y re-perfusión y sufren una mayor reparación tisular que conduce a un mayor grado de FI/AT en la biopsia tardía. Finalmente, es importante remarcar que la progresión de la FI/AT es leve en ambas series de biopsias (15% en nuestra serie de casos y 3% en la serie de Oslo) y que la evaluación de esta progresión en biopsias pareadas tiene un elevado error de muestreo (139).

2. Estudio del fenotipo celular y molecular en biopsias de protocolo en trasplante renal

Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral ha sido evaluar si el estudio del inmunofenotipo de las células que infiltran el intersticio y el estudio del fenotipo molecular en un grupo de biopsias contribuyen a caracterizar de forma más adecuada los eventos que suceden en el injerto renal durante el primer año post-trasplante. Para ello, se ha diseñado un estudio piloto en un grupo de 12 pacientes con biopsias pareadas (24 biopsias). Este grupo incluye pacientes con nivel valle de tacrolimus al momento de la biopsia precoz superior a la mediana (n=6) e inferior a la mediana (n=6). Además, en cada grupo hay un subgrupo de pacientes con progresión de la FI/AT (n=3) y un subgrupo sin progresión (n=3).

En los pacientes con niveles valle de tacrolimus inferior a la media observamos un mayor grado de inflamación intersticial (i-Banff e i-total scores) en la biopsia precoz a expensas de un mayor número de linfocitos T (células CD3+) sin

poder observar diferencias en las otras subpoblaciones estudiadas. Aunque no alcanza significación estadística, los donantes del grupo expuesto a niveles más bajos de tacrolimus tenían una edad inferior (10 años) al otro grupo. La progresión de las lesiones crónicas (FI/AT) en ambos grupos es ligera y no diferente en función de los niveles de tacrolimus. El estudio de expresión génica muestra resultados similares, los injertos expuestos a niveles menos elevados de tacrolimus presentan más expresión de transcritos asociados a inflamación intersticial (QCAT y QCMAT).

En los injertos en los que se observa progresión de la FI/AT entre ambas biopsias (n=6) hay más infiltración linfocitaria en las biopsias precoces de los injertos que presentan progresión de la FI/AT cuando se cuantifica mediante el número de células totales (17 ± 10 vs. 6 ± 3 células CD45 positivas/campo x 400, $p=0.03$), pero no observamos diferencias cuando se cuantifica mediante los scores i-Banff, i-IFTA e i-total. Al igual que en el análisis anterior los pacientes con progresión de la FI/AT han recibido órganos procedentes de donantes más añosos. El estudio de expresión génica no ha reportado resultados distintos entre ambos grupos de pacientes.

En resumen, los pacientes que reciben injertos de donantes de menor edad presentan niveles menores de tacrolimus durante el seguimiento y esto se asocia con menor inflamación intersticial y menor progresión de la FI/AT. Con el reducido tamaño de la muestra analizado no se pueden derivar más conclusiones. Esta línea de investigación seguirá durante los próximos años en nuestro centro para poder dilucidar si en los pacientes que reciben mayor exposición al tratamiento inmunosupresor existe un mejor control de la respuesta inmune y una menor progresión de la FI/AT.

3. Expresión génica de biomarcadores de tolerancia y de las subpoblaciones linfocitarias circulantes en distintas cohortes de pacientes con función estable.

Hasta la actualidad, la suspensión de tratamiento inmunosupresor en los pacientes trasplantados renales se ha acompañado de episodios de rechazo agudo y la no adherencia al tratamiento inmunosupresor es una de las variables más estrechamente ligada a la aparición de anticuerpos anti-HLA y el desarrollo de rechazo crónico humoral. Dada la toxicidad de los fármacos inmunosupresores se han llevado a cabo trabajos para intentar eliminarlos, especialmente los inhibidores de la calcineurina. Recientemente, se han reportado dos ensayos clínicos en los que receptores de un trasplante renal aparentemente quiescente a los que se suspendía el tratamiento con anticalcineurínicos presentaban resultados desalentadores. En el

ensayo clínico llevado a cabo por el CTOT (Clinical Trials in Organ Transplantation), receptores de trasplante renal de donante vivo, tratados con timoglobulina, tacrolimus MMF y corticoides, sin anticuerpos anti-HLA de novo, libres de episodios de rechazo agudo y con una biopsia de protocolo a los 6 meses sin signos de rechazo; fueron aleatorizados a los 6 meses a eliminar el tacrolimus o a mantenerlo. El estudio fue finalizado precozmente porque tras la suspensión de tacrolimus se observó una tasa elevada de rechazo agudo (4 de 14) y un porcentaje elevado de pacientes presento DSA de novo (5 de 14). Aunque la monitorización del número de incompatibilidades HLA a nivel de epítipo, la respuesta T de memoria medida mediante ELISPOT al trasplante y la monitorización de quemoquinas en orina permite identificar a los pacientes de más riesgo, los autores concluyen que no es recomendable suprimir el tratamiento en los pacientes que presentan un aparente estado de quiescencia inmunológica(140). En un ensayo clínico de diseño parecido(141), se aleatorizaron 50 pacientes estables (sin anticuerpos anti-HLA, función renal estable con histología normal) con más de 4 años de seguimiento a eliminar tacrolimus o mantenerlo. El estudio también se finalizó de forma precoz dado que en la rama de eliminación de tacrolimus la prevalencia de rechazo agudo (3 de 5 casos) y la aparición de DSA de novo (2 de 5 casos) fue muy elevada. Es decir, estos resultados confirman que con las herramientas de monitorización de que disponemos en la actualidad parece complejo diseñar estrategias que permitan eliminar uno de los pilares de la inmunosupresión actual, los inhibidores de la calcineurina.

Dado que las estrategias de eliminación programada de la inmunosupresión no han dado los frutos esperados, tiene interés analizar los resultados de los pacientes que han abandonado el tratamiento inmunosupresor en el contexto de no adherencia al tratamiento o por presentar neoplasias que aconsejaban su suspensión. Un pequeño porcentaje de pacientes no presentan episodios de rechazo tras abandonar el tratamiento y mantienen función renal estable. A esta situación cuando se prolonga por más de un año se la ha denominado de tolerancia operacional espontánea. Durante los últimos años se han puesto en marcha diversos estudios en red para evaluar la presencia de biomarcadores que permitan diferenciar a los pacientes tolerantes de los pacientes estables bajo inmunosupresión. El conocimiento de la expresión de estos biomarcadores puede permitir diseñar estrategias de eliminación del tratamiento en los pacientes estables. Se han puesto en marcha dos estudios colaborativos, Riset (Reprogramming the Immune System for the Establishment of Tolerance) e ITN (International Tolerance Network) que han reportado una serie de

cambios a las que han definido como “firmas” del estado de tolerancia operacional espontánea⁽¹¹⁷⁾ (142). La firma descrita por el grupo Riset consiste en una expansión de los linfocitos B y células NK circulantes, un menor porcentaje de células CD4+ activadas con una hipo-respuesta donante-específica de las células CD4+ y la expresión génica en sangre total de algunos transcritos medidos mediante RT-PCR como FOXP3. La ITN ha utilizado la expresión de 3 genes derivados de linfocitos B para caracterizar a la población con tolerancia operacional espontánea. Estas firmas de tolerancia se han validado entre ambas cohortes y muestran una sensibilidad/especificidad superior al 80% para detectar a dichos pacientes. En su conjunto, estos estudios sugieren que el estado de tolerancia se asocia con el fenotipo y función de las células B a través de una depleción de linfocitos B naïve y transicionales. El estudio realizado en nuestro centro ha sido el primero en demostrar que las modificaciones que presentan las subpoblaciones de células B dependen del tratamiento inmunosupresor administrado. Así, los pacientes tratados con azatioprina presentan una depleción de linfocitos B, no presente en pacientes tratados con inhibidores de la calcineurina que sufren una expansión de este componente a lo largo del tiempo. Estudios posteriores han confirmado nuestros resultados(143) y han mostrado que la azatioprina se asocia con una reducción de las células B naïve y transicionales circulantes, pero no modifica las células B maduras. En los pacientes con azatioprina evaluados en este nuevo estudio se observa una mayor prevalencia de DSA que relacionan con una disregulación de las células B y una alteración de las poblaciones linfocitarias en el centro germinal. Sin embargo, en nuestro estudio ninguno de los 8 pacientes tratados con azatioprina presentaba DSA a los 30 años del trasplante. En cambio, en los pacientes tratados con inhibidores de la calcineurina se produce un aumento de las células B post-germinales y de los plasmablastos y se sugiere que estos fármacos inhiben el cambio de clase necesario para desarrollar una respuesta mediada por anticuerpos Ig G, aunque sin modificar la respuesta de anticuerpos Ig M. En definitiva, nuestro estudio y estudios posteriores confirman que la expresión de la firma de tolerancia es distinta bajo distintas pautas de inmunosupresión y que, por lo tanto, no se puede utilizar con los conocimientos actuales para diseñar estrategias de eliminación de la inmunosupresión. Otros estudios recientes también han mostrado una asociación entre la inmunosupresión de mantenimiento y la aparición de firmas de tolerancia. Así, el tratamiento con belatacept se ha relacionado con la aparición de una firma de tolerancia relacionada con células dendríticas de origen mieloide(144)

Evaluación histológica e inmunológica en pacientes con disfunción crónica del injerto por glomerulopatía crónica del trasplante.

Una de las primeras aproximaciones al diagnóstico de rechazo crónico mediado por anticuerpos fue definida en la reunión de Banff realizada en el 2005 como la presencia de manifestaciones histológicas sugestivas (glomerulopatía del trasplante, multilaminación de la membrana basal de capilares peritubulares, vasculopatía del trasplante, FI/AT), presencia de depósito de C4d en capilares peritubulares y la presencia de DSA. Los pacientes que cumplían solo dos de estos criterios se consideraban como probable rechazo crónico mediado por anticuerpos (145). En estudios posteriores, la sensibilidad del C4d como marcador diagnóstico para rechazo crónico mediado por anticuerpos fue cuestionado debido a que la presencia de inflamación de la microcirculación estaba estrechamente asociada a la presencia de DSA de forma independiente a la presencia de depósito de C4d ⁽¹²⁶⁾. De modo similar, en otro estudio realizado en biopsias de seguimiento en pacientes sensibilizados pre-trasplante las biopsias mostraron que la inflamación de la microcirculación estaba asociada con un incremento del riesgo de progresión a daño crónico incluyendo glomerulopatía del trasplante (GT). Estas evidencias han conducido al reconocimiento de la entidad denominada como rechazo crónico mediado por anticuerpos C4d negativo(146).

Los avances en las técnicas de detección de anticuerpos han aumentado la sensibilidad de la detección de DSA circulantes y existe evidencia que no todos los DSA son equivalentes y que sus propiedades (capacidad de ligar el complemento o subclases de IgG), están asociadas con distintos fenotipos de lesión en el aloinjerto(147) ⁽¹⁰³⁾ (148). Así mismo, la evolución en el tiempo, la cinética y las propiedades de los DSA son fluctuantes ⁽¹¹¹⁾ ⁽⁹⁵⁾ (149), lo que hace considerar de manera prudente la interpretación de una determinación puntual de DSA, especialmente en el período post-trasplante tardío. En nuestro estudio presentado aquí, diseñado para caracterizar el fenotipo histológico de la glomerulopatía del trasplante aislada, hemos de destacar que solo en un caso se evidenció presencia de DSA en una determinación dos años más tarde del diagnóstico histológico, lo que refuerza lo expuesto previamente a cerca de la fluctuación de los anticuerpos anti-HLA en el tiempo. Estas observaciones cuestionan si el rechazo mediado por anticuerpos puede ser diagnosticado en ausencia de DSA solo con histología compatible como la

inflamación de la microcirculación, depósito de C4d y vasculopatía asociada o no con incremento de la expresión génica de transcritos asociados a DSA ⁽¹²⁴⁾.

En la actualidad, continúa siendo motivo de interés si la presencia de glomerulopatía del trasplante asociada o no a inflamación de la microcirculación tiene implicancia en términos de actividad de la enfermedad, progresión y por lo tanto necesidad de tratamiento ⁽³⁵⁾. En nuestro estudio, con la limitación que implica el reducido tamaño de la muestra, hemos concluido que los pacientes con glomerulopatía del trasplante aislada presentan un infiltrado inflamatorio menos severo y una mejor supervivencia del injerto en comparación con los pacientes que presentaban glomerulopatía del trasplante asociada a DSA.

Un estudio de Kahwaji et al (150) mostró en una reducida cohorte de pacientes, todos ellos con glomerulopatía del trasplante, que aquellos casos con inflamación de la microcirculación presentaron más probabilidad de estabilización de la función del injerto con la administración de inmunoglobulina intravenosas (IVIg) y Rituximab que los pacientes con histología similar que no fueron tratados. Los pacientes con glomerulopatía del trasplante sin inflamación de la microcirculación no presentaron beneficio del tratamiento. Estos hallazgos sugieren que la decisión de instaurar un tratamiento en pacientes con glomerulopatía del trasplante, y particularmente aquellos con DSA, debería basarse en la presencia de inflamación en la microcirculación. Posteriormente, se ha demostrado que los pacientes que presentan DSA con capacidad de ligar complemento (C1q) responden al tratamiento con Eculizumab(151). Teniendo en cuenta estas consideraciones y las limitaciones de nuestro estudio; como el tamaño muestral, la ausencia de evaluación mediante microscopía electrónica y la ausencia de determinación del tipo específico de DSA capaz de fijar complemento; podemos aseverar que la presencia de un infiltrado inflamatorio de menor intensidad evaluado mediante los criterios de Banff al que se ha añadido la evaluación de la inflamación total mediante inmunohistoquímica, confirman un fenotipo histológico que puede corresponder a una entidad diferente o a un estadio menos activo de un proceso histopatológico en curso.

6. CONCLUSIONES

La monitorización histológica e inmunológica en el periodo post-trasplante contribuyen a un mejor conocimiento de los mecanismos que participan en el control de la respuesta inmune en los receptores de un trasplante renal.

6.1. La monitorización histológica mediante biopsias de seguimiento es un procedimiento seguro que contribuye a caracterizar las lesiones presentes en el injerto renal con función renal estable.

6.2. En los receptores de un trasplante renal sin anticuerpos anti-HLA donante-específicos preformados (DSA), con función renal estable y tratados con tacrolimus y MMF, existe una asociación entre el régimen de tratamiento y la inflamación subclínica. La minimización de tacrolimus (niveles valle < 6 ng/mL) en pacientes con dosis reducidas de MMF (< 1.5 g/día) se asocia de un mayor grado de inflamación subclínica.

6.3. En los receptores de un trasplante renal sin anticuerpos anti-HLA donante-específicos preformados (DSA) con función renal estable y tratados con tacrolimus y MMF, no existe una asociación entre el régimen de tratamiento y la progresión de la FI/AT durante el primer año post-trasplante.

6.4. El estudio del inmunofenotipo celular que infiltra el intersticio renal confirma que existe un mayor grado de inflamación en los pacientes que presentan niveles más bajos de tacrolimus al momento de la biopsia y está constituido fundamentalmente por linfocitos T. El estudio del fenotipo molecular en biopsias renales realizadas en injertos con función estable sugiere que una menor exposición a tacrolimus se asocia a una mayor expresión de transcritos derivados de linfocitos T y macrófagos, sin embargo, no se asocian a un mayor grado de progresión de la FI/AT.

6.5. La expresión génica de biomarcadores de tolerancia y de las subpoblaciones linfocitarias circulantes asociadas a linfocitos B aumentan a lo largo del tiempo en los pacientes tratados con inhibidores de la calcineurina y disminuyen en los pacientes tratados con azatioprina. Estos resultados sugieren que con los conocimientos actuales estos biomarcadores no son útiles para el diseño de ensayos clínicos dirigidos a eliminar los inhibidores de la calcineurina en pacientes estables.

6.6. En el injerto con disfunción crónica por glomerulopatía del trasplante, la ausencia de DSA y la ausencia de activación del complemento representa una entidad clínica menos activa y con mejor pronóstico que el rechazo crónico activo humoral.

7. Futuras líneas de investigación en desarrollo

Hipótesis

Existe una relación entre la severidad del infiltrado intersticial y el fenotipo molecular al momento de la biopsia renal temprana y la progresión de la FI/AT entre la biopsia renal temprana y la tardía. Los pacientes con niveles más elevados de tacrolimus en el momento de la biopsia renal precoz presentan menor infiltración intersticial y una menor expresión de transcritos relacionados con alorespuesta.

Pacientes y métodos

Pacientes y biopsia del injerto.

Pacientes portadores de un injerto renal a los que se les realizó una biopsia de seguimiento temprana (3-4 meses post-trasplante) y una biopsia tardía (12-18 meses post-trasplante) dentro del programa de biopsias ambulatorias iniciado en nuestro servicio desde el año 2012. Fueron candidatos a biopsia renal temprana aquellos pacientes que a los 3 meses del trasplante cumplían los siguientes criterios: a) filtrado glomerular estimado (FGRe) mediante la fórmula MDRD-4 ≥ 40 mL/min/1.73 m², b) función renal estable definida como variabilidad del FGRe inferior al 15% desde el último control, c) proteinuria inferior a 0.8 g/día, d) pacientes sin anticoagulación oral, e) índice de masa corporal (IMC) < 35 kg/m² y, f) firma de consentimiento informado. En el presente estudio han sido incluidos pacientes de bajo riesgo inmunológico definido como la ausencia de DSA evaluados por tecnología Luminex, PRA-CDC $< 25\%$ y prueba cruzada donante/receptor negativa por CDC al momento del trasplante. En los pacientes incluidos se ha completado el seguimiento obteniendo biopsias pareadas con muestra histológica adecuada para evaluación mediante microscopía óptica, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y análisis de microarrays. Se han recogido las variables demográficas de los donantes y de los receptores y las variables relacionadas con el trasplante. En el momento de la biopsia se recogió creatinina sérica, filtrado glomerular estimado mediante la fórmula MDRD-4, proteinuria en orina de 24 horas y niveles valle de tacrolimus (TAC-C₀). Se calculó la exposición a tacrolimus hasta la primera biopsia (ng/mL/día) a partir de TAC-C₀ a la 1^a, 4^a, 8^a, 12^a semanas y el día de la biopsia según la exposición media en cada período. De forma similar, se calculó la exposición a tacrolimus hasta la segunda biopsia (ng/mL/día) a partir de TAC-C₀ a los 4, 5, 6, 8, 10, 12 meses y el día de la biopsia tardía.

Debido a que la media de los niveles valle de tacrolimus (TAC-C₀) al momento de la biopsia temprana fue 9.6 ng/mL, se seleccionaron de manera aleatoria para este estudio piloto 6 pacientes con TAC-C₀ inferior a la media y 6 pacientes con TAC-C₀ superior a la media. Además, en cada uno de los grupos según TAC-C₀ había 3 casos con progresión de FI/AT entre la biopsia temprana y la biopsia tardía y 3 casos sin progresión. Es decir, se dispone de 24 biopsias pareadas en 12 pacientes (12 tempranas y 12 tardías) que se componen de 4 grupos: 1) No progresión de la FI/AT y TAC-C₀ < 9.6 ng/mL (n=3); 2) No progresión de la FI/AT y TAC-C₀ > 9.6 ng/mL (n=3); 3) Progresión de la FI/AT y TAC-C₀ < 9.6 ng/mL (n=3); y 4) Progresión de la FI/AT y TAC-C₀ > 9.6 ng/mL (n=3).

Conclusiones:

1. Mediante el análisis estadístico "Gene Set Enrichment Analysis" GSEA no se han encontrado diferencias en la expresión de PBTs en los pacientes en los que existe una progresión de la FI/AT entre la biopsia temprana y tardía post-trasplante, independientemente de los niveles de tacrolimus. Los conjuntos de genes con los que se han contrastado nuestros datos pueden obtenerse a partir de <http://atagc.med.ualberta.ca/Research/Genelists/Pages/default.aspx>.⁽¹⁵²⁾ 2. Existe una tendencia a la asociación entre los niveles de tacrolimus al momento de la biopsia y la expresión de los PBTs QCMAT ($p=0.01$ y $FDR=0.065$) y QCAT ($p=0.05$ y $FDR=0.2167$). 3. Nuestra línea de investigación continúa en desarrollo para evaluar la relación entre la inmunosupresión del injerto y la expresión génica asociada a la alorespuesta mediante análisis de microarrays.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet Lond Engl*. 20 de julio de 2013;382(9888):260-72.
2. vol2_09_CVD_15.pdf [Internet]. [citado 23 de febrero de 2017]. Disponible en: https://www.usrds.org/2015/download/vol2_09_CVD_15.pdf
3. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*. 2 de diciembre de 1999;341(23):1725-30.
4. Carrel A, Guthrie CC. SUCCESSFUL TRANSPLANTATION OF BOTH KIDNEYS FROM A DOG INTO A BITCH WITH REMOVAL OF BOTH NORMAL KIDNEYS FROM THE LATTER. *Science*. 9 de marzo de 1906;23(584):394-5.
5. Carrel A. TRANSPLANTATION IN MASS OF THE KIDNEYS. *J Exp Med*. 1 de enero de 1908;10(1):98-140.
6. Hamilton DN, Reid WA. Yu. Yu. Voronoy and the first human kidney allograft. *Surg Gynecol Obstet*. septiembre de 1984;159(3):289-94.
7. Guild WR, Harrison JH, Merrill JP, Murray J. Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 1956 de 1955;67:167-73.
8. The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1980 awarded to Baruj Benacerraf, Jean Dausset & George D. Snell. *Scand J Immunol*. abril de 1992;35(4):373-98.
9. Snell GD. The Nobel Lectures in Immunology. Lecture for the Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1980: Studies in histocompatibility. *Scand J Immunol*. octubre de 1992;36(4):513-26.
10. Terasaki PI, Rich NE. QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTIBODY AND COMPLEMENT DIRECTED AGAINST LYMPHOCYTES. *J Immunol Baltim Md 1950*. enero de 1964;92:128-38.
11. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 3 de abril de 1969;280(14):735-9.
12. Elion GB. The George Hitchings and Gertrude Elion Lecture. The pharmacology of azathioprine. *Ann N Y Acad Sci*. 23 de junio de 1993;685:400-7.
13. Starzl TE, Groth CG, Terasaki PI, Putnam CW, Brettschneider L, Marchioro TL. Heterologous antilymphocyte globulin, histoincompatibility matching, and human renal homotransplantation. *Surg Gynecol Obstet*. mayo de 1968;126(5):1023-35.
14. Moreso F, Alonso A, Gentil MA, González-Molina M, Capdevila L, Marcén R, et al. Improvement in late renal allograft survival between 1990 and 2002 in Spain: results from

- a multicentre case-control study. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. septiembre de 2010;23(9):907-13.
15. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Stewart DE, et al. OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. enero de 2015;15 Suppl 2:1-34.
 16. Memoria Donación 2016.pdf [Internet]. [citado 16 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20Donaci%C3%B3n%202016.pdf>
 17. Registre de malalts renales [Internet]. Donació i trasplantament. [citado 14 de junio de 2017]. Disponible en: http://trasplantaments.gencat.cat/ca/recursos/registres_activitat_i_seguiment/registre_de_malalts_renales/
 18. Tan JC, Workeneh B, Busque S, Blouch K, Derby G, Myers BD. Glomerular function, structure, and number in renal allografts from older deceased donors. *J Am Soc Nephrol JASN*. enero de 2009;20(1):181-8.
 19. Anglicheau D, Loupy A, Lefaucheur C, Pessione F, Létourneau I, Côté I, et al. A simple clinico-histopathological composite scoring system is highly predictive of graft outcomes in marginal donors. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. noviembre de 2008;8(11):2325-34.
 20. De Vusser K, Lerut E, Kuypers D, Vanrenterghem Y, Jochmans I, Monbaliu D, et al. The predictive value of kidney allograft baseline biopsies for long-term graft survival. *J Am Soc Nephrol JASN*. noviembre de 2013;24(11):1913-23.
 21. 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 Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. marzo de 2009;9(3):527-35.
 22. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation*. 27 de mayo de 2009;87(10):1505-13.
 23. Heilman RL, Nijim A, Desmarteau YM, Khamash H, Pando MJ, Smith ML, et al. De novo donor-specific human leukocyte antigen antibodies early after kidney transplantation. *Transplantation*. 27 de diciembre de 2014;98(12):1310-5.
 24. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, Wang J, Reinsmoen NL, Lai C-H, et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med*. 17 de julio de 2008;359(3):242-51.
 25. Montgomery RA, Lonze BE, King KE, Kraus ES, Kucirka LM, Locke JE, et al. Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *N Engl J Med*. 28 de julio de 2011;365(4):318-26.
 26. Orandi BJ, Montgomery RA, Segev DL. Kidney Transplants from HLA-Incompatible Live Donors and Survival. *N Engl J Med*. 21 de julio de 2016;375(3):288-9.

27. 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 Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* febrero de 2012;12(2):388-99.
28. García-Carro C, Dörje C, Åsberg A, Midtvedt K, Scott H, Reinholt FP, et al. Inflammation in Early Kidney Allograft Surveillance Biopsies With and Without Associated Tubulointerstitial Chronic Damage as a Predictor of Fibrosis Progression and Development of De Novo Donor Specific Antibodies. *Transplantation.* junio de 2017;101(6):1410-5.
29. Moreso F, Hernández D. Has the survival of the graft improved after renal transplantation in the era of modern immunosuppression? *Nefrol Publicacion Of Soc Espanola Nefrol.* 18 de enero de 2013;33(1):14-26.
30. Chapman JR. Do protocol transplant biopsies improve kidney transplant outcomes? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* noviembre de 2012;21(6):580-6.
31. Furness PN, Philpott CM, Chorbajian MT, Nicholson ML, Bosmans J-L, Corthouts BL, et al. Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates. *Transplantation.* 27 de septiembre de 2003;76(6):969-73.
32. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int.* agosto de 1993;44(2):411-22.
33. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* febrero de 1999;55(2):713-23.
34. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* junio de 2003;3(6):708-14.
35. Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* enero de 2017;17(1):28-41.
36. Mengel M, Chapman JR, Cosio FG, Cavaillé-Coll MW, Haller H, Halloran PF, et al. Protocol biopsies in renal transplantation: insights into patient management and pathogenesis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* marzo de 2007;7(3):512-7.
37. Serón D, Moreso F. Protocol biopsies in renal transplantation: prognostic value of structural monitoring. *Kidney Int.* septiembre de 2007;72(6):690-7.
38. Arias M, Serón D, Moreso F, Bestard O, Praga M. Chronic renal allograft damage: existing challenges. *Transplantation.* 15 de mayo de 2011;91(9 Suppl):S4-25.

39. Alwall N. Aspiration biopsy of the kidney, including i.a. a report of a case of amyloidosis diagnosed through aspiration biopsy of the kidney in 1944 and investigated at an autopsy in 1950. *Acta Med Scand.* 29 de septiembre de 1952;143(6):430-5.
40. Henderson LK, Nankivell BJ, Chapman JR. Surveillance protocol kidney transplant biopsies: their evolving role in clinical practice. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* agosto de 2011;11(8):1570-5.
41. Burstein DM, Korbet SM, Schwartz MM. The use of the automatic core biopsy system in percutaneous renal biopsies: a comparative study. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* octubre de 1993;22(4):545-52.
42. Schwarz A, Gwinner W, Hiss M, Radermacher J, Mengel M, Haller H. Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* agosto de 2005;5(8):1992-6.
43. McMahon GM, McGovern ME, Bijol V, Benson CB, Foley R, Munkley K, et al. Development of an outpatient native kidney biopsy service in low-risk patients: a multidisciplinary approach. *Am J Nephrol.* 2012;35(4):321-6.
44. Romero Simó M, Aguayo Albasini JL. [Major ambulatory surgery and clinical pathways: a stimulating combination]. *Cirugia Espanola.* octubre de 2010;88(4):228-31.
45. Furness PN, Philpott CM, Chorbajian MT, Nicholson ML, Bosmans J-L, Corthouts BL, et al. Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates. *Transplantation.* 27 de septiembre de 2003;76(6):969-73.
46. Tapia-Canelas C, Zometa R, López-Oliva MO, Jiménez C, Rivas B, Escuin F, et al. [Complications associated with renal graft biopsy in transplant patients]. *Nefrol Publicacion Of Soc Espanola Nefrol.* 2014;34(1):115-9.
47. Birk PE, Blydt-Hansen TD, Dart AB, Kaita LM, Proulx C, Taylor G. Low incidence of adverse events in outpatient pediatric renal allograft biopsies. *Pediatr Transplant.* marzo de 2007;11(2):196-200.
48. Yablon Z, Recupero P, McKenna J, Vella J, Parker MG. Kidney allograft biopsy: timing to complications. *Clin Nephrol.* julio de 2010;74(1):39-45.
49. PubMed entry [Internet]. [citado 6 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537423>
50. Rush. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *transplantation.*
51. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 11 de diciembre de 2003;349(24):2326-33.
52. Arias M, Serón D, Moreso F, Bestard O, Praga M. Chronic renal allograft damage: existing challenges. *Transplantation.* 15 de mayo de 2011;91(9 Suppl):S4-25.

53. Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, Park WD, Moore SB, DeGoey S, et al. Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* septiembre de 2007;7(9):2124-32.
54. Hill GS, Nochy D, Bruneval P, Duong van Huyen JP, Glotz D, Suberbielle C, et al. Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol JASN.* mayo de 2011;22(5):975-83.
55. Loupy A, Hill GS, Suberbielle C, Charron D, Anglicheau D, Zuber J, et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* enero de 2011;11(1):56-65.
56. Haas M, Montgomery RA, Segev DL, Rahman MH, Racusen LC, Bagnasco SM, et al. Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* marzo de 2007;7(3):576-85.
57. Kraus ES, Parekh RS, Oberai P, Lepley D, Segev DL, Bagnasco S, et al. Subclinical rejection in stable positive crossmatch kidney transplant patients: incidence and correlations. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* agosto de 2009;9(8):1826-34.
58. Djamali A, Muth BL, Ellis TM, Mohamed M, Fernandez LA, Miller KM, et al. Increased C4d in post-reperfusion biopsies and increased donor specific antibodies at one-week post transplant are risk factors for acute rejection in mild to moderately sensitized kidney transplant recipients. *Kidney Int.* junio de 2013;83(6):1185-92.
59. Kikić Ž, Kainz A, Kozakowski N, Oberbauer R, Regele H, Bond G, et al. Capillary C4d and Kidney Allograft Outcome in Relation to Morphologic Lesions Suggestive of Antibody-Mediated Rejection. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 7 de agosto de 2015;10(8):1435-43.
60. Scornik JC, Salomon DR, Lim PB, Howard RJ, Pfaff WW. Posttransplant antidonor antibodies and graft rejection. Evaluation by two-color flow cytometry. *Transplantation.* febrero de 1989;47(2):287-90.
61. Lederer SR, Schneeberger H, Albert E, Johnson JP, Gruber R, Land W, et al. Early renal graft dysfunction. The role of preformed antibodies to DR-typed lymphoblastoid cell lines. *Transplantation.* 27 de enero de 1996;61(2):313-9.
62. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolloff-Rubin N, et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol JASN.* octubre de 1999;10(10):2208-14.
63. Buchmann TN, Wolff T, Bachmann A, Guerke L, Steiger J, Mihatsch MJ, et al. Repeat true surveillance biopsies in kidney transplantation. *Transplantation.* 15 de mayo de 2012;93(9):908-13.
64. Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* septiembre de 2006;6(9):2006-12.

65. Loupy A, Vernerey D, Tinel C, Aubert O, Duong van Huyen J-P, Rabant M, et al. Subclinical Rejection Phenotypes at 1 Year Post-Transplant and Outcome of Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol JASN*. julio de 2015;26(7):1721-31.
66. Roberts ISD, Reddy S, Russell C, Davies DR, Friend PJ, Handa AI, et al. Subclinical rejection and borderline changes in early protocol biopsy specimens after renal transplantation. *Transplantation*. 27 de abril de 2004;77(8):1194-8.
67. Snanoudj R, Royal V, Elie C, Rabant M, Girardin C, Morelon E, et al. Specificity of histological markers of long-term CNi nephrotoxicity in kidney-transplant recipients under low-dose cyclosporine therapy. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. diciembre de 2011;11(12):2635-46.
68. Stegall MD, Park WD, Larson TS, Gloor JM, Cornell LD, Sethi S, et al. The histology of solitary renal allografts at 1 and 5 years after transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. abril de 2011;11(4):698-707.
69. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. mayo de 2012;12(5):1157-67.
70. 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*. 15 de enero de 2012;93(1):41-6.
71. Gonzales MM, Bentall A, Kremers WK, Stegall MD, Borrows R. Predicting Individual Renal Allograft Outcomes Using Risk Models with 1-Year Surveillance Biopsy and Alloantibody Data. *J Am Soc Nephrol JASN*. octubre de 2016;27(10):3165-74.
72. Shabir S, Halimi J-M, Cherukuri A, Ball S, Ferro C, Lipkin G, et al. Predicting 5-year risk of kidney transplant failure: a prediction instrument using data available at 1 year posttransplantation. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. abril de 2014;63(4):643-51.
73. Rush D, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Grimm P, Cheang M, et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol JASN*. noviembre de 1998;9(11):2129-34.
74. Rush D, Arlen D, Boucher A, Busque S, Cockfield SM, Girardin C, et al. Lack of benefit of early protocol biopsies in renal transplant patients receiving TAC and MMF: a randomized study. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. noviembre de 2007;7(11):2538-45.
75. Kurtkoti J, Sakhuja V, Sud K, Minz M, Nada R, Kohli HS, et al. The utility of 1- and 3-month protocol biopsies on renal allograft function: a randomized controlled study. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. febrero de 2008;8(2):317-23.
76. Heilman RL, Devarapalli Y, Chakkerla HA, Mekeel KL, Moss AA, Mulligan DC, et al. Impact of subclinical inflammation on the development of interstitial fibrosis and tubular atrophy in kidney transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. marzo de 2010;10(3):563-70.

77. Mota A, Arias M, Taskinen EI, Paavonen T, Brault Y, Legendre C, et al. Sirolimus-based therapy following early cyclosporine withdrawal provides significantly improved renal histology and function at 3 years. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* junio de 2004;4(6):953-61.
78. Flechner SM, Kurian SM, Solez K, Cook DJ, Burke JT, Rollin H, et al. De novo kidney transplantation without use of calcineurin inhibitors preserves renal structure and function at two years. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* noviembre de 2004;4(11):1776-85.
79. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blanco G, et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med.* 25 de agosto de 2005;353(8):770-81.
80. Larson TS, Dean PG, Stegall MD, Griffin MD, Textor SC, Schwab TR, et al. Complete avoidance of calcineurin inhibitors in renal transplantation: a randomized trial comparing sirolimus and tacrolimus. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* marzo de 2006;6(3):514-22.
81. Rowshani AT, Scholten EM, Bemelman F, Eikmans M, Idu M, Roos-van Groningen MC, et al. No difference in degree of interstitial Sirius red-stained area in serial biopsies from area under concentration-over-time curves-guided cyclosporine versus tacrolimus-treated renal transplant recipients at one year. *J Am Soc Nephrol JASN.* enero de 2006;17(1):305-12.
82. Naesens M, Lerut E, Damme BV, Vanrenterghem Y, Kuypers DRJ. Tacrolimus exposure and evolution of renal allograft histology in the first year after transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* septiembre de 2007;7(9):2114-23.
83. Anil Kumar MS, Irfan Saeed M, Ranganna K, Malat G, Sustento-Reodica N, Kumar AMS, et al. Comparison of four different immunosuppression protocols without long-term steroid therapy in kidney recipients monitored by surveillance biopsy: five-year outcomes. *Transpl Immunol.* noviembre de 2008;20(1-2):32-42.
84. Gelens MACJ, Steegh FMEG, van Hooff JP, van Suylen RJ, Nieman FHM, van Heurn LWE, et al. Immunosuppressive regimen and interstitial fibrosis and tubules atrophy at 12 months postrenal transplant. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* junio de 2012;7(6):1010-7.
85. Kowalski R, Post D, Schneider MC, Britz J, Thomas J, Deierhoi M, et al. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin Transplant.* abril de 2003;17(2):77-88.
86. Mashishi T, Gray CM. The ELISPOT assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes. *Clin Chem Lab Med.* septiembre de 2002;40(9):903-10.
87. Bestard O, Cruzado JM, Lucia M, Crespo E, Casis L, Sawitzki B, et al. Prospective assessment of antidonor cellular alloreactivity is a tool for guidance of immunosuppression in kidney transplantation. *Kidney Int.* diciembre de 2013;84(6):1226-36.

88. Hricik DE, Rodriguez V, Riley J, Bryan K, Tary-Lehmann M, Greenspan N, et al. Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* julio de 2003;3(7):878-84.
89. Bestard O, Crespo E, Stein M, Lúcia M, Roelen DL, de Vaal YJ, et al. Cross-validation of IFN- γ Elispot assay for measuring alloreactive memory/effector T cell responses in renal transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* julio de 2013;13(7):1880-90.
90. Li L, Khatri P, Sigdel TK, Tran T, Ying L, Vitalone MJ, et al. A peripheral blood diagnostic test for acute rejection in renal transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* octubre de 2012;12(10):2710-8.
91. Crespo M, Heidt S, Redondo D, Pascual J. Monitoring B cell subsets and alloreactivity in kidney transplantation. *Transplant Rev Orlando Fla.* abril de 2015;29(2):45-52.
92. Martin S, Dyer PA, Mallick NP, Gokal R, Harris R, Johnson RW. Posttransplant antidonor lymphocytotoxic antibody production in relation to graft outcome. *Transplantation.* julio de 1987;44(1):50-3.
93. PubMed entry [Internet]. [citado 15 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2301035>
94. Katerinis I, Hadaya K, Duquesnoy R, Ferrari-Lacraz S, Meier S, van Delden C, et al. De novo anti-HLA antibody after pandemic H1N1 and seasonal influenza immunization in kidney transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* agosto de 2011;11(8):1727-33.
95. 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.* octubre de 2016;100(10):2194-202.
96. Willicombe M, Brookes P, Sergeant R, Santos-Nunez E, Steggar C, Galliford J, et al. De novo DQ donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Transplantation.* 27 de julio de 2012;94(2):172-7.
97. DeVos JM, Gaber AO, Knight RJ, Land GA, Suki WN, Gaber LW, et al. Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int.* septiembre de 2012;82(5):598-604.
98. 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.* 15 de febrero de 2013;95(3):410-7.
99. de Kort H, Willicombe M, Brookes P, Dominy KM, Santos-Nunez E, Galliford JW, et al. Microcirculation inflammation associates with outcome in renal transplant patients with de novo donor-specific antibodies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* febrero de 2013;13(2):485-92.

100. Liefeldt L, Brakemeier S, Glander P, Waiser J, Lachmann N, Schönemann C, et al. Donor-specific HLA antibodies in a cohort comparing everolimus with cyclosporine after kidney transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. mayo de 2012;12(5):1192-8.
101. Crespo M, Yelamos J, Redondo D, Muntasell A, Perez-Saéz MJ, López-Montañés M, et al. Circulating NK-cell subsets in renal allograft recipients with anti-HLA donor-specific antibodies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. marzo de 2015;15(3):806-14.
102. Locke JE, Zachary AA, Warren DS, Segev DL, Houp JA, Montgomery RA, et al. Proinflammatory events are associated with significant increases in breadth and strength of HLA-specific antibody. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. septiembre de 2009;9(9):2136-9.
103. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen J-P, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med*. 26 de septiembre de 2013;369(13):1215-26.
104. Hönger G, Wahrmann M, Amico P, Hopfer H, Böhmig GA, Schaub S. C4d-fixing capability of low-level donor-specific HLA antibodies is not predictive for early antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 27 de junio de 2010;89(12):1471-5.
105. PubMed entry [Internet]. [citado 15 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167441>
106. 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 JASN*. febrero de 2015;26(2):457-67.
107. 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*. junio de 2015;99(6):1151-5.
108. Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, Savchik C, Masiakos P, Colovai A, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. *Kidney Int*. enero de 2016;89(1):209-16.
109. Freitas MCS, Rebellato LM, Ozawa M, Nguyen A, Sasaki N, Everly M, et al. The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes. *Transplantation*. 15 de mayo de 2013;95(9):1113-9.
110. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Briley KP, Bolin P, Kendrick WT, et al. Impact of IgM and IgG3 anti-HLA alloantibodies in primary renal allograft recipients. *Transplantation*. 15 de marzo de 2014;97(5):494-501.
111. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen J-P, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *J Am Soc Nephrol JASN*. enero de 2016;27(1):293-304.

112. Khovanova N, Daga S, Shaikhina T, Krishnan N, Jones J, Zehnder D, et al. Subclass analysis of donor HLA-specific IgG in antibody-incompatible renal transplantation reveals a significant association of IgG4 with rejection and graft failure. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. diciembre de 2015;28(12):1405-15.
113. Betjes MGH, Langerak AW, van der Spek A, de Wit EA, Litjens NHR. Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*. julio de 2011;80(2):208-17.
114. Krenzien F, ElKhal A, Quante M, Rodriguez Cetina Bieffer H, Hirofumi U, Gabardi S, et al. A Rationale for Age-Adapted Immunosuppression in Organ Transplantation. *Transplantation*. noviembre de 2015;99(11):2258-68.
115. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. The aging of the immune system. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. noviembre de 2009;22(11):1041-50.
116. Abadja F, Atemkeng S, Alamartine E, Berthoux F, Mariat C. Impact of mycophenolic acid and tacrolimus on Th17-related immune response. *Transplantation*. 27 de agosto de 2011;92(4):396-403.
117. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. junio de 2010;120(6):1836-47.
118. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 de enero de 1997;94(2):695-700.
119. Shihab FS, Yamamoto T, Nast CC, Cohen AH, Noble NA, Gold LI, et al. Transforming growth factor-beta and matrix protein expression in acute and chronic rejection of human renal allografts. *J Am Soc Nephrol JASN*. agosto de 1995;6(2):286-94.
120. Halloran PF, De Freitas DG, Einecke G, Famulski KS, Hidalgo LG, Mengel M, et al. The Molecular Phenotype of Kidney Transplants. *Am J Transplant*. 1 de octubre de 2010;10(10):2215-22.
121. Hidalgo LG, Einecke G, Allanach K, Mengel M, Sis B, Mueller TF, et al. The transcriptome of human cytotoxic T cells: measuring the burden of CTL-associated transcripts in human kidney transplants. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. marzo de 2008;8(3):637-46.
122. Famulski KS, Einecke G, Sis B, Mengel M, Hidalgo LG, Kaplan B, et al. Defining the canonical form of T-cell-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. abril de 2010;10(4):810-20.
123. Famulski KS, Einecke G, Reeve J, Ramassar V, Allanach K, Mueller T, et al. Changes in the transcriptome in allograft rejection: IFN-gamma-induced transcripts in mouse kidney allografts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. junio de 2006;6(6):1342-54.

124. Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell PM, Mengel M, Einecke G, et al. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* agosto de 2010;10(8):1812-22.
125. Einecke G, Reeve J, Mengel M, Sis B, Bunnag S, Mueller TF, et al. Expression of B cell and immunoglobulin transcripts is a feature of inflammation in late allografts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* julio de 2008;8(7):1434-43.
126. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* noviembre de 2009;9(11):2520-31.
127. Famulski KS, de Freitas DG, Kreepala C, Chang J, Sellares J, Sis B, et al. Molecular phenotypes of acute kidney injury in kidney transplants. *J Am Soc Nephrol JASN.* mayo de 2012;23(5):948-58.
128. Einecke G, Broderick G, Sis B, Halloran PF. Early loss of renal transcripts in kidney allografts: relationship to the development of histologic lesions and alloimmune effector mechanisms. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* mayo de 2007;7(5):1121-30.
129. Hidalgo LG, Sellares J, Sis B, Mengel M, Chang J, Halloran PF. Interpreting NK cell transcripts versus T cell transcripts in renal transplant biopsies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* mayo de 2012;12(5):1180-91.
130. Mengel M, Reeve J, Bunnag S, Einecke G, Sis B, Mueller T, et al. Molecular correlates of scarring in kidney transplants: the emergence of mast cell transcripts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* enero de 2009;9(1):169-78.
131. Sellarés J, Reeve J, Loupy A, Mengel M, Sis B, Skene A, et al. Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* abril de 2013;13(4):971-83.
132. Reeve J, Sellarés J, Mengel M, Sis B, Skene A, Hidalgo L, et al. Molecular diagnosis of T cell-mediated rejection in human kidney transplant biopsies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* marzo de 2013;13(3):645-55.
133. Halloran PF, Reeve J, Akalin E, Aubert O, Bohmig GA, Brennan D, et al. Real Time Central Assessment of Kidney Transplant Indication Biopsies by Microarrays: The INTERCOMEX Study. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 27 de abril de 2017;
134. Halloran PF, de Freitas DG, Einecke G, Famulski KS, Hidalgo LG, Mengel M, et al. An integrated view of molecular changes, histopathology and outcomes in kidney transplants. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* octubre de 2010;10(10):2223-30.

135. Mengel M, Chang J, Kayser D, Gwinner W, Schwarz A, Einecke G, et al. The Molecular Phenotype of 6-Week Protocol Biopsies from Human Renal Allografts: Reflections of Prior Injury but Not Future Course. *Am J Transplant*. Abril de 2011;11(4):708-18.
136. Scherer A, Gwinner W, Mengel M, Kirsch T, Raulf F, Szustakowski JD, et al. Transcriptome changes in renal allograft protocol biopsies at 3 months precede the onset of interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) at 6 months. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. agosto de 2009;24(8):2567-75.
137. Moreso F, Serón D, Carrera M, Gil-Vernet S, Cruzado JM, Hueso M, et al. Baseline immunosuppression is associated with histological findings in early protocol biopsies. *Transplantation*. 15 de octubre de 2004;78(7):1064-8.
138. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*. 20 de diciembre de 2007;357(25):2562-75.
139. Serón D, Moreso F, Fulladosa X, Hueso M, Carrera M, Grinyó JM. Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies. *Kidney Int*. febrero de 2002;61(2):727-33.
140. Hricik DE, Formica RN, Nickerson P, Rush D, Fairchild RL, Poggio ED, et al. Adverse Outcomes of Tacrolimus Withdrawal in Immune-Quiescent Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol JASN*. diciembre de 2015;26(12):3114-22.
141. Dugast E, Souillou J-P, Foucher Y, Papuchon E, Guerif P, Paul C, et al. Failure of Calcineurin Inhibitor (Tacrolimus) Weaning Randomized Trial in Long-Term Stable Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. noviembre de 2016;16(11):3255-61.
142. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. junio de 2010;120(6):1848-61.
143. Bottomley MJ, Chen M, Fuggle S, Harden PN, Wood KJ. Application of Operational Tolerance Signatures Are Limited by Variability and Type of Immunosuppression in Renal Transplant Recipients: A Cross-Sectional Study. *Transplant Direct*. enero de 2017;3(1):e125.
144. Roedder S, Li L, Alonso MN, Hsieh S-C, Vu MT, Dai H, et al. A Three-Gene Assay for Monitoring Immune Quiescence in Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol JASN*. agosto de 2015;26(8):2042-53.
145. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. marzo de 2007;7(3):518-26.
146. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial

- lesions. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* febrero de 2014;14(2):272-83.
147. Chen G, Sequeira F, Tyan DB. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol.* octubre de 2011;72(10):849-58.
148. 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.* 21 de septiembre de 2016;
149. Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KMK, Cusick MF, Gordon RA, Leventhal JR, et al. Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* septiembre de 2015;15(9):2421-30.
150. Kahwaji J, Najjar R, Kancharla 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.* mayo de 2014;28(5):546-53.
151. 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 Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* marzo de 2017;17(3):682-91.
152. Gene List - Faculty of Medicine & Dentistry [Internet]. [citado 15 de junio de 2017]. Disponible en: <https://www.ualberta.ca/medicine/institutes-centres-groups/atagc/research/gene-list>

9. ANEXOS

9.1. **Torres IB**, Reisæter, A, Moreso F, Åsberg A, Vidal M, García-Carro C, Midtvedt K, Reinholt FP, Scott H, Castella, E, Salcedo M, Dörje C, Sellares J, Azancot MA, Perello M, Holdaas H, Seron D. Tacrolimus and mycophenolate regimen and subclinical tubulo-interstitial inflammation in low immunological risk renal transplants. *Transplant Int* 2017 (en prensa). Impact Factor: 3.079

Resumen. Se ha demostrado que el tipo de tratamiento inmunosupresor se asocia con distintos grados de inflamación subclínica y con distintos grados de progresión de la fibrosis intersticial/atrofia tubular. Sin embargo, a pesar de que un régimen de mantenimiento basado en la combinación de tacrolimus y micofenolato mofetilo (MMF) se asocia con una incidencia muy baja de inflamación subclínica, no se ha estudiado si distintas combinaciones este tratamiento ofrecen diferentes resultados. En este trabajo se han evaluado dos cohortes de pacientes de bajo riesgo inmunológico (Barcelona y Oslo), monitorizadas mediante una biopsia temprana y una tardía. En la cohorte de Barcelona se emplean dosis intermedias de MMF (2g/día durante 4 semanas y 1 g/día posteriormente) y dosis plenas de tacrolimus (niveles valle diana de 8-12 ng/mL el primer trimestre y 6-10 ng/mL a partir del 4º mes). En la cohorte de Oslo se emplean dosis plenas de MMF (1.5 g/día que solo se reduce a criterio clínico durante el seguimiento) y dosis de reducidas de tacrolimus (niveles valle diana de 3-7 ng/mL). En la cohorte de Barcelona, se ha observado una asociación independiente entre los niveles valle de tacrolimus al momento de biopsia y la presencia de inflamación subclínica tanto en la biopsia temprana como en la tardía. En la cohorte de Oslo, se ha observado una asociación independiente entre la dosis de MMF y la presencia de inflamación subclínica en la biopsia temprana. Entre ambas biopsias, la dosis de MMF se ha reducido a criterio clínico en el 30% de los pacientes. En la biopsia tardía, se observa al igual que en la cohorte de Barcelona una asociación independiente entre los niveles valle de tacrolimus al momento de la biopsia y el grado de inflamación subclínica. Estos resultados sugieren que el grado de inmunosupresión global aportado por ambos fármacos contribuye a controlar la inflamación subclínica. Dado que esta inflamación subclínica contribuye al desarrollo de anticuerpos anti-HLA, a la progresión de la fibrosis y a la pérdida tardía del injerto, los datos de este trabajo apoyan no realizar una minimización de ambos fármacos. Cabe destacar, que

recientemente un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado muestra que en los pacientes que reciben dosis intermedias de MMF (1.2 g/día), los niveles valle de tacrolimus < 7 ng/mL entre el 4º y el 12º mes, se asocian a una mayor incidencia de rechazo clínico y subclínico y un mayor riesgo de desarrollar anticuerpos donante-específicos.

En este estudio, la progresión de la fibrosis intersticial / atrofia tubular es leve en ambas cohortes y se asocia fundamentalmente con variables del donante.

Transplant International



Draft Manuscript for Review

Tacrolimus and mycophenolate regimen and subclinical tubulo-interstitial inflammation in low immunological risk renal transplants

Journal:	<i>Transplant International</i>
Manuscript ID:	TRI-OA-17-0216.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	03-Jun-2017
Complete List of Authors:	Torres, Irina; Hospital Universitari Vall d'Hebron, Nephrology Reisæter, Anna; OUS Rikshospitalet, Transplant Medicine Moreso, Francesc; Hospital Universitari Vall d'Hebron, Nephrology Asberg, Anders; University of Oslo, School of Pharmacy Vidal, Marta; Hospital Vall d'Hebron, Pathology García, Clara; Hospital Universitari Vall d'Hebron, Nephrology Midtvedt, Karsten; Oslo University Hospital, Department of Transplant Medicine Reinholt, Finn; Oslo University Hospital Rikshospitalet, Pathology Scott, Helge; Oslo University Hospital Rikshospitalet, Transplantation Medicine Castella, Eva; Hospital Universitari Vall d'Hebron, Radiology Salcedo, Maite; Hospital Universitari Vall d'Hebron, Pathology Dörje, Christina; Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Department of Organ Transplantation, Section of Nephrology Sellares Roig, Joana; Hospital Universitari Vall d'Hebrón, Nephrology Azancot, Maria; Hospital Vall d'Hebron, Nephrology Perello, Manel; Hospital Vall d'Hebron, Nephrology Holdaas, Hallvard; Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Department of Organ Transplantation, Section of Nephrology Seron, Daniel; Hospital General Universitari, Nephrology;
Keywords:	Mycophenolat Mofetil < Immunosuppression Clinical, Calcineurins Antagonists < Immunosuppression Clinical, Rejection < Kidney Clinical

SCHOLARONE™
Manuscripts

Transplant International

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Title: Tacrolimus and mycophenolate regimen and subclinical tubulo-interstitial inflammation in low immunological risk renal transplants

Authors: Irina B. Torres, MD¹; Anna V Reisæter, MD, PhD²; Francesc Moreso, MD, PhD¹, Anders Åsberg^{2,5}, MD, PhD²; Marta Vidal, MD³; Clara Garcia-Carro, MD¹; Karsten Midtvedt, MD, PhD²; Finn P. Reinholt, MD, PhD⁴; Helge Scott, MD, PhD⁴; Eva Castellà; MD⁵, Maite Salcedo, MD³; Christina Dörje, MD, PhD²; Joana Sellarés, MD, PhD¹; Maria A. Azancot, MD¹; Manel Perello, MD¹; Hallvard Holdaas, MD, PhD²; Daniel Serón, MD, PhD¹.

Institutions: Nephrology¹, Pathology³ and Radiology⁵ Departments, Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, Spain. Transplant Medicine² and Pathology Departments⁴. Oslo University Hospital. Rikshospitalet. Oslo, Norway. School of Pharmacy⁵, University of Oslo, Norway.

Address for correspondence: Francesc Moreso, MD, PhD. Nephrology Department. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Passeig Vall d'Hebron 119-129. 08035 Barcelona. Spain. E-mail: fjmoreso@vhebron.net. Phone: +34 932 74 60 79.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Authorship

IBT participates in the acquisition, analysis and interpretation of data, drafts and approves the final version of the article.

AVR participates in the acquisition and interpretation of data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

FM participates in the study design, acquisition, analysis and interpretation of data, drafts and approves the final version of the article.

AA participates in the acquisition and interpretation of data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

MV participates in the acquisition of data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

CG-C participates in the acquisition of data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

KM participates in the acquisition and interpretation of the data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

FPR participates in the acquisition of data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

HS participates in the acquisition of data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

EC participates in the acquisition of data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

MS participates in the acquisition data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

CD participates in the acquisition of data, revising the manuscript; and and approves the final version of the article.

JS participates in the acquisition of data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

MAA participates in the acquisition of data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MP participates in the acquisition of data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

HH participates in the acquisition and interpretation of data, revising the manuscript and approves the final version of the article.

DS participates in the study design, analysis and interpretation of data, drafts and approves the final version of the article.

Disclosures. The authors declare no conflicts of interest.

Funding. This work was supported by a SET (Sociedad Española de Trasplante-Novartis) grant, Instituto Salud Carlos III (PI14/01383, PIE13/00027) and Red de Investigación renal (REDinREN 16/009/30) grants. IB Torres was supported by a VHIR (Vall d'Hebron Research Institute) grant and MA Azancot was supported by a PFIS 11/0246 (Fondo Investigación Sanitaria) grant.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abbreviations

ci-score, scoring for interstitial fibrosis

ct-score, scoring for tubular atrophy

i-score, scoring for interstitial inflammation in non-scarred cortex

i-IFTA, scoring for interstitial inflammation in scarred cortex

i+t, scoring for interstitial inflammation plus tubulitis in non scarred cortex

i-IFTA+t-IFTA, scoring for interstitial inflammation plus tubulitis in scarred cortex

IF/TA, interstitial fibrosis/tubular atrophy

t-score, scoring for tubulitis in non-scarred cortex

t-IFTA, scoring for tubulitis in scarred cortex

MMF, mycophenolate mofetil

mTOR, mammalian target of rapamycin

TAC, tacrolimus

TAC-C₀, tacrolimus trough levels

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

The aim was to evaluate the relationship between maintenance immunosuppression, subclinical tubulo-interstitial inflammation and interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) in surveillance biopsies performed in low immunological risk renal transplants at two transplant centers. The Barcelona cohort consisted of 109 early and 66 late biopsies in patients receiving high tacrolimus (TAC-C₀ target at 1-year 6-10 ng/mL) and reduced MMF dose (500 mg bid at 1-year). The Oslo cohort consisted of 262 early and 237 late biopsies performed in patients treated with low TAC-C₀ (target 3-7 ng/mL) and standard MMF dose (750 mg bid). Subclinical inflammation, adjusted for confounders, was associated with low TAC-C₀ in the early (OR: 0.75, 95%CI: 0.61-0.92; p=0.006) and late biopsies (OR: 0.69, 95%CI: 0.50-0.95; p=0.023) from Barcelona. In the Oslo cohort, it was associated with low MMF in early biopsies (OR: 0.90, 95%CI: 0.83-0.98; p=0.0101) and with low TAC-C₀ in late biopsies (OR: 0.77, 95%CI: 0.61-0.97; p=0.0286). MMF dose was significantly reduced in Oslo between early and late biopsies. IF/TA was not associated with TAC-C₀ or MMF dose in the multivariate analysis. Our data suggest that in TAC and MMF based regimens, TAC-C₀ levels are associated with subclinical inflammation in patients receiving reduced MMF dose.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

Early surveillance biopsy studies showed that subclinical tubulo-interstitial inflammation is present in more than 50% of biopsies and is associated with an accelerated progression of chronic tubulo-interstitial damage¹ and glomerular sclerosis². This observation raised the question whether treatment of subclinical tubulo-interstitial inflammation could prevent progression of chronic lesions and improve outcome. This point was addressed in a clinical trial done in cyclosporine and azathioprine treated patients, in which the study group was biopsied early after transplantation at defined time points and treated with steroid pulses if subclinical tubulo-interstitial inflammation was present, while the control group was not biopsied and accordingly not treated. The study group had a lower degree of fibrosis at 6 months and a better renal function at 24 months³. Years later, this trial was repeated in patients treated with tacrolimus (TAC) and mycophenolate mofetil (MMF) and no benefit of treatment of subclinical tubulo-interstitial inflammation could be demonstrated⁴. The main difference between the first and second study was that the prevalence of subclinical inflammation was over 50% in the first and less than 10% in the second study, suggesting that a TAC and MMF regimen prevents subclinical inflammation as confirmed in other observational studies⁵⁻⁷. However, it has recently been shown that even in TAC and MMF treated patients the presence of subclinical tubulo-interstitial inflammation is not only associated with an accelerated progression of interstitial fibrosis and tubular atrophy but also with an increased risk for the appearance of *de novo* donor specific antibodies and antibody-mediated rejection⁸.

During the last decade the combination of TAC and MMF has become the standard of care in the majority of renal transplant units. In some centers, TAC minimization has been favoured, especially after the publication of the Elite-Symphony trial that showed that reduced TAC (target TAC-C₀ of 3-7 ng/mL) associated with daclizumab, full dose MMF (2 g/day) and prednisone was superior to a cyclosporine or sirolimus based regimen⁹. However, tacrolimus and cyclosporine have different effects on exposure to concomitantly administered MMF and for this reason it has been recommended to use a 50% lower dose of MMF in combination with TAC compared to cyclosporin¹⁰. Thus, there exists significant variability in TAC and MMF dosing between centers and the consequence of these different schedules on subclinical tubulo-interstitial inflammation has not been evaluated. Accordingly, the aim is to evaluate whether TAC-C₀ and/or MMF dose at the time of surveillance biopsy are associated with subclinical tubulo-interstitial inflammation and IF/TA in low immunological risk

6

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

transplants. Our hypothesis is that low TAC-C₀ and/or MMF dose at the time of biopsy are associated with subclinical tubulo-interstitial inflammation and/or IF/TA progression. To test this hypothesis we evaluate two independent cohorts of patients (Barcelona and Oslo) treated with TAC and MMF but using different target TAC-C₀ levels (lower in Oslo than in Barcelona) and MMF dose (higher in Oslo than in Barcelona).

Patients and methods

Patients

For the present study, two cohorts of adult (≥ 18 years), low immunological risk, single kidney recipients of an ABO compatible and non HLA identical renal transplant, treated with tacrolimus and MMF with a stable well functioning graft (eGFR ≥ 40 ml/min) at the time of the early surveillance biopsy were evaluated. Low immunological risk was defined as the absence of anti-HLA donor-specific antibodies (DSA) at the time of transplant, last PRA $\leq 20\%$ and negative donor/recipient complement-dependent cytotoxicity cross-match.

The first cohort consisted of renal transplants with an early (3-4 months) and a late (12-18 months) surveillance biopsies performed between February 2012 and December 2015 at Vall Hebron University Hospital from Barcelona. The second cohort consisted of renal transplant recipients performed at the Oslo University Hospital Rikshospitalet between January 2009 and December 2012 with an early (6 weeks) and a late (12 months) biopsy. Written informed consent was obtained for all patients. In both cohorts the protocol was approved by the Ethics Committee of each center and was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and is consistent with the Principles of the Declaration of Istanbul on Organ Trafficking and Transplant Tourism.

Biopsies

Surveillance renal biopsies were done as an outpatient procedure¹¹ under ultrasound guidance using spring-loaded 16-18G needles and two cores of tissue were evaluated. One core was used for optical microscopy and the other for immunofluorescence studies.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Biopsies were processed for routine light microscopy and stained with hematoxylin-eosin, periodic acid Schiff (PAS) and Masson's trichrome. Sample adequacy and histological lesions were evaluated according to the last update of the Banff criteria¹² at each center by local pathologists. In the Barcelona cohort, inflammation in areas of interstitial fibrosis (i-IFTA) and tubulitis in areas of tubular atrophy (t-IFTA) were also evaluated according to Mannon et al¹³. All biopsies were stained with an anti-SV40 antibody to discard BK polyomavirus nephropathy in Barcelona and only in patients with BK nephropathy suspicion in Oslo.

The second core of tissue was embedded in OCT, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. Immunofluorescence studies were done in 3-µm cryostat sections stained with FITC-conjugated anti-human IgG, IgA, IgM, C3, κ and λ light chain. C4d was stained with indirect immunofluorescence with a monoclonal antibody (Quidel, San Diego, CA, USA) and its deposition in peritubular capillaries was graded according to the Banff criteria¹². Conventional histology and immunofluorescence were evaluated in Barcelona and Oslo by local pathologists (M.V. and M.S in Barcelona and F.P.R. and H.S. in Oslo).

In the Barcelona cohort, surveillance biopsies were not used for the clinical management of patients and, therefore, subclinical rejection episodes were not treated. In the Oslo cohort, subclinical rejection episodes were treated with steroid pulses according to the attending physician criteria.

Immunosuppression

Standard immunosuppression in the Barcelona cohort included the use of induction therapy for all renal transplants. Recipients of a first renal transplant without HLA antibodies received 20 mg of Basiliximab (Simulect®, Novartis) at days 0 and 4. Patients with previous transplants and/or patients with positive non DSA anti-HLA antibodies were treated with 3-5 doses of rabbit anti-thymocyte globulin (Thymoglobulin®, Sanofi-Aventis) on alternate days to reach a total dose of 4-6 mg/kg. For the present study, we considered patients receiving maintenance immunosuppression based on the combination of modified-release TAC (Advagraf, Astellas Pharma) and MMF (Cellcept, Roche Pharmaceuticals) at the time of surveillance biopsies. Target TAC-C₀ was 8-12 ng/mL during the first 3 months after transplant and 6-10 ng/mL thereafter. All patients received MMF 1 g bid during the first month and 500 mg bid thereafter. Daily dose of MMF was further reduced according to

8

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

attending physician criteria in cases of suspected toxicity (mainly gastro-intestinal or hematologic). The day of transplant patients received 500 mg of methylprednisolone, 125 mg at day one and 20 mg of prednisone at day 2. Thereafter, prednisone dose was progressively reduced to reach a daily dose of 0.1 mg/kg at 3 months and maintained during follow up.

In the Oslo cohort, all patients received induction with Basiliximab and maintenance immunosuppression with reduced tacrolimus (TAC-C₀ 3-7 ng/mL), full dose MMF (1.5 g/day) that was reduced according to attending physician criteria in cases of suspected toxicity and prednisolone. The starting dose of prednisolone was 80 mg/d, tapered to 20 mg/d by day 8, 15 mg/d from day 30, 10 mg/d from day 60 aiming for 5 mg/d from day 90.¹⁴

Clinical variables

Demographic characteristics of donors and recipients as well as transplant-related variables were recorded in both cohorts. Anti-HLA antibodies at the time of transplant and at the time of each biopsy were determined by Luminex methodology in each center as previously described¹⁵⁻¹⁶. Briefly, in Barcelona anti-HLA antibodies were determined by Luminex methodology using the product Lifecodes LifeScreen Deluxe (Gen-Probe, CA) and IgG specificities were examined by single antigen beads testing with Lifecodes Luminex single antigen class I and class II kits. In Oslo, HLA antibodies were determined by Luminex platform LX200, using the LSM12- screening kit (One Lambda, CA). IgG antibody specificities was examined using single antigen-coated flow beads provided by One Lambda. A mean fluorescence intensity of 1000 as the cutoff value was employed. As a negative control, serum (LS-NC) delivered by the kit Producer (One Lambda) was used.

At the time of biopsy, serum creatinine, TAC-C₀ and MMF dose were recorded. Tacrolimus trough levels were measured by CMIA immunoassay (Abbott laboratories) and the intrassay and interassay coefficient of variation at Barcelona and Oslo lab were lower than 6%. MMF dose at the time of each biopsy was recorded and expressed as mg/kg/day¹⁷. In patients receiving enteric-coated mycophenolic acid (EC-MPA) equimolar doses to MMF were used (720 mg of EC-MPA is equivalent to 1000 mg of MMF).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CMV prophylaxis and polyoma virus surveillance were done according to local practice following the international criteria¹⁸.

Statistics

Results are expressed as absolute frequencies for categorical variables and as the mean \pm standard deviation for continuous variables. Comparison between groups for categorical variables was done by Fisher's exact test. Comparison between groups for ordinal and continuous not normally distributed variables was done by Mann-Whitney's U test. Comparison between groups for continuous normally-distributed variables was done by Student's t test or by the analysis of variance and post hoc comparisons between individual groups by the Scheffé test. Similarly, Student's paired t-test and Wilcoxon signed rank test were used to compare paired data.

Since biopsies were graded by different pathologists, the best cut-off value for tubulo-interstitial inflammation to explore a potential association between TAC-C₀ and/or MMF daily dose was evaluated in each cohort. IF/TA at one year was defined as ci+ct score ≥ 2 . Logistic regression analysis was employed to analyze variables associated with subclinical tubulo-interstitial inflammation and IF/TA at one year. Those variables with a p-value < 0.20 in the univariate analysis were considered for the multivariate analysis. All tests are two-tailed and a p-value < 0.05 was considered significant. We used Stata software package version 13.0 for statistical analysis.

Results

Patients

During the study period, 210 kidney transplants in Barcelona and 478 in Oslo accomplishing inclusion criteria were performed. The flow chart of included patients is shown in figure 1.

Demographic and transplant-related variables in both cohorts are summarized in table 1. Donors and recipients were older, the proportion of living renal transplants was lower and prevalence of delayed graft function was higher in the Barcelona cohort. The prevalence of acute rejection at the time of both biopsies was not different between centers. Serum creatinine was higher in the Barcelona cohort at the time of

10

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

both biopsies. Donor specific antibodies (DSA) were negative in the Barcelona cohort at the time of both biopsies. In the Oslo cohort, 5 patients displayed de novo DSA at the time of early biopsy (1.9%) and 17 at the time of late biopsy (7.2%). According to the immunosuppressive protocol at each center, TAC-C₀ levels were higher in Barcelona while daily MMF dose was higher in Oslo at the time of both biopsies. Prednisone dose was similar between cohorts. Between the early and late biopsies MMF dose was not modified in the Barcelona cohort and significantly reduced in the Oslo cohort (1.5 ± 0.2 vs. 1.3 ± 0.3 g/day; $p < 0.001$). In the Barcelona cohort there were only 4 patients (6.1%) in whom MMF dose between biopsies was reduced ≥ 500 mg/day due to increasing polyoma BK viruria (n=1), gastrointestinal symptoms (n=2) and haematologic toxicity (n=1). In Oslo there were 57 patients (24.1%) in whom MMF dose between biopsies was reduced ≥ 500 mg/day due to trough mycophenolic acid plasma (MPA) levels ≥ 3.5 $\mu\text{g/mL}$ (n=21), polyoma virus replication (n=12), gastrointestinal symptoms (n=15), haematologic toxicity (n=8) and a wart on scalp (n=1).

Biopsies

There were significant differences in the histological findings in early and late biopsies between study cohorts (table 2). The degree of tubulitis (t-score) was higher in the Oslo cohort in early biopsies, while the degree of interstitial inflammation (i-score) was similar. The prevalence of subclinical tubulo-interstitial rejection (i-score ≥ 1 and t-score ≥ 1) was not different in the early (11.9% in Barcelona vs. 18.3% in Oslo, p-value = 0.1660); and late biopsies (9.1% in Barcelona vs. 15.2% in Oslo, p-value = 0.2332) between cohorts. Despite the severity of interstitial fibrosis (ci-score) being higher in the early and late biopsies from the Barcelona cohort, the proportion of biopsies with IF/TA (ci+ct score ≥ 2) was not different in early (50.5% in the Barcelona cohort vs. 53.4% in the Oslo cohort, p-value=0.6485) and late biopsies (65.1% in the Barcelona cohort and 56.5% in the Oslo cohort, p-value=0.2587).

Additionally, the presence of intimal arteritis was very low in both cohorts, but it was present in 2.7% (7 out of 262) early biopsies from the Oslo cohort and it was not observed in the Barcelona cohort (p-value = 0.1106). In late biopsies intimal arteritis was not observed in any cohort. Similarly, the presence of glomerulitis and peritubular capillaritis was low in both cohorts but the presence of microcirculation inflammation (g-score plus ptc-score ≥ 2) was higher in the early biopsies from the Barcelona cohort

11

(3.7% vs. 0.4% in early biopsies, p-value = 0.0276) but not in late biopsies (6.1% vs. 2.5%, p-value = 0.2329). Staining for C4d was positive in 1 early biopsy from both cohorts (p-value=0.5018) and it was negative in all late biopsies from Barcelona and positive in 5 late biopsies from Oslo (p-value=0.5892).

Maintenance immunosuppression and tubulo-interstitial inflammation

Barcelona cohort

There was an association between the severity of tubulo-interstitial inflammation and TAC-C₀ levels at the time of early (p=0.0083) and late biopsies (p=0.0483) while there was no association with MMF daily dose (table 3). Since the number of cases in the category i+t ≥ 2 were too low to perform a multivariate analysis (13 in early biopsies and 6 in late biopsies) and TAC-C₀ levels were similar in patients with i+t=1 and i+t ≥ 2, biopsies were categorized as i+t=0 and i+t ≥ 1. TAC-C₀ was the only independent predictor of i+t ≥ 1 in the early (odds ratio [OR]: 0.75 and 95% confidence interval [CI]: 0.61-0.92; p-value = 0.006) (table 4A) and late biopsies (OR: 0.69 and 95% CI: 0.50-0.95; p-value = 0.023) (table 5A).

Oslo cohort

Patients with an early biopsy displaying i+t score ≥ 2 received lower MMF dose than patients with i+t=0. Similarly, at the time of late biopsy TAC-C₀ was significantly lower in patients with i+t ≥ 2 than in patients with i+t=0 (table 3). Since MMF and TAC-C₀ levels were similar in patients with i+t=0 and i+t=1, patients were classified into two groups as i+t ≤ 1 and i+t ≥ 2. Logistic regression analysis showed that i+t ≥ 2 in the early biopsy was associated with MMF dose (OR: 0.90 and 95% CI: 0.83-0.98; p-value=0.0101) (table 4B) while in late biopsies it was associated with TAC-C₀ (OR: 0.77 and 95% CI: 0.61-0.97; p-value=0.0286) after adjusting for confounding variables (table 5B).

Maintenance immunosuppression and tubulo-interstitial inflammation in scarred areas

This analysis was only performed in the Barcelona cohort since scoring for inflammation in scarred areas was not evaluated in the Oslo cohort. There was no

12

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

association between TAC-C₀ or MMF and i-IFTA+t-IFTA in early or late biopsies (table 6). There was a correlation between the degree of tubulo-interstitial inflammation in scarred and non scarred areas in early ($\rho=0.26$, $p=0.0077$) and late ($\rho=0.38$, $p=0.0004$) biopsies. Between early and late biopsies the degree of i-IFTA+t-IFTA and ci+ct significantly increased while i+t remained stable.

Maintenance immunosuppression and IF/TA

Barcelona cohort

In early and late biopsies, IF/TA (ci+ct score ≥ 2) was observed in 55 out of 109 biopsies (50.5%) and 43 out of 66 cases (65.1%), respectively. There was no association between TAC-C₀ or MMF daily dose and IF/TA in the early or late biopsies (table 7A). The presence of IF/TA in the late biopsy was associated with donor age, donor gender, recipient age, i+t score and ci+ct score in the early biopsy (table 7A). Multivariate logistic regression analysis showed that female donors (OR: 4.42, 95% CI: 1.01-19.3; $p=0.0480$), i+t in the early biopsy (OR: 5.03, 95% CI: 0.89-29.5; $p=0.0740$) and ci+ct in the early biopsy (OR: 4.01; 95% CI: 1.77-9.10; $p<0.001$) were associated with IF/TA at one year.

Oslo cohort

In early and late biopsies, IF/TA (ci+ct score ≥ 2) was observed in 140 out of 262 biopsies (53.4%) and 134 out of 237 biopsies (56.5%), respectively. In the univariate analysis, lower TAC-C₀ level at the time of the early biopsy was associated with more severe ci+ct in the late biopsy (table 7B). The presence of IF/TA in the late biopsy was also associated with donor age, donor type, ci+ct score in the early biopsy and i+t in the late biopsy (table 7B). Multivariate logistic regression analysis showed that donor age (OR: 1.05, 95% CI: 1.02-1.08; $p<0.001$), deceased donors (OR: 4.20, 95% CI: 1.00-3.63; $p=0.0403$), ci+ct in the early biopsy (OR: 1.92, 95% CI: 1.36-2.71; $p<0.001$) and i+t in the late biopsy (OR: 2.27, 95% CI: 1.42-3.62; $p<0.001$) were independently associated with IF/TA at one year. In this analysis, TAC-C₀ levels at the time of early biopsy were not included into the model (OR=0.91, 95% CI: 0.78-1.06; $p=0.2206$).

Discussion

13

1
2
3 In the present study, lower TAC-C₀ levels at the time of the early and late
4 biopsies were associated with the severity of tubulo-interstitial inflammation in the
5 Barcelona cohort that received full TAC and reduced MMF dose. In the Oslo cohort,
6 treated with reduced TAC and full MMF dose, the severity of tubulo-interstitial
7 inflammation was associated with lower MMF dose in the early biopsy and with lower
8 TAC-C₀ levels in the late biopsy. Of note, MMF dose was significantly reduced in the
9 Oslo cohort from the early to the late biopsy.
10
11

12
13
14 Until now, there is scarce information on the relationship between TAC and/or
15 MMF regimen and subclinical tubulo-interstitial inflammation observed in surveillance
16 biopsies. In a study comparing a historical cohort exposed to high TAC levels (target
17 TAC-C₀ 12-15 ng/mL during the first month, 10-12 ng/mL from months one to four and
18 8-10 ng/mL between months four and 12) with a more recent cohort exposed to lower
19 TAC levels (target TAC-C₀ 10-12 ng/mL during the first month, 8-10 ng/mL from
20 months two to four, and 6-8 ng/mL thereafter), lower TAC exposure was associated
21 with a reduction in polyoma virus associated nephropathy but not with subclinical
22 inflammation. Importantly, in both cohorts patients were treated with MMF at 1.5 g per
23 day¹⁹. Another study evaluating the relationship between TAC exposure and subclinical
24 histological findings at 3 and 12 month in patients treated with high TAC exposure
25 (TAC-C₀ target of 12-15 ng/mL during the first 3 months after transplantation), also
26 failed to show any association between TAC exposure and subclinical tubulo-interstitial
27 inflammation. However, an association between lower TAC exposure and increased
28 progression of tubulo-interstitial chronic damage was observed²⁰. In the present study,
29 we observed an association between TAC-C₀ levels and subclinical tubulo-interstitial
30 inflammation in the early and late biopsies from the Barcelona cohort that was treated
31 with full TAC and reduced MMF. In the Oslo cohort, treated with reduced TAC and full
32 MMF, tubulo-interstitial inflammation in the early biopsy was associated with MMF dose
33 but not TAC-C₀. However, at the time of late biopsy MMF dose was reduced for clinical
34 indications and tubulo-interstitial inflammation was associated with TAC-C₀ as in the
35 Barcelona cohort. We interpret that tubulo-interstitial inflammation depends on TAC-C₀,
36 in patients receiving an MMF dose lower than 1.5 g/day. These results are in
37 agreement with a large epidemiological study showing that TAC-C₀ levels below 5
38 ng/mL at one year are associated with decreased renal allograft survival. This
39 association was significant in patients receiving a MMF dose ≤ 1.5 g/day while it was
40 not observed in patients receiving a MMF dose > 1.5 g/day²¹. Recently, in a
41 prospective, open-label, randomized trial conducted in low immunological risk steroid-
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

free kidney transplants receiving MMF at approximately 1.2 g/day, it has been shown that TAC-C₀ < 7 µg/L during the first year post-transplantation is associated with clinical and subclinical rejection²². Altogether, these studies suggest that patients treated with low TAC and reduced MMF dose are at risk of underimmunosuppression since it has been shown that subclinical tubulo-interstitial inflammation constitutes a risk factor for the progression of tubulo-interstitial fibrosis, the appearance of *de novo* DSA and late graft failure^{8 16 22-23}

Tubulitis (t-score) was higher in the early and late biopsies from the Oslo cohort. Histological evaluation was done by local pathologists and this difference may be the result of interobserver variability²⁴⁻²⁵. This interpretation is reinforced by the observation that other lesions such as microcirculation inflammation or endothelialitis were different between cohorts despite similar rejection rates. The different scoring of tubulitis between centres explains why the i+t threshold employed to classify biopsies according to the presence or absence of tubulo-interstitial inflammation was different between cohorts.

In the Barcelona cohort interstitial inflammation and tubulitis were also evaluated in scarred areas. We did not observe any association between TAC or MMF exposure and inflammation in scarred tissue. This observation raises the question whether inflammation in scarred areas might be less responsive to immunosuppressive treatment. Unfortunately, this observation could not be tested in the Oslo cohort.

In both cohorts, IFTA in the late biopsy was mainly associated with donor characteristics and IF/TA degree in the early biopsy. In the multivariate analysis, TAC-C₀ and MMF dose were not associated with IF/TA in the early or late biopsies in any cohort. In the Barcelona cohort tubulo-interstitial inflammation in the early biopsy was associated with IF/TA at one year, and this association was on the verge of significance in the multivariate analysis. However, in the Oslo cohort, early inflammation was not associated with IF/TA at one year. This discrepancy may be related to the different timing of early biopsies between centres. In a study of early surveillance biopsies done at 6 weeks, as in the Oslo cohort, the inflammatory molecular phenotype mostly reflected the injury repair-response to implantation stress²⁶. On the contrary, in a study of 6 months surveillance biopsies, as in the Barcelona cohort, interstitial inflammation correlated with enhanced donor specific memory T cell reactivity²⁷. These studies suggest that in very early biopsies, tubulo-interstitial inflammation partly reflects the injury repair process, while tubulo-interstitial

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

inflammation in biopsies done later also reflects the donor specific alloimmune response.

The appearance of de novo DSA one year after transplantation was higher in the Oslo than in the Barcelona cohort (7.2% vs. 0%). This result is in agreement with a recent prospective, randomized study showing that patients receiving a steroid-free regimen randomized to a target TAC-C₀ < 7µg/L developed more frequently de novo DSA than patients randomized to a target TAC-C₀ > 7µg/L (6.9% vs. 0%)²². However, our results should be interpreted with caution since the methodology to determine anti-HLA antibodies was different between centers. We understand that this finding deserves further evaluation in new prospective, randomized trials in patients receiving a maintenance immunosuppression containing steroids.

Our study was focused in low immunological risk patients with a well functioning graft and, accordingly, they cannot be generalized to all kidney transplants. Studied cohorts were different in some transplant related variables, reflecting different transplant policies between centers. Furthermore, TAC and MMF dosage was also different between centers. However, the association between immunosuppressive treatment and subclinical tubulo-interstitial inflammation in both cohorts supports that immunosuppressive regimen is a major determinant of subclinical inflammation. The present study has other limitations. We failed to show a significant association between early inflammation and late IF/TA as it has been previously described in other studies^{16, 20, 28}. This might reflect insufficient statistical power, especially, if we take into consideration that subclinical tubulo-interstitial inflammation was rather low as it has been already described in TAC treated patients in comparison to other immunosuppressive schedules^{6, 23}. Moreover, the progression of tubulo-interstitial chronic damage between biopsies was moderate in both cohorts as it has been described in serial biopsies obtained in TAC treated patients²⁹. The lack of centralized biopsy reading is a potential source of bias. However, systematic bias in the evaluation of tubulitis at any of both centres has been dealt by using different thresholds to define the presence or absence of inflammation. Additionally, in none of the participating centres through serum mycophenolic acid levels at the time of biopsy were routinely obtained and this parameter may have contributed to better characterize the relationship between immunosuppression and subclinical inflammation. Finally, we were not able to explore whether minimization of both drugs, this means, MMF dose ≤ 1g/day and TAC-C₀ levels < 5 ng/mL, is associated with a higher risk of subclinical inflammation since this schedule was not followed at any of both centers.

16

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

In summary, our data suggest that in low immunological risk renal transplants treated with TAC and MMF based regimens, TAC-C₀ levels are associated with subclinical inflammation in patients receiving reduced MMF.

Acknowledgements. We thank Dr. Jaume Martorell and Dr. Eduard Palou from the Catalunya Histocompatibility Lab for anti-HLA antibodies determination and Dr. Jaume Vima from the Hospital Vall d'Hebron Biochemistry Lab for tacrolimus trough levels determinations.

References

1. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994;57:208-11.
2. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349:2326-33.
3. Rush D, Nickerson P, Gough J, et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2129-34.
4. Rush D, Arlen D, Boucher A, et al. Lack of benefit of early protocol biopsies in renal transplant patients receiving TAC and MMF: a randomized study. *Am J Transplant* 2007;7:2538-45.
5. Rowshani AT, Scholten EM, Bemelman F, et al. No difference in degree of interstitial Sirius red-stained area in serial biopsies from area under concentration-over-time curves-guided cyclosporine versus tacrolimus-treated renal transplant recipients at one year. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:305-12.
6. Moreso F, Seron D, Carrera M, et al. Baseline immunosuppression is associated with histological findings in early protocol biopsies. *Transplantation* 2004;78:1064-8.
7. Gloor JM, Cohen AJ, Lager DJ, et al. Subclinical rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Transplantation* 2002;73:1965-8.
8. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* 2012;12:1157-67.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

9. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007;357:2562-75.
10. Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, et al. Long-term changes in mycophenolic acid exposure in combination with tacrolimus and corticosteroids are dose dependent and not reflected by trough plasma concentration: a prospective study in 100 de novo renal allograft recipients. *J Clin Pharmacol* 2003;43:866-80.
11. Torres-Rodríguez IB, Castella-Fierro E, Serres-Creixans X, et al. Safety and efficacy of outpatient biopsy in renal transplantation. *Nefrología* 2014;34:749-55.
12. Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014;14:272-83.
13. Mannon RB, Matas AJ, Grande J, et al. Inflammation in areas of tubular atrophy in kidney allograft biopsies: a potent predictor of allograft failure. *Am J Transplant* 2010;10:2066-73.
14. Dorje C, Midtvedt K, Holdaas H, et al. Early versus late acute antibody-mediated rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2013;96:79-84.
15. Torres IB, Salcedo M, Moreso F, et al. Comparing transplant glomerulopathy in the absence of C4d deposition and donor-specific antibodies to chronic antibody-mediated rejection. *Clin Transplant* 2014;28:1148-54.
16. Garcia-Carro C, Dorje C, Asberg A, et al. Inflammation in Early Kidney Allograft Surveillance Biopsies With and Without Associated Tubulointerstitial Chronic Damage as a Predictor of Fibrosis Progression and Development of De Novo Donor Specific Antibodies. *Transplantation* 2016.
17. Yau WP, Vathsala A, Lou HX, Chan E. Is a standard fixed dose of mycophenolate mofetil ideal for all patients?. *Nephrol Dial Transplant* 2007;12: 3638-45.
18. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, et al. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int* 2010;77:299-311.
19. Cosio FG, Amer H, Grande JP, Larson TS, Stegall MD, Griffin MD. Comparison of low versus high tacrolimus levels in kidney transplantation: assessment of efficacy by protocol biopsies. *Transplantation* 2007;83:411-6.
20. Naesens M, Lerut E, Damme BV, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Tacrolimus exposure and evolution of renal allograft histology in the first year after transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:2114-23.
21. <http://www.ctstransplant.org/public/newsletters/2014/png/2014-1.html>
22. Gatault P, Kamar N, Büchler M, et al. "Reduction of extended-release tacrolimus dose in low immunological risk kidney transplant recipients increases risk of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

rejection and appearance of DSA - a randomized study". *Am J Transplant* (November 2016). <doi: 10.1111/ajt.14109>.

23 Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2006;6:2006-12.

24. Furness PN, Taub N. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: report of the CERTPAP Project. *Kidney Int* 2001;60:1998-2012.

25. Gough J, Rush D, Jeffery J, et al. Reproducibility of the Banff schema in reporting protocol biopsies of stable renal allografts. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1081-4.

26. Mengel M, Chang J, Kayser D, et al. The molecular phenotype of 6-week protocol biopsies from human renal allografts: reflections of prior injury but not future course. *Am J Transplant* 2011;11:708-18.

27. Crespo E, Roedder S, Sigdel T, et al. Molecular and Functional Noninvasive Immune Monitoring in the ESCAPE Study for Prediction of Subclinical Renal Allograft Rejection. *Transplantation* 2016.

28. Heilman RL, Devarapalli Y, Chakkera HA, et al. Impact of subclinical inflammation on the development of interstitial fibrosis and tubular atrophy in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2010;10:563-70.

29. Stegall MD, Park WD, Larson TS, et al. The histology of solitary renal allografts at 1 and 5 years after transplantation. *Am J Transplant* 2011;11:698-707.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Legend for figure

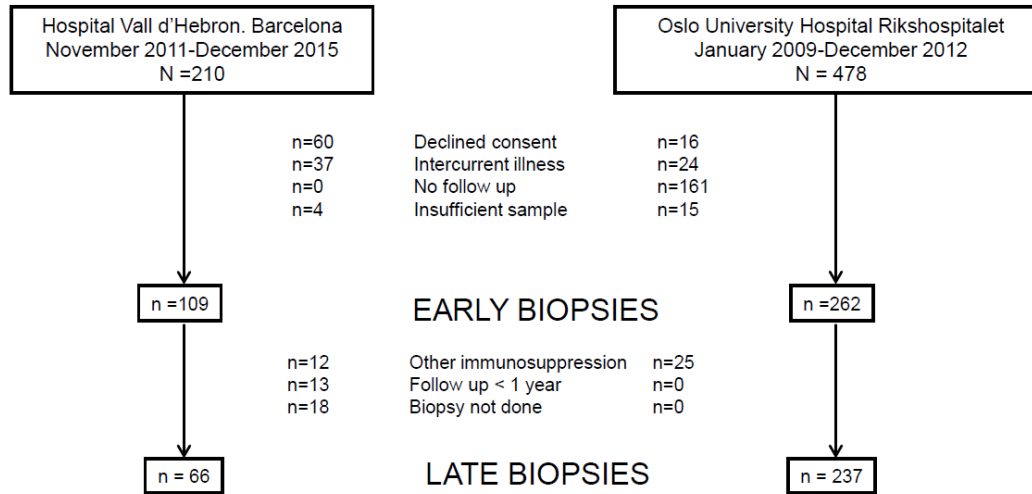
Figure 1. Flow chart of renal transplants performed in both cohorts of patients (Barcelona and Oslo) and the number of early and late surveillance biopsies obtained. DSA; HLA donor specific antibodies; PRA, panel reactive antibodies.

For Peer Review Only

Page 41 of 52
 Figure 1

Transplant International

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42



Transplant International

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Variable	Barcelona cohort	Oslo cohort	p-value
N	109	262	
Donor age (years)	54 ± 15	47 ± 14	<0.001
Donor sex (m / f)	56 / 53	139 / 123	0.8197
Donor type (deceased/living)	95 / 14	158 / 104	<0.001
Patient age (years)	55 ± 13	46 ± 14	<0.001
Patient sex (m / f)	86 / 23	177 / 85	0.0328
First Tx/ Re-Tx	102 / 7	231 / 31	0.1350
HLA-DR mismatches	1.06 ± 0.64	0.71 ± 0.60	<0.001
DGF (no/yes)	91 / 18	249 / 13	<0.001
AR before early Bx (no / yes)	101 / 8	235 / 27	0.3232
Time of early biopsy (months)	4.3 ± 1.5	1.5 ± 0.5	<0.001
SCr at early Bx (mg/dL)	1.39 ± 0.31	1.22 ± 0.26	<0.001
TAC-C ₀ at early Bx (ng/mL)	9.6 ± 2.5	6.9 ± 2.0	<0.001
MMF dose at early Bx (g)	0.9 ± 0.2	1.5 ± 0.2	<0.001
MMF dose at early Bx (mg/kg)	13 ± 3	21 ± 5	<0.001
DSA at early Bx	0	5	0.3272
N	66	237	
Time of late biopsy (months)	17.3 ± 1.5	12.0 ± 0.5	<0.001
SCr at late Bx (mg/dL)	1.31 ± 0.32	1.16 ± 0.28	<0.001
TAC-C ₀ at late Bx (ng/mL)	8.5 ± 2.2	6.3 ± 2.0	<0.001
MMF dose at late Bx (g)	0.9 ± 0.2	1.3 ± 0.3	<0.001
MMF dose at late Bx (mg/kg)	13 ± 3	18 ± 4	<0.001
Prednisone dose (mg/day)	5.4 ± 1.8	5.3 ± 1.6	0.6626
AR between early and late Bx	0	12	0.0756
DSA at late Bx	0	17	0.0289

Table 1. Demographic and transplant-related variables from the Barcelona and Oslo cohorts. Tx, transplantation; Bx, biopsy; DGF, delayed graft function; AR, acute rejection; SCr, serum creatinine; TAC-C₀, tacrolimus trough levels; MMF, daily MMF dose; DSA, HLA donor-specific antibodies.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Variable	Barcelona cohort	Oslo cohort	p-value
Scores early biopsies			
N	109	262	
Glomerular sections	12 ± 7	16 ± 7	<0.001
Glomerular sclerosis (%)	8.6 ± 10.4	5.1 ± 7.6	0.0004
g-score	0.08 ± 0.28	0.01 ± 0.09	0.0003
i-score	0.31 ± 0.54	0.29 ± 0.66	0.7798
t-score	0.21 ± 0.43	0.38 ± 0.70	0.0190
v-score	0	0.04 ± 0.22	0.0586
ah-score	0.42 ± 0.66	0.46 ± 0.68	0.6030
cg-score	0.01 ± 0.09	0	0.0724
ci-score	0.72 ± 0.73	0.58 ± 0.55	0.0420
ct-score	0.80 ± 0.77	0.73 ± 0.52	0.3099
cv-score	0.61 ± 0.78	0.75 ± 1.07	0.2173
mm-score	0.02 ± 0.13	0.02 ± 0.16	1.000
ptc-score	0.11 ± 0.31	0.02 ± 0.17	0.0004
Scores late biopsies			
N	66	237	
Glomerular sections	13 ± 8	14 ± 7	0.3210
Glomerular sclerosis (%)	8.0 ± 8.9	4.1 ± 7.2	0.0003
g-score	0.14 ± 0.39	0.05 ± 0.29	0.0405
i-score	0.18 ± 0.42	0.22 ± 0.57	0.5957
t-score	0.23 ± 0.42	0.35 ± 0.67	0.1685
v-score	0	0	0.999
ah-score	0.68 ± 0.75	0.64 ± 0.71	0.8310
cg-score	0.02 ± 0.12	0.01 ± 0.13	0.5747
ci-score	0.97 ± 0.84	0.66 ± 0.65	0.0015

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ct-score	1.05 ± 0.69	0.84 ± 0.63	0.0197
cv-score	0.70 ± 0.91	0.59 ± 0.95	0.4019
mm-score	0.06 ± 0.39	0.04 ± 0.27	0.6323
ptc-score	0.15 ± 0.40	0.02 ± 0.17	0.0001

Table 2. Number of glomeruli, percentage of global glomerular sclerosis and acute and chronic Banff scores in early and late surveillance biopsies from the Barcelona and Oslo cohorts. g-score, glomerulitis; i-score, interstitial inflammation; t-score, tubulitis; v-score, intimal arteritis; ah-score, arteriolar hyalinosis; cg-score, transplant glomerulopathy; ci-score, interstitial fibrosis; ct-score, tubular atrophy; cv-score, vascular intimal thickening; mm-score, mesangial matrix expansion; ptc-score, peritubular capillaritis.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Barcelona cohort				
Early biopsy	i + t = 0 (n= 69)	i + t =1 (n=27)	i + t ≥ 2 (n=13)	p-value
TAC-C ₀ (ng/mL)	10.1 ± 2.5	8.6 ± 2.0 ^a	8.6 ± 2.7	0.0083
MMF (mg/kg)	13 ± 3	12 ± 3	14 ± 4	0.4523
Late biopsy	i + t = 0 (n= 46)	i + t =1 (n=14)	i + t ≥ 2 (n=6)	p-value
TAC-C ₀ (ng/mL)	9.0 ± 2.2	7.8 ± 1.9 ^a	7.1 ± 2.3	0.0483
MMF (mg/kg)	13 ± 3	13 ± 4	14 ± 2	0.7640

Oslo cohort				
Early biopsy	i + t = 0 (n= 184)	i + t =1 (n=30)	i + t ≥ 2 (n=48)	p-value
TAC-C ₀ (ng/mL)	6.8 ± 1.7	6.8 ± 2.2	7.0 ± 2.5	0.7987
MMF (mg/kg)	21 ± 5	21 ± 6	19 ± 4 ^a	0.0452
Late biopsy	i + t = 0 (n= 171)	i + t =1 (n=30)	i + t ≥ 2 (n=36)	p-value
TAC-C ₀ (ng/mL)	6.5 ± 1.8	6.5 ± 3.2	5.7 ± 1.5 ^a	0.0957
MMF (mg/kg)	18 ± 4	19 ± 5	18 ± 6	0.6988

Table 3. Relationship between subclinical tubulo-interstitial inflammation (i-score plus t-score) and tacrolimus through levels and mycophenolate mofetil dose at the time of early and late biopsy in both cohorts of patients. TAC-C₀, tacrolimus through levels; MMF, mycophenolate mofetil daily dose. ^ap<0.05 vs. i+t=0 group by Scheffé test.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Variable	Univariate		Multivariate	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
Donor age	1.02 (0.99-1.04)	0.208		
Recipient age	1.02 (0.99-1.05)	0.152	1.01 (0.98-1.05)	0.426
HLA-DR mm	1.54 (0.83-2.89)	0.172	1.44 (0.75-2.75)	0.272
AR until early Bx	1.81 (0.43-7.65)	0.423		
TAC-C ₀ at early Bx	0.74 (0.61-0.90)	0.003	0.75 (0.61-0.92)	0.006
MMF dose at early Bx	1.00 (0.89-1.13)	0.971		

Table 4A. Logistic regression analysis of clinical variables associated with subclinical inflammation (i-score plus t-score ≥ 1) in the early surveillance biopsy in the Barcelona cohort. HLA-DR mm, number of HLA mismatches at DR loci; AR, acute rejection; TAC-C₀, tacrolimus trough levels; MMF, mycophenolate mofetil.

Variable	Univariate		Multivariate	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
Donor age	0.97 (0.95-0.99)	0.0151	0.98 (0.96-1.01)	0.1564
Recipient age	0.98 (0.96-1.00)	0.0792	0.98 (0.95-1.00)	0.0987
HLA-DR mm	1.87 (1.10-3.18)	0.0211	1.83 (1.02-3.27)	0.0425
AR before early Bx	1.66 (0.66-4.17)	0.2848		
TAC-C ₀ at early Bx	1.05 (0.90-1.22)	0.5076		
MMF dose at early Bx	0.91 (0.85-0.98)	0.0143	0.90 (0.83-0.98)	0.0101
DSA at early Bx	19.4 (2.11-177.5)	0.0087	18.5 (1.66-205.8)	0.0176

Table 4B. Logistic regression analysis of clinical variables associated with subclinical inflammation (i-score plus t-score ≥ 2) in the early surveillance biopsy in the Oslo cohort. HLA-DR mm, number of HLA mismatches at DR loci; AR, acute rejection; TAC-C₀, tacrolimus trough levels; MMF, mycophenolate mofetil.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Variable	Univariate		Multivariate	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
Donor age	0.99 (0.95-1.02)	0.463		
Recipient age	0.99 (0.96-1.03)	0.762		
HLA-DR mm	0.95 (0.44-2.08)	0.899		
AR until late Bx	0.40 (0.04-3.66)	0.417		
TAC-C ₀ at late Bx	0.69 (0.50-0.95)	0.023	0.69 (0.50-0.95)	0.023
MMF dose late Bx	1.05 (0.90-1.24)	0.520		

Table 5A. Logistic regression logistic analysis of clinical variables associated with subclinical inflammation (i-score plus t-score ≥ 1) in the late surveillance biopsy in the Barcelona cohort. HLA-DR mm, number of HLA mismatches at DR loci; AR, acute rejection; TAC-C₀, tacrolimus trough levels; MMF, mycophenolate mofetil.

Variable	Univariate		Multivariate	
	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
Donor age	1.03 (1.00-1.06)	0.0360	1.03 (1.00-1.07)	0.0324
Recipient age	1.01 (0.98-1.03)	0.6253		
HLA-DR mm	1.00 (0.55-1.82)	0.9938		
AR until late Bx	5.90 (1.33-14.9)	0.0152	4.32 (1.19-15.7)	0.0260
TAC-C ₀ at late Bx	0.77 (0.61-0.97)	0.0258	0.77 (0.61-0.97)	0.0286
MMF at late Bx	0.99 (0.91-1.09)	0.9421		
DSA at late Bx	2.79 (0.91-8.57)	0.0738	3.19 (0.94-10.8)	0.0622

Table 5B. Regression logistic regression analysis of clinical variables associated with subclinical inflammation (i-score plus t-score ≥ 2) in the late surveillance biopsy in the Oslo cohort. HLA-DR mm, number of HLA mismatches at DR loci; AR, acute rejection; TAC-C₀, tacrolimus trough levels; MMF, mycophenolate mofetil dose.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Early biopsy	Barcelona cohort			p-value
	i-IFTA + t-IFTA = 0 (n= 40)	i-IFTA + t-IFTA =1 (n=16)	i-IFTA + t-IFTA ≥ 2 (n=53)	
TAC-C ₀ (ng/mL)	10.0 ± 3.1	9.0 ± 1.9	9.4 ± 2.3	0.3877
MMF (mg/kg)	13 ± 4	13 ± 3	13 ± 3	0.9732
Late biopsy	Barcelona cohort			p-value
	i-IFTA + t-IFTA = 0 (n=19)	i-IFTA + t-IFTA =1 (n=12)	i-IFTA + t-IFTA ≥ 2 (n=35)	
TAC-C ₀ (ng/mL)	9.0 ± 1.9	9.4 ± 2.1	8.0 ± 2.3	0.1119
MMF (mg/kg)	13 ± 3	13 ± 3	13 ± 4	0.6750

Table 6. Relationship between subclinical tubulo-interstitial inflammation in scarred areas (i-IFTA score plus t-IFTA score) and tacrolimus through levels and mycophenolate mofetil dose at the time of early and late biopsy in the Barcelona cohort. TAC-C₀, tacrolimus through levels; MMF, mycophenolate mofetil daily dose.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Variable	ci+ct<2 (n=23)	ci+ct≥2 (n=43)	p-value
Donor age (years)	48 ± 16	56 ± 15	0.0378
Donor sex (m/f)	18/5	20/23	0.0020
LD/DD	4/19	7/36	0.5820
HLA-DR mm	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.7	0.6057
Patient age (years)	50 ± 13	56 ± 13	0.0568
Patient sex (m/f)	20/3	32/11	0.3460
AR before early Bx (n/y)	22/1	41/2	0.7240
TAC-C ₀ early Bx (ng/mL)	10.2 ± 2.0	9.4 ± 2.3	0.1581
MMF dose early Bx (mg/kg)	13 ± 4	13 ± 3	0.5613
i+t early Bx	0.13 ± 0.34	0.63 ± 0.85	0.0090
ci+ct early Bx	0.61 ± 0.89	1.95 ± 1.11	<0.001
AR between Bx (n/y)	23/0	43/0	n.a.
TAC-C ₀ late Bx (ng/mL)	9.1 ± 2.0	8.2 ± 2.2	0.1202
MMF dose late Bx (mg/kg)	13 ± 3	13 ± 4	0.5613
i+t late Bx	0.26 ± 0.45	0.49 ± 0.74	0.1813
ci+ct late Bx	0.52 ± 0.51	2.81 ± 1.10	n.a.

Table 7A. Clinical and histological variables in the Barcelona cohort classified according to ci+ct score in the late biopsy. LD, living donor; DD, deceased donor; HLA-DR mm, number of donor/recipient mismatches in locus DR; AR, acute rejection; Bx, biopsy; TAC-C₀, tacrolimus trough levels; MMF, mycophenolate mofetil daily dose.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Variable	ci+ct<2 (n=103)	ci+ct≥2 (n=134)	p-value
Donor age (years)	42 ± 13	51 ± 12	<0.001
Donor sex (m/f)	48/55	75/59	0.1328
LD/DD	50/53	44/90	0.0170
HLA-DR mm	0.7 ± 0.6	0.7 ± 0.6	0.7800
Patient age (years)	45 ± 14	47 ± 14	0.2309
Patient sex (m/f)	73/30	87/47	0.3083
AR before early Bx (n/y)	95/8	116/18	0.1591
TAC-C ₀ early Bx (ng/mL)	7.3 ± 2.4	6.5 ± 1.6	0.0092
MMF dose early Bx (mg/kg)	20 ± 4	21 ± 5	0.1024
i+t early Bx	0.58 ± 1.38	0.81 ± 1.29	0.1709
ci+ct early Bx	0.91 ± 0.89	1.61 ± 0.95	<0.001
AR between Bx (n/y)	100/3	125/9	0.1802
TAC-C ₀ late Bx (ng/mL)	6.3 ± 1.6	6.3 ± 2.3	0.9782
MMF dose late Bx (mg/kg)	18 ± 4	18 ± 5	0.5645
i+t late Bx	0.17 ± 0.67	0.88 ± 1.35	<0.001
ci+ct late Bx	0.43 ± 0.50	2.34 ± 0.85	n.a.

Table 7B. Clinical and histological variables in the Oslo cohort classified according to ci+ct score in the late biopsy. LD, living donor; DD, deceased donor; HLA-DR mm, number of donor/recipient mismatches in locus DR; AR, acute rejection; Bx, biopsy; TAC-C₀, tacrolimus trough levels; MMF, mycophenolate mofetil daily dose.

9.2 Torres IB, Moreso F, Sarró E, Meseguer A, Serón D. The Interplay between Inflammation and Fibrosis in Kidney Transplantation. Biomed Res Int 2014. 2014:750602. doi: 10.1155/2014/750602. Impact Factor: 1.579

Resumen. Artículo de revisión sobre la relación ente la inflamación subclínica temprana, los mecanismos relacionados con su aparición y los fenotipos que muestra el injerto renal posteriormente: fibrosis intersticial aislada, fibrosis con inflamación y rechazo crónico humoral.

Review Article

The Interplay between Inflammation and Fibrosis in Kidney Transplantation

Irina B. Torres,¹ Francesc Moreso,¹ Eduard Sarró,² Anna Meseguer,² and Daniel Serón¹

¹Nephrology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Autonomous University of Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

²Renal Physiopathology Department, CIBBIM-Nanomedicine, Vall d'Hebron Research Institute, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to Daniel Serón; dseron@vhebron.net

Received 28 March 2014; Accepted 11 May 2014

Academic Editor: Ignacio Revuelta

Copyright © 2014 Irina B. Torres et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Serial surveillance renal allograft biopsies have shown that early subclinical inflammation constitutes a risk factor for the development of interstitial fibrosis. More recently, it has been observed that persistent inflammation is also associated with fibrosis progression and chronic humoral rejection, two histological conditions associated with poor allograft survival. Treatment of subclinical inflammation with steroid boluses prevents progression of fibrosis and preserves renal function in patients treated with a cyclosporine-based regimen. Subclinical inflammation has been reduced after the introduction of tacrolimus based regimens, and it has been shown that immunosuppressive schedules that are effective in preventing acute rejection and subclinical inflammation may prevent the progression of fibrosis and chronic humoral rejection. On the other hand, minimization protocols are associated with progression of fibrosis, and noncompliance with the immunosuppressive regime constitutes a major risk factor for chronic humoral rejection. Thus, adequate immunosuppressive treatment, avoiding minimization strategies and reinforcing educational actions to prevent noncompliance, is at present an effective approach to combat the progression of fibrosis.

1. Introduction

Progressive renal fibrosis, regardless of the underlying aetiology, is the final common manifestation of a wide variety of chronic kidney diseases (CKD) that lead to end-stage renal disease. Fibrosis is a process of normal wound healing and repair that is activated in response to injury to maintain the original tissue architecture and functional integrity. However, prolonged chronic injurious stimuli may cause deregulation of normal processes and result in an excess deposition of extracellular matrix (ECM) [1]. Continuous deposition of ECM results in fibrous scars and distorts the architecture of kidney tissues, leading to the collapse of renal parenchyma and the loss of kidney function [2]. Chronic injury involves a complex multistage inflammatory process with inflammatory cell infiltration, mesangial and fibroblast activation, tubular-epithelial to mesenchymal transition, endothelial to mesenchymal transition, cell apoptosis, and extracellular matrix expansion that is orchestrated by a network of

cytokines/chemokines, growth factors, adhesion molecules, and signalling processes [3, 4]. These events include several phases summarized in Figure 1: (i) tissue injury and activation, (ii) recruitment of inflammatory cells, (iii) release of fibrogenic cytokines, and (iv) activation of collagen-producing cells. However, it should be stressed that renal fibrogenesis is a dynamic process in which many of these events occur simultaneously, often in a mutually stimulating fashion [2]. The injury phase, which can be induced by a variety of noxious stimuli including immunological, metabolic, hemodynamic, ischemic, and toxic assaults, results in the production and release of proinflammatory molecules caused by cytokine-mediated endocytosis/phagocytosis [5–8]. Neutrophils are the first cells recruited, as they uptake cell debris and phagocytose apoptotic bodies facilitating the repair of the lost tissue components, resulting in a reconstitution of the original tissue architecture and function. This beneficial repairing process can be detrimental when proceeding in an uncontrolled manner, then leading to progressive fibrosis

with a loss of function [9]. Thus, controlling excessive inflammation would be of great potential therapeutic benefit for inhibiting progressive fibrosis of kidney.

2. Molecular Mechanisms Leading to Fibrosis Progression

The pathogenesis of inflammation is complex and multifactorial, involving the interaction of cytokines, chemokines, and adhesion molecules. The participation and interaction of infiltrated cells with different cell types in the kidney is required to promote renal fibrosis. Depending on the aetiology of renal injury, tubular, glomerular, or interstitial infiltrated inflammatory cells become activated and produce fibrogenic and inflammatory cytokines. Inflammatory infiltrates, including neutrophils, macrophages, and lymphocytes, are evident in experimental models of renal disease and human renal biopsy specimens [10]. Activation of peritubular capillary endothelial cells may facilitate the recruitment of interstitial mononuclear cells. Following neutrophils, macrophages infiltrate damaged tissues and phagocytose and secrete fibrogenic cytokines. Macrophages are a major source of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in fibrosing organs. T and B lymphocytes are also recruited to the site of injury and further facilitate secretion of fibrogenic cytokines [11]. At the same time, TGF- β 1 is a potent chemoattractant for cells of macrophage-monocytic lineage. In addition to TGF- β 1, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) are also involved in recruitment of inflammatory cells [12]. The gradients of chemoattractant cytokines released by damaged tubular cells provide a directional signal for guiding the infiltration of inflammatory monocytes/macrophages and T cells to the injured sites and are thought to play an important role in this inflammatory process.

Members of the TGF- β superfamily are the most extensively studied growth factors that have been linked to renal fibrosis [13]. Macrophages, tubular epithelial cells, and myofibroblasts are all capable of synthesizing TGF- β at different stages during the development of renal fibrotic lesions [14]. However, the observation that macrophage ablation markedly attenuates fibrosis in various conditions suggests that these cells are among the main producers of this growth factor [15, 16]. Macrophages are heterogeneous and can be classified by distinct phenotypic markers that correspond to different subsets with distinct functional capabilities, including important roles in tissue repair and remodelling [17].

Although different fibrogenic factors have been documented, including various cytokines and hormonal, metabolic, and hemodynamic factors, it is widely accepted that TGF- β and its downstream Smad signalling play an essential role. Upregulation of TGF- β is a universal finding in virtually every type of CKD, both in animal models and in humans. Despite the well documented role of TGF- β in renal fibrosis, long-term inhibition of TGF- β action, in an attempt to hamper the progression of renal fibrosis, does

not seem to be an optimal approach provided that TGF- β is also an anti-inflammatory cytokine. The profibrotic and anti-inflammatory properties of TGF- β pose a dilemma for the therapeutic application of TGF- β inhibition and this is one of the reasons that novel antifibrotic targets are under active investigation [18].

In renal fibrosis, the activation of the renin-angiotensin-aldosterone system and its main effector angiotensin II (AngII) stimulates vascular inflammation, upregulation of reactive oxygen species, cytokines, chemokines, and growth factors, and recruitment of infiltrating cells into the kidney [19, 20]. The relevance of AngII to renal fibrosis has immediate clinical relevance due to the availability of orally active inhibitory drugs. AngII has been shown to stimulate TGF- β production by various cells including renal tubular cells and fibroblasts and several studies have demonstrated that the use of either AngII receptor (AT1 and AT2) antagonists or angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors in experimental renal disease models reduces TGF- β production and attenuates renal interstitial fibrosis [21, 22].

In human kidney diseases, the activated renal renin-angiotensin system has been described. In diabetic nephropathy, elevated AngII generation did correlate with the presence of inflammatory cell infiltration, the activation of NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), and proinflammatory gene overexpression [23]. The inhibition of the NF- κ B pathway has also shown the prevention of inflammation in experimental renal damage. These observations emphasize the importance of treatments that block the AngII-induced inflammatory process in human renal diseases and provide a rationale to investigate further the involvement of the AT2/NF- κ B pathway in the inflammatory response in kidney diseases [20].

3. Molecular Mechanisms Leading to Fibrosis in Renal Transplantation

Inflammation has also been pinpointed as a hallmark for renal transplant functional decline. Inflammation, especially when it is associated with fibrosis in surveillance kidney biopsies, is a risk factor for long-term transplant failure. Park et al. [24] have shown that one-year surveillance biopsies with normal histology or fibrosis had stable renal function between 1 and 5 years, whereas those with both fibrosis and inflammation exhibited a decline in GFR and reduced graft survival. Immunohistochemistry confirmed increased interstitial T cells and macrophages/dendritic cells in the group with both fibrosis and inflammation, and there was increased expression of transcripts related to innate and cognate immunity. These authors demonstrated elevated expression of multiple innate and adaptive immune mediators consistent with tissue injury response, Th1-type T cell response, and suppression of counterregulatory pathways. Microarray analyses confirmed and extended this profile, revealing the overexpressed pathways and gene clusters in the interstitial fibrosis and inflammation group to be heavily enriched for immune activation and identifying the process as being closely linked with IFN- γ -induced, cytotoxic T

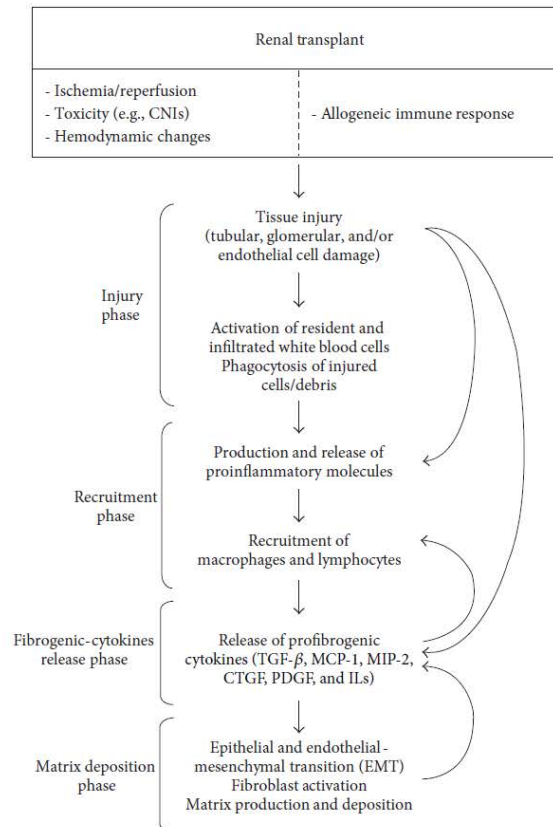


FIGURE 1: Renal transplant-induced fibrosis involves a complex multifactorial inflammatory process with the participation and interaction of infiltrated cells with different cell types in the kidney and is orchestrated by a network of cytokines/chemokines, growth factors, adhesion molecules, and signalling processes. These events include several phases in a dynamic process in which many of these events occur simultaneously, often in a mutually stimulating fashion.

lymphocyte-associated, and acute rejection signatures. Pathway analysis of microarray data for the interstitial fibrosis and inflammation group also provided evidence of active participation of a range of immunologic cell types, including T cells, B cells, monocyte/macrophages, dendritic cells, and natural killer cells. Results of this study indicate that early surveillance histology with or without targeted molecular analysis provides important prognostic information. It has been suggested that analysis of intragraft innate and adaptive immune pathways during early posttransplantation years may provide the basis for early interventions aimed at altering rejection-like inflammation improving long-term survival of kidney allografts [24–26].

4. Preexisting Kidney Fibrosis and Graft Outcome

Despite the fact that the use of new immunosuppressants has allowed reduction in the incidence of acute rejection and an improvement of short-term results in renal transplantation, long-term graft survival has been only marginally increased [27]. Among immune and nonimmune mechanisms influencing graft survival, donor related factors are one of the major determinants of graft outcome [28, 29].

The increased utilization of the so-called expanded criteria donors during the last years, that is, donors older than 60 years or donors older than 50 years with two of the following conditions, death due to stroke and history of hypertension and serum creatinine > 1.5 mg/dL, implies that a high proportion of kidneys already display interstitial fibrosis, tubular atrophy, vascular intimal thickening, and

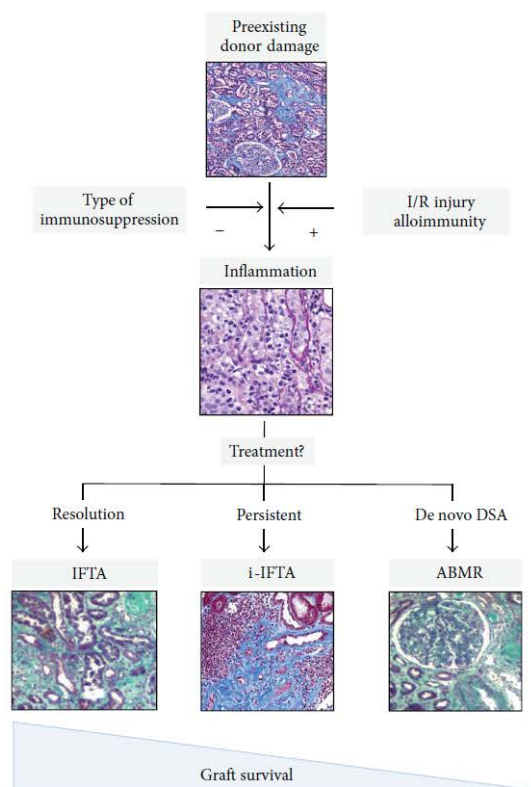


FIGURE 2: Progression of fibrosis after kidney transplantation. Fibrosis is already present in a proportion of grafts, especially in renal allograft obtained from expanded criteria donors. Ischemia/reperfusion (I/R) injury and alloimmune response trigger inflammation and its severity is modulated by immunosuppressive treatment. Subclinical inflammation can be ameliorated by treatment with steroid boluses or by increasing exposure to immunosuppressive drugs. Quiescent interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) may represent the healing of the inflammatory insult while inflammation in areas of fibrosis (i-IFTA) and antibody-mediated rejection (ABMR) due to the appearance of de novo donor specific antibodies (DSA) may represent an ongoing inflammatory response that is associated with decreased allograft survival.

glomerulosclerosis at the time of transplantation. The severity of these lesions is associated with delayed graft function, decreased glomerular filtration rate, and decreased allograft survival. Accordingly, different scores to evaluate the severity of preexisting damage have been proposed [30–32]. Although intra- and interobserver reproducibility of these measures is not ideal, the majority of studies have shown a close association between the severity of fibrosis and graft outcome [33, 34]. It has been proposed that the modest improvement on long-term allograft survival despite decreased incidence of acute rejection with actual immunosuppression is mainly explained by the increased use of kidneys already displaying fibrosis.

5. Ischemia/Reperfusion Injury and Kidney Fibrosis

Ischemia/reperfusion injury (IRI) is a key event in organ transplantation since restoration of blood flow to ischemic tissue exacerbates tissue damage by initiating a cascade of inflammatory events including release of proinflammatory cytokines and chemokines, recruitment of leukocytes, and activation of the complement system [35]. Different experimental and clinical studies have shown that transplant IRI may impact short- and long-term graft survival following kidney transplantation and is strongly associated with delayed graft function [36]. Acute kidney injury is associated with an extensive loss of the corticomedullary proximal tubular epithelial cells and with a reduction in the number of peritubular capillaries [37]. Moreover, delayed graft function increases the immunogenicity of the allograft and the risk of acute rejection episodes [36]. The initiation

of profibrotic pathways is also relevant as shown by the increased expression of TGF- β and activation of NF- κ B in allografts that developed chronic changes subsequent to the occurrence of acute tubular injury [38]. These phenomena, inherently present in the majority of the grafts, can be more pronounced in expanded criteria donors since these allografts have a limited capacity to repair parenchymal damage and could exhaust the ability of tubular epithelial cells to regenerate. Additionally, these processes could lead to accelerated senescence and aggravate the progression of interstitial fibrosis and tubular atrophy [39].

6. Fibrosis Progression in Surveillance Biopsies

Preexisting chronic donor damage can progress after transplantation due to the different immunologic and nonimmunologic insults to which the kidney is exposed. To evaluate the progression of fibrosis after transplantation different groups have performed surveillance biopsies at different time points after transplantation. From the initial reports, it became clear that chronic histological damage in the tubule-*interstitial*, vascular, and glomerular compartments rapidly progresses during the initial months after transplantation while renal function remains stable. In different studies it has been shown that the presence of interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) involved about 40% of transplants at 3–6 months [39, 40], 50% at 1 year [41], and 65% at 2 years [42]. The progression of IF/TA was associated with an increased incidence of acute rejection before performing the surveillance biopsy and with a lower immunosuppressive treatment. Furthermore, it has been consistently shown that the presence of IF/TA adjusted for renal function at the time of biopsy is closely associated with long-term graft survival. However, since IF/TA is a nonspecific lesion that can be related with different immune and nonimmune injuries to the graft, during the last years a big effort has been done to characterize causes of late graft failure. In these studies, it has been shown that specific disease entities may be identified in more than 90% of cases, antibody-mediated rejection and glomerular disease being the leading causes of late graft failure [43, 44]. Recently, to integrate this apparent discrepancy, it has been shown that early chronic histological damage was an independent risk factor for late graft loss, irrespective of whether a specific, progressive disease was diagnosed or not [45]. Thus, the burden of fibrosis modulates outcome in different renal allograft diseases.

7. Inflammation as a Risk Factor for Progression of Kidney Fibrosis

The largest study contributing to describing the natural history of the evolution of inflammation and chronic damage in stable grafts was conducted on 120 recipients receiving simultaneous kidney-pancreas transplantation in whom near 1.000 surveillance biopsies were done during 10 years of follow-up. Most severe inflammation was already observed during the first months after transplantation and tended to decrease

during the first year although the inflammation persists after the first year in a proportion of patients. At the same time, interstitial fibrosis rapidly progressed during the first months after transplant. Beyond one year, glomerulosclerosis and intimal thickening slowly progressed as well as the severity of IF/TA. The presence of severe chronic lesions was associated with declining renal function and graft failure [46]. It has been shown that early inflammation observed in surveillance biopsies is associated with the progression of IF/TA [47, 48] and with decreased renal allograft survival [49]. However, the classification of surveillance biopsies as (i) normal histology, (ii) fibrosis without inflammation, (iii) inflammation without fibrosis, and (iv) inflammation associated with fibrosis leads to the observation that only patients with inflammation associated with fibrosis showed a decreased renal allograft survival [24, 50]. Additionally, it has been shown that the presence of interstitial inflammation in areas of fibrosis (i-IFTA) in diagnostic biopsies is especially harmful for the graft [51]. Studies conducted on sequential biopsies have shown that acute cellular rejection, BK nephropathy, increasing number of HLA mismatches, retransplantation, and delayed graft function were risk factors for the presence of i-IFTA in one-year surveillance biopsies [48, 52]. More recently, it has been described that early inflammation after transplantation evaluated by means of surveillance biopsies is associated with an increased risk to develop *de novo* donor HLA specific antibodies and chronic antibody-mediated rejection [53–55]. In summary, early inflammation is associated with three different conditions, interstitial fibrosis, interstitial fibrosis associated with inflammation, and chronic allograft rejection. However, graft survival is shortened in patients with i-IF/TA and chronic humoral rejection in comparison to patients with quiescent fibrosis. In Figure 2, the relationship between events modulating early inflammation after transplant and late different histological phenotypes is shown.

8. Treatment of Subclinical Rejection to Slow Kidney Fibrosis Progression

Since subclinical inflammation is indistinguishable from inflammation observed in episodes of acute cellular rejection, it was tempting to propose that treatment of subclinical inflammation with steroid boluses may improve outcome after renal transplantation. The first to test this hypothesis was Rush et al. [56] in an elegant prospective randomized clinical trial in which patients were randomized to be biopsied at 1, 2, and 3 months and treated with steroid boluses in case they showed subclinical inflammation. The control group was not biopsied at these time points and, accordingly, not treated for subclinical inflammation. Fibrosis at 6 months was less severe in patients that were biopsied and treated for subclinical inflammation. This was the first study to show, as a proof of concept, that treatment of subclinical inflammation prevents progression of fibrosis. It is important to remark that patients enrolled in this study were treated with cyclosporine, azathioprine, and prednisone, a regimen associated with a

high prevalence of acute rejection and subclinical inflammation. In this study, over 50% of patients showed subclinical inflammation at the time of surveillance biopsy. A similar study was done more recently [57] in which patients were randomized to be biopsied at 1 and 4 months and treated with steroid boluses in case they presented subclinical inflammation. The control group was again not biopsied and accordingly not treated. Baseline immunosuppression consisted in a cyclosporine or tacrolimus based regimen. The prevalence of subclinical inflammation was 39% at 1 month and 26% at 4 months, a lower figure than in the previous study. Estimated glomerular filtration rate at 6 months and 1 year was better in patients that were biopsied and treated, suggesting that treatment of subclinical inflammation was associated with preservation of renal function.

Rush et al. published in 2007 the results of a multicentre trial in which patients treated with tacrolimus, mycophenolate, and prednisone were randomized, as in his previous study, to be biopsied at 1, 2, and 3 months and treated with steroid boluses in case they presented subclinical inflammation. The control group was again not biopsied and, accordingly, not treated. There were no differences between groups in the progression of fibrosis evaluated by means of a 6- and 24-month surveillance biopsy and the evolution of renal function was also not different between groups. Most remarkably, overall incidence of subclinical inflammation was less than 10% at 1, 2, and 3 months, suggesting that treatment with tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone may efficiently prevent early inflammation [58]. After this study the interest shifted from treatment to prevention of subclinical inflammation.

9. Prevention of Subclinical Inflammation to Avoid Kidney Fibrosis

The prevalence of subclinical inflammation in three-month surveillance biopsies is lower in tacrolimus than in cyclosporine treated patients [59–61]. Quantification of the severity of inflammatory infiltrates with monoclonal antibodies confirmed that patients receiving tacrolimus showed less severe glomerular and interstitial inflammation than patients treated with cyclosporine [62]. These data suggested that the type of immunosuppressive treatment modulates the severity of inflammation after transplantation. Since inflammation is associated with progression of fibrosis, the question whether prevention of early inflammation by treatment may delay the progression of fibrosis was raised.

In a prospective trial in which patients were randomized to receive 4 different immunosuppressive schedules: cyclosporine associated with mycophenolate mofetil, tacrolimus associated with mycophenolate mofetil, cyclosporine associated with sirolimus, and tacrolimus associated with sirolimus, it was observed that regimens combining a calcineurin inhibitor with sirolimus showed a lower prevalence of acute rejection during the first year, a lower prevalence of subclinical inflammation at 1-year protocol biopsy, and less severe fibrosis evaluated by means of a surveillance biopsy at 5 years, suggesting

that immunosuppressive schedules that are effective in preventing acute rejection and subclinical inflammation are also effective in preventing the progression of fibrosis [63]. At the time this paper was published, it was assumed that the combination of a calcineurin inhibitor and an inhibitor of the mammalian target of rapamycin (i-mTOR) was a nephrotoxic combination [64]. Thus, this study challenged the idea that avoidance of anticalcineurin treatments was the best strategy to prevent the progression of fibrosis [65]. In the Concept trial, patients receiving cyclosporine, mycophenolate mofetil, and prednisone were randomized to continue with the same schedule or to be switched from cyclosporine to sirolimus. At one year, the surveillance biopsy showed that the severity of fibrosis quantified by means of an image analysis technique was not different between groups [66], while the presence of subclinical inflammation was 45% in sirolimus and 15% in cyclosporine treated patients, suggesting that sirolimus is less effective in preventing inflammation than cyclosporine [67]. More recently, it has been shown that the early switch from cyclosporine to everolimus is associated with an increased risk of appearance of the novo HLA donor specific antibodies and chronic humoral rejection [68], reinforcing the notion that an i-mTOR based regimen may be less effective than a calcineurin inhibitor regimen to control the immune response after transplantation.

In the last two decades, the immunosuppressive schedule has changed from cyclosporine to tacrolimus based regimens. Thus, it is interesting to compare the prevalence of chronic lesions in surveillance biopsies obtained late after transplantation in these different periods, the cyclosporine and tacrolimus era. In 2003, in the paper published by Nankivell et al. [46], the prevalence of moderate or severe interstitial fibrosis at 5 years was 66% and in the Stegall et al. [69] paper published in 2011 it was 17%. Of note, hyaline changes were 90% in the first and 19% in the second study. Although such a comparison should be considered with caution, since patients characteristics between studies were different, it again suggests that the introduction of more powerful immunosuppressive schedules better controlling early inflammation may have changed the rate of progression of fibrosis after transplantation.

Further support for the role of immunosuppression in the prevention of early inflammation and progression of fibrosis comes from the observation that minimization of cyclosporine treatment was associated with progression of fibrosis when evaluated by means of 3- and 12-month surveillance biopsies [41]. Similarly, lower exposure to tacrolimus was also associated with accelerated progression of fibrosis evaluated again by means of surveillance biopsies done at 3 and 12 months. In this last study, low tacrolimus was also associated with higher prevalence of acute rejection, but high exposure to tacrolimus was not associated with lesions considered to represent anticalcineurin associated nephrotoxicity [70]. These results argue against minimization of immunosuppression, at least during the first months. Moreover, in the last years there is increasing evidence supporting a major role of patient's compliance in renal allograft survival [44, 71], and it has been also shown that patients enrolled in a special program aiming to improve

treatment compliance have a better outcome than patients followed in the standard way [72].

10. Conclusions

Taken together, these data point out that inflammation early after transplantation is a major determinant of the progression of fibrosis, appearance of HLA donor specific antibodies, and graft outcome. On the other hand, an adequate immunosuppressive treatment, avoiding minimization strategies and reinforcing educational actions to prevent noncompliance, is at present an effective approach to combat the progression of fibrosis.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

I.B. Torres was supported by a predoctoral grant from the Vall d'Hebron Research Institute (VHIR). This work was supported in part by grants from the Sociedad Española de Trasplantes (SET to F. Moreso), Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2011-2950 to A. Meseguer), the Fundación Senefro (SEN to A. Meseguer), Instituto de Salud Carlos III (PI10/2496 and PIE13/00027), and Red de Investigación Renal REDinREN (12/0021/0013). Meseguer's research group holds the Quality Mention from the Generalitat de Catalunya (2009 SGR).

References

- [1] Y. Liu, "Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics," *Kidney International*, vol. 69, no. 2, pp. 213–217, 2006.
- [2] A. A. Eddy, "Molecular basis of renal fibrosis," *Pediatric Nephrology*, vol. 15, no. 3-4, pp. 290–301, 2000.
- [3] T. Kisseleva and D. A. Brenner, "Mechanisms of fibrogenesis," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 233, no. 2, pp. 109–122, 2008.
- [4] U. Blank, M. Essig, L. Scanduzzi, M. Benhamou, and Y. Kanamaru, "Mast cells and inflammatory kidney disease," *Immunological Reviews*, vol. 217, no. 1, pp. 79–95, 2007.
- [5] M. W. Ferguson and S. O'Kane, "Scar-free healing: from embryonic mechanism to adult therapeutic intervention," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 359, no. 1445, pp. 839–850, 2004.
- [6] P. Martin and S. M. Parkhurst, "Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis," *Development*, vol. 131, no. 13, pp. 3021–3034, 2004.
- [7] D. C. Kluth, L.-P. Erwig, and A. J. Rees, "Multiple facets of macrophages in renal injury," *Kidney International*, vol. 66, no. 2, pp. 542–557, 2004.
- [8] H. M. Wilson, D. Walbaum, and A. J. Rees, "Macrophages and the kidney," *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, vol. 13, no. 3, pp. 285–290, 2004.
- [9] S. Segerer, R. Djafarzadeh, H.-J. Grone et al., "Selective binding and presentation of CCL5 by discrete tissue microenvironments during renal inflammation," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 18, no. 6, pp. 1835–1844, 2007.
- [10] D. Ferenbach, D. C. Kluth, and J. Hughes, "Inflammatory cells in renal injury and repair," *Seminars in Nephrology*, vol. 27, no. 3, pp. 250–259, 2007.
- [11] D. Yang and J. J. Oppenheim, "Antimicrobial proteins act as "alarmins" in joint immune defense," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 50, no. 11, pp. 3401–3403, 2004.
- [12] R. Bataller and D. A. Brenner, "Liver fibrosis," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 2, pp. 209–218, 2005.
- [13] W. A. Border and N. A. Noble, "Transforming growth factor β in tissue fibrosis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 331, no. 19, pp. 1286–1292, 1994.
- [14] A. A. Eddy, "Progression in chronic kidney disease," *Advances in Chronic Kidney Disease*, vol. 12, no. 4, pp. 353–365, 2005.
- [15] J. R. Diamond and I. Pesek-Diamond, "Sublethal X-irradiation during acute puromycin nephrosis prevents late renal injury: role of macrophages," *The American Journal of Physiology: Renal Fluid and Electrolyte Physiology*, vol. 260, no. 6, pp. F779–F786, 1991.
- [16] H. van Goor, M. L. C. van der Horst, V. Fidler, and J. Grond, "Glomerular macrophage modulation affects mesangial expansion in the rat after renal ablation," *Laboratory Investigation*, vol. 66, no. 5, pp. 564–571, 1992.
- [17] S. B. Lee and R. Kalluri, "Mechanistic connection between inflammation and fibrosis," *Kidney International Supplement*, vol. 78, no. 119, pp. S22–S26, 2010.
- [18] H. Y. Lan, "Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 7, no. 7, pp. 1056–1067, 2011.
- [19] L. Sironi, E. Nobili, A. Gianella, P. Gelosa, and E. Tremoli, "Anti-inflammatory properties of drugs acting on the renin-angiotensin system," *Drugs of Today*, vol. 41, no. 9, pp. 609–622, 2005.
- [20] M. Ruiz-Ortega, M. Ruperez, V. Esteban et al., "Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 21, no. 1, pp. 16–20, 2006.
- [21] R. C. Harris and H.-F. Cheng, "The intrarenal renin-angiotensin system: a paracrine system for the local control of renal function separate from the systemic axis," *Experimental Nephrology*, vol. 4, supplement 1, pp. 2–7, 1996.
- [22] R. J. Fern, C. M. Yesko, B. A. Thornhill, H.-S. Kim, O. Smithies, and R. L. Chevalier, "Reduced angiotensinogen expression attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy in mice," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 103, no. 1, pp. 39–46, 1999.
- [23] S. Mezzano, C. Aros, A. Droguett et al., "NF- κ B activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 19, no. 10, pp. 2505–2512, 2004.
- [24] W. D. Park, M. D. Griffin, L. D. Cornell, F. G. Cosio, and M. D. Stegall, "Fibrosis with inflammation at one year predicts transplant functional decline," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 21, no. 11, pp. 1987–1997, 2010.
- [25] K. S. Famulski, J. Reeve, D. G. De Freitas, C. Kreepala, J. Chang, and P. F. Halloran, "Kidney transplants with progressing chronic diseases express high levels of acute kidney injury transcripts," *American Journal of Transplantation*, vol. 13, no. 3, pp. 634–644, 2013.

- [26] P. F. Halloran, A. B. Pereira, J. Chang et al., "Potential impact of microarray diagnosis of t cell-mediated rejection in kidney transplants: The INTERCOM study," *American Journal of Transplantation*, vol. 13, no. 9, pp. 2352–2363, 2013.
- [27] H.-U. Meier-Kriesche, J. D. Schold, T. R. Srinivas, A. Reed, and B. Kaplan, "Kidney transplantation halts cardiovascular disease progression in patients with end-stage renal disease," *American Journal of Transplantation*, vol. 4, no. 10, pp. 1662–1668, 2004.
- [28] F. G. Cosio, R. P. Pelletier, M. E. Falkenhain et al., "Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival," *Transplantation*, vol. 63, no. 11, pp. 1611–1615, 1997.
- [29] J. D. Schold, R. J. Howard, M. J. Scicchitano, and H.-U. Meier-Kriesche, "The expanded criteria donor policy: an evaluation of program objectives and indirect ramifications," *American Journal of Transplantation*, vol. 6, no. 7, pp. 1689–1695, 2006.
- [30] D. Anglicheau, A. Loupy, C. Lefaucheur et al., "A simple clinicohistopathological composite scoring system is highly predictive of graft outcomes in marginal donors," *American Journal of Transplantation*, vol. 8, no. 11, pp. 2325–2334, 2008.
- [31] G. Remuzzi, P. Cravedi, A. Perna et al., "Long-term outcome of renal transplantation from older donors," *The New England Journal of Medicine*, vol. 354, no. 4, pp. 343–352, 2006.
- [32] S. L. Nyberg, A. J. Matas, W. K. Kremers et al., "Improved scoring system to assess adult donors for cadaver renal transplantation," *American Journal of Transplantation*, vol. 3, no. 6, pp. 715–721, 2003.
- [33] B. L. Kasiske, D. E. Stewart, B. R. Bista et al., "The role of procurement biopsies in acceptance decisions for kidneys retrieved for transplant," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 9, no. 3, pp. 562–571, 2014.
- [34] M. A. Azancot, F. Moreso, M. Salcedo et al., "The reproducibility and predictive value on outcome of renal biopsies from expanded criteria donors," *Kidney International*, vol. 85, no. 5, pp. 1161–1168, 2014.
- [35] A. A. Sharfuddin and B. A. Molitoris, "Pathophysiology of ischemic acute kidney injury," *Nature Reviews Nephrology*, vol. 7, no. 4, pp. 189–200, 2011.
- [36] N. Perico, D. Cattaneo, M. H. Sayegh, and G. Remuzzi, "Delayed graft function in kidney transplantation," *The Lancet*, vol. 364, no. 9447, pp. 1814–1827, 2004.
- [37] F. M. Steegh, M. A. Gelens, F. H. Nieman et al., "Early loss of peritubular capillaries after kidney transplantation," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 22, no. 6, pp. 1024–1029, 2011.
- [38] D. Kaminska, B. Tyran, O. Mazanowska et al., "Cytokine gene expression in kidney allograft biopsies after donor brain death and ischemia-reperfusion injury using in situ reverse-transcription polymerase chain reaction analysis," *Transplantation*, vol. 84, no. 9, pp. 1118–1124, 2007.
- [39] A. Melk, B. M. Schmidt, A. Vongwiwatana, D. C. Rayner, and P. F. Halloran, "Increased expression of senescence-associated cell cycle inhibitor p16^{INK4a} in deteriorating renal transplants and diseased native kidney," *American Journal of Transplantation*, vol. 5, no. 6, pp. 1375–1382, 2005.
- [40] E. Dimeny, J. Wahlberg, E. Larsson, and B. Fellstrom, "Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection?" *Clinical Transplantation*, vol. 9, no. 2, pp. 79–84, 1995.
- [41] D. Seron, F. Moreso, X. Fulladosa, M. Hueso, M. Carrera, and J. M. Grinyó, "Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies," *Kidney International*, vol. 61, no. 2, pp. 727–733, 2002.
- [42] H. M. Isoniemi, L. Krogerus, E. von Willebrand, E. Taskinen, J. Ahonen, and P. Hayry, "Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts," *Kidney International*, vol. 41, no. 1, pp. 155–160, 1992.
- [43] Z. M. El-Zoghby, M. D. Stegall, D. J. Lager et al., "Identifying specific causes of kidney allograft loss," *American Journal of Transplantation*, vol. 9, no. 3, pp. 527–535, 2009.
- [44] J. Sellares, D. G. de Freitas, M. Mengel et al., "Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence," *American Journal of Transplantation*, vol. 12, no. 2, pp. 388–399, 2012.
- [45] M. Naesens, D. R. Kuypers, K. de Vusser et al., "Chronic histological damage in early indication biopsies is an independent risk factor for late renal allograft failure," *American Journal of Transplantation*, vol. 13, no. 1, pp. 86–99, 2013.
- [46] B. J. Nankivell, R. J. Borrows, C. L.-S. Fung, P. J. O'Connell, R. D. M. Allen, and J. R. Chapman, "Natural history of chronic allograft nephropathy," *The New England Journal of Medicine*, vol. 349, no. 24, pp. 2326–2333, 2003.
- [47] B. J. Nankivell, R. J. Borrows, C. L.-S. Fung, P. J. O'Connell, R. D. M. Allen, and J. R. Chapman, "Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation," *Transplantation*, vol. 78, no. 2, pp. 242–249, 2004.
- [48] R. L. Heilman, Y. Devarapalli, H. A. Chakkera et al., "Impact of subclinical inflammation on the development of interstitial fibrosis and tubular atrophy in kidney transplant recipients," *American Journal of Transplantation*, vol. 10, no. 3, pp. 563–570, 2010.
- [49] B. S. Choi, M. J. Shin, S. J. Shin et al., "Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: ten-year experience at a single center," *American Journal of Transplantation*, vol. 5, no. 6, pp. 1354–1360, 2005.
- [50] F. Moreso, M. Ibernón, M. Goma et al., "Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss," *American Journal of Transplantation*, vol. 6, no. 4, pp. 747–752, 2006.
- [51] R. B. Mannon, A. J. Matas, J. Grande et al., "Inflammation in areas of tubular atrophy in kidney allograft biopsies: a potent predictor of allograft failure," *American Journal of Transplantation*, vol. 10, no. 9, pp. 2066–2073, 2010.
- [52] M. Gago, L. D. Cornell, W. K. Kremers, M. D. Stegall, and F. G. Cosio, "Kidney allograft inflammation and fibrosis, causes and consequences," *American Journal of Transplantation*, vol. 12, no. 5, pp. 1199–1207, 2012.
- [53] F. Moreso, M. Carrera, M. Goma et al., "Early subclinical rejection as a risk factor for late chronic humoral rejection," *Transplantation*, vol. 93, no. 1, pp. 41–46, 2012.
- [54] C. Wiebe, I. W. Gibson, T. D. Blydt-Hansen et al., "Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant," *American Journal of Transplantation*, vol. 12, no. 5, pp. 1157–1167, 2012.
- [55] M. El Ters, J. P. Grande, M. T. Keddis et al., "Kidney allograft survival after acute rejection, the value of follow-up biopsies," *American Journal of Transplantation*, vol. 13, no. 9, pp. 2334–2341, 2013.
- [56] D. Rush, P. Nickerson, J. Gough et al., "Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 9, no. 11, pp. 2129–2134, 1998.

- [57] J. Kurtkoti, V. Sakhuja, K. Sud et al., "The utility of 1- and 3-month protocol biopsies on renal allograft function: a randomized controlled study," *American Journal of Transplantation*, vol. 8, no. 2, pp. 317–323, 2008.
- [58] D. Rush, D. Arlen, A. Boucher et al., "Lack of benefit of early protocol biopsies in renal transplant patients receiving TAC and MMF: a randomized study," *American Journal of Transplantation*, vol. 7, no. 11, pp. 2538–2545, 2007.
- [59] F. Moreso, D. Seron, M. Carrera et al., "Baseline immunosuppression is associated with histological findings in early protocol biopsies," *Transplantation*, vol. 78, no. 7, pp. 1064–1068, 2004.
- [60] A. T. Rowshani, E. M. Scholten, F. Bemelman et al., "No difference in degree of interstitial sirius red-stained area in serial biopsies from area under concentration-over-time curves-guided cyclosporine versus tacrolimus-treated renal transplant recipients at one year," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, no. 1, pp. 305–312, 2006.
- [61] P. G. Dean, J. P. Grande, S. Sethi et al., "Kidney transplant histology after one year of continuous therapy with sirolimus compared with tacrolimus," *Transplantation*, vol. 85, no. 8, pp. 1212–1215, 2008.
- [62] D. Seron, F. O'Valle, F. Moreso et al., "Immunophenotype of infiltrating cells in protocol renal allograft biopsies from tacrolimus-versus cyclosporine-treated patients," *Transplantation*, vol. 83, no. 5, pp. 649–652, 2007.
- [63] M. S. A. Kumar, M. I. Saeed, K. Ranganna et al., "Comparison of four different immunosuppression protocols without long-term steroid therapy in kidney recipients monitored by surveillance biopsy: five-year outcomes," *Transplant Immunology*, vol. 20, no. 1-2, pp. 32–42, 2008.
- [64] S. Vitko, R. Margreiter, and W. Weimar, "Three-year efficacy and safety results from a study of everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients," *American Journal of Transplantation*, vol. 5, no. 10, pp. 2521–2530, 2005.
- [65] A. Mota, M. Arias, E. I. Taskinen et al., "Sirolimus-based therapy following early cyclosporine withdrawal provides significantly improved renal histology and function at 3 years," *American Journal of Transplantation*, vol. 4, no. 6, pp. 953–961, 2004.
- [66] A. Servais, V. Meas-Yedid, O. Toupance et al., "Interstitial fibrosis quantification in renal transplant recipients randomized to continue cyclosporine or convert to sirolimus," *American Journal of Transplantation*, vol. 9, no. 11, pp. 2552–2560, 2009.
- [67] Y. Lebranchu, A. Thierry, E. Thervet et al., "Efficacy and safety of early cyclosporine conversion to sirolimus with continued MMF-four-year results of the postconcept study," *American Journal of Transplantation*, vol. 11, no. 8, pp. 1665–1675, 2011.
- [68] L. Liefeldt, S. Brakemeier, P. Glander et al., "Donor-specific HLA antibodies in a cohort comparing everolimus with cyclosporine after kidney transplantation," *American Journal of Transplantation*, vol. 12, no. 5, pp. 1192–1198, 2012.
- [69] M. D. Stegall, W. D. Park, T. S. Larson et al., "The histology of solitary renal allografts at 1 and 5 years after transplantation," *American Journal of Transplantation*, vol. 11, no. 4, pp. 698–707, 2011.
- [70] M. Naesens, E. Lerut, B. V. Damme, Y. Vanrenterghem, and D. R. Kuypers, "Tacrolimus exposure and evolution of renal allograft histology in the first year after transplantation," *American Journal of Transplantation*, vol. 7, no. 9, pp. 2114–2123, 2007.
- [71] M. A. Chisholm-Burns, C. A. Spivey, R. Rehfeld, M. Zawaideh, D. J. Roe, and R. Gruessner, "Immunosuppressant therapy adherence and graft failure among pediatric renal transplant recipients," *American Journal of Transplantation*, vol. 9, no. 11, pp. 2497–2504, 2009.
- [72] M. A. Chisholm-Burns, C. A. Spivey, J. G. Zivin, J. K. Lee, E. Sredzinski, and E. A. Tolley, "Improving outcomes of renal transplant recipients with behavioral adherence contracts: a randomized controlled trial," *American Journal of Transplantation*, vol. 13, no. 9, pp. 2364–2373, 2013.

9.2. TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las categorías de Banff actualizada en 2015	
Categoría 1	Biopsia normal o sin cambios específicos
Categoría 2	Cambios mediados por anticuerpos (ABMR; antibody-mediated rejection)
ABMR agudo/activo	<p>Los tres hallazgos descritos a continuación deben estar presentes para realizar el diagnóstico. Las biopsias que muestren hallazgos histológicos y evidencia de la interacción actual/reciente de los anticuerpos con el endotelio vascular o DSA, pero no ambos, deben designarse como sospechosas de ABMR agudo/activo. Las lesiones pueden ser clínicamente activas o de baja intensidad (“smoldering”) o pueden ser subclínicas; debe anotarse si las lesiones se acompañan de depósitos de C4d.</p> <ol style="list-style-type: none"> Evidencia histológica de lesión aguda, incluyendo una o más de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> -Inflamación microvascular ($g > 0$ en ausencia de glomerulonefritis recurrente o de novo y $ptc > 0$). -Arteritis intimal o transmural ($v > 0$)¹ -Microangiopatía trombótica aguda en ausencia de otras causas. -Necrosis tubular aguda en ausencia de otras causas. Evidencia de la interacción actual/reciente de los anticuerpos con el endotelio vascular, incluyendo al menos alguna de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> -Depósito lineal de C4d en los capilares peritubulares (C4d2 o C4d3 por IF en tejido congelado o C4d > 0 por IHQ en secciones en parafina). -Presencia de inflamación microvascular ($[g+ptc] \geq 2$), aunque la presencia de $ptc \geq 2$ no es suficiente en los casos con rechazo celular, infiltrados borderline o infección; y g debe ser al menos ≥ 1. -Expresión aumentada de transcritos en la biopsia indicativos de lesión endotelial si han sido bien validados. Evidencia serológica de la presencia de DSA (HLA u otros antígenos). En las biopsias con sospecha de ABMR por los criterios 1 y 2 debe realizarse una valoración de la presencia de DSA.
ABMR crónico activo²	<p>Los tres hallazgos deben estar presentes para el diagnóstico. Al igual que para el ABMR agudo/activo, las biopsias que muestren hallazgos histológicos y evidencia de la interacción actual/reciente entre los anticuerpos y el endotelio vascular o DSA, pero no ambos, deben designarse como sospechosas, y debe anotarse si presentan o no depósitos de C4d.</p> <ol style="list-style-type: none"> Evidencia histológica de lesión tisular crónica incluyendo al menos una de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> -Glomerulopatía del trasplante ($cg > 0$), si no existen cambios de microangiopatía trombótica; incluye cambios evidentes en el estudio ultraestructural con microscopía electrónica ($cg1a$). -Multilaminación de la membrana basal de los capilares peritubulares severa (requiere microscopía electrónica)³. -Fibrosis de la íntima arterial <i>de novo</i> después de excluir otras causas. La presencia de leucocitos en las zonas de esclerosis de la íntima está a favor del diagnóstico de ABMR si no hay antecedentes previos de rechazo mediado por células T con afectación arterial. Evidencia de la interacción actual/reciente de los anticuerpos con el endotelio vascular, incluyendo al menos alguna de las siguientes: <ul style="list-style-type: none"> -Depósito lineal de C4d en los capilares peritubulares (C4d2 o C4d3 por IF en tejido congelado o C4d > 0 por IHQ en secciones en parafina). -Presencia de inflamación microvascular ($[g+ptc] \geq 2$), aunque la presencia de $ptc \geq 2$ no es suficiente en los casos con rechazo celular, infiltrados borderline o infección; y g debe ser al menos ≥ 1. -Expresión aumentada de transcritos en la biopsia indicativos de lesión endotelial si han sido bien validados. Evidencia serológica de la presencia de DSA (HLA u otros antígenos). En las biopsias con sospecha de ABMR por los criterios 1 y 2 debe realizarse una valoración de la presencia de DSA.

Depósitos de C4d sin cambios de rechazo	Deben estar presentes los siguientes tres cambios para su diagnóstico ⁴ <ol style="list-style-type: none"> 1. Depósito lineal de C4d en los capilares peritubulares (C4d2 o C4d3 por IF en tejido congelado o C4d>0 por IHQ en secciones en parafina). 2. g=0, ptc=0, cg=0 (por microscopía óptica (y electrónica si está disponible), v=0, no microangiopatía trombótica, no multilaminación de la membrana basal, no necrosis tubular aguda). 3. No rechazo agudo mediado por células T (grado \geq 1A) o cambios límite.
Categoría 3 “Borderline”	Cambios sospechosos de rechazo agudo mediado por células T <ul style="list-style-type: none"> • Focos de tubulitis (t1, t2 o t3) con inflamación intersticial mínima (i0 o i1) o inflamación intersticial (i2 o i3) con tubulitis leve (t1). • Ausencia de arteritis de la íntima (v =0)
Categoría 4	Rechazo agudo mediado por células T (TCMR; T-cell mediated rejection)
TCMR agudo Grados	IA. Inflamación intersticial > 25% del tejido cortical sin fibrosis (i2 o i3) con focos de tubulitis moderada (t2). IB. Inflamación intersticial > 25% del tejido cortical sin fibrosis (i2 o i3) con focos de tubulitis severa (t3). IIA. Arteritis íntima ligera o moderada (v1) con/sin inflamación intersticial y/o tubulitis. IIB. Arteritis íntima grave afectando > 25% del área de la luz vascular (v2) con/sin inflamación intersticial y/o tubulitis. III. Arteritis transmural y/o necrosis fibrinoide de las células musculares de la capa media arterial con inflamación linfocitaria (v3).
TCMR crónico	Vasculopatía crónica del injerto (fibrosis de la íntima arterial con infiltración de células mononucleares en las zonas de fibrosis, formación de una neointima). Cabe destacar que estas lesiones pueden ser indicativas tanto de ABMR crónico como de TCMR crónico, este último puede manifestarse también en el compartimento túbulo-intersticial.
Categoría 5 FI/AT Grados	Fibrosis intersticial y atrofia tubular. <ul style="list-style-type: none"> II. Fibrosis intersticial y atrofia tubular leve (\leq 25% del área cortical). II. Fibrosis intersticial y atrofia tubular moderada (26-50% del área cortical). III. Fibrosis intersticial y atrofia tubular severa (>50% del área cortical).
Categoría 6	Otros cambios no relacionados con rechazo agudo o crónico <ul style="list-style-type: none"> Nefropatía por el virus del poliovirus humano BK Síndromes linfoproliferativos post-trasplante Nefrotoxicidad crónica por anticalcineurínicos Enfermedad recurrente Glomerulopatía de novo (distinta de la glomerulopatía del trasplante) Pielonefritis Nefritis intersticial relacionada con fármacos.

¹ Los cambios vasculares de arteritis de la íntima (v) pueden indicar tanto ABMR, TCMR, o cambios mixtos de TCMR/ABMR. Estas lesiones deben evaluarse en arterias que contengan una capa media continua con dos o más capas de células musculares.

² Los cambios de ABMR crónico activo comprenden desde la glomerulopatía del trasplante (GT) incipiente solo evidente en el estudio mediante microscopía electrónica (cg1a) hasta los grados más avanzados de GT y otros cambios crónicos además de la inflamación microvascular. En los casos en que no exista evidencia de la interacción de los anticuerpos con el endotelio debería omitirse el término “activo”. En estos casos, pueden detectarse DSA en el momento de la biopsia o haber sido detectados previamente tras el trasplante.

³ Deben observarse siete o más capas en un capilar peritubular cortical y cinco o más capas en otros dos capilares peritubulares: Deben evitarse porciones cortadas tangencialmente.

⁴ El significado clínico de estos hallazgos puede ser distinto en injertos expuestos a anticuerpos contra el grupo sanguíneo (trasplantes ABO incompatibles) en los que no parece ser lesivo para el injerto y podría representar acomodación. Sin embargo, en los pacientes con anticuerpos anti-HLA, estas lesiones pueden progresar a ABMR crónico.

Tabla 2. Variables asociadas a rechazo subclínico	
Factores del donante	Donante cadavérico vs. vivo
	Donante vivo no emparentado vs. emparentado
	Donante fallecido por ACV vs. TCE
Factores del receptor	Factores genéticos (polimorfismos genéticos)
	Sensibilización HLA
	Retrasplante
	Incompatibilidad en el sistema HLA (locus DR)
Factores del trasplante	Tratamiento inmunosupresor
	Rechazo agudo previo a la biopsia

Tabla 3. "Pathogenesis bases transcripts" según ATAGC		
Abreviatura	PBTs	Descripción
QCAT ¹	Quantitative CTL (cytotoxic T lymphocytes)-Associated Transcripts	CAT CD8s with high expression in CD8+CTL and high correlation with amounts of CD8+CTL RNA in a sample. List was made non-redundant based on highest expression in CD8+CTL (n=25).
QCMAT ²	Quantitative Constitutive Macrophage-Associated Transcripts	Transcripts with high expression in human primary macrophages, not inducible by IFN-g, and high correlation with amounts of macrophage RNA in a sample. List was made non-redundant based on highest expression in macrophages, excludes overlap with AMAT1 (n=67).
GRIT1 ³	Gamma-IFN and rejection induced transcripts 1	Human orthologs of GRIT1 translated by the Affymetrix ortholog tool from Mouse430_2 gene list - mtGRITs (n=42).
GRIT2 ³	Gamma-IFN and rejection induced transcripts 2	Human orthologs of GRIT1 translated by the Affymetrix ortholog tool from Mouse430_2 gene list - moGRITs (n=168).
GRITs	New Gamma-IFN and Rejection Induced Transcripts	IFNG-inducible transcripts in mice allografts (GRIT1 and GRIT2) and in human cell lines: macrophages, HUVEC (endothelial cell line) and RPTEC
DSAST ⁴	Donor-specific antibody (DSA) selective transcripts	Transcripts differentially expressed between rejection-classified biopsies from DSA+ patients compared to DSA negative patients (n=23).
AMAT1 ²	Alternative Macrophage Associated Transcripts 1	Alternative activation of macrophages in mouse model of ischemic necrosis. Redundant probesets present. (n=27)
IGT ⁵	Immunoglobulin transcripts	B cell transcripts
ENDAT ⁶	Endothelial cell associated transcripts	Literature-based endothelial cell-associated transcript set (n=119).
IRRAT ⁷	Injury-repair response associated transcripts	Transcripts capable of estimation of kidney transplant injury early and late post-transplant.
NKB ⁸	NK cell transcript burden	Transcripts with higher expression in rejection-classified biopsies from DSA+ patients (DSAST)

		and selective expression in human NK cells but not effector T cells.
TCB ⁸	T cell transcript burden	Transcripts capable of quantitating human effector T cell transcript amounts with minimal expression in human NK cells
BAT ⁵	B-cell associated transcripts	Transcripts with selective expression in human B cells (n=146).
MCAT ⁹	Mast cell associated transcripts	Transcripts highly correlated with scarring (fibrosis) in allograft biopsies
IRITD3	Injury and rejection induced transcripts - Intermediate	Humanized transcripts induced by a non-immune kidney injury in isografts peaking around day 3 post-transplant in mouse kidney transplants. Redundant probesets present (n=802).
IRITD5	Injury and rejection induced transcripts - Intermediate	Humanized transcripts induced by a non-immune kidney injury in isografts peaking around day 5 post-transplant in mouse kidney transplants. Redundant probesets present (n=569).
KT1 ¹⁰	Kidney Transcripts - set1	Humanized mouse kidney selective transcripts (n=1333). Majority decreased after injury
KT2 ¹⁰	Kidney Transcripts - set 2	Derived from mouse solute carrier transcripts
KT1.1 ¹⁰	Kidney Transcripts set 1.1	Derived from mouse kidney selective
KT2.1 ¹⁰	Kidney transcripts - Set 2.1	Derived from mouse solute carrier transcripts

¹Am J Transplant 2008; 8 (3):637-46.

²Am J Transplant 2010; 10 (4):810-20.

³Am J Transplant 2006; 6 (6): 1342-54

⁴Am J Transplant 2010; 10 (8): 1812-22.

⁵Am J Transplant. 2008; 8 (7):1434-43.

⁶Am J Transplant 2009; 9 (11): 2520-31.

⁷J Am Soc Nephrol 2012; 23 (5):948-58.

⁸Am J Transplant 2012; 12 (5): 1180-91.

⁹Am J Transplant 2009; 9 (1): 169-78.

¹⁰Am J Transplant 2007; 7 (5): 1121-30.

9.3. FIGURAS

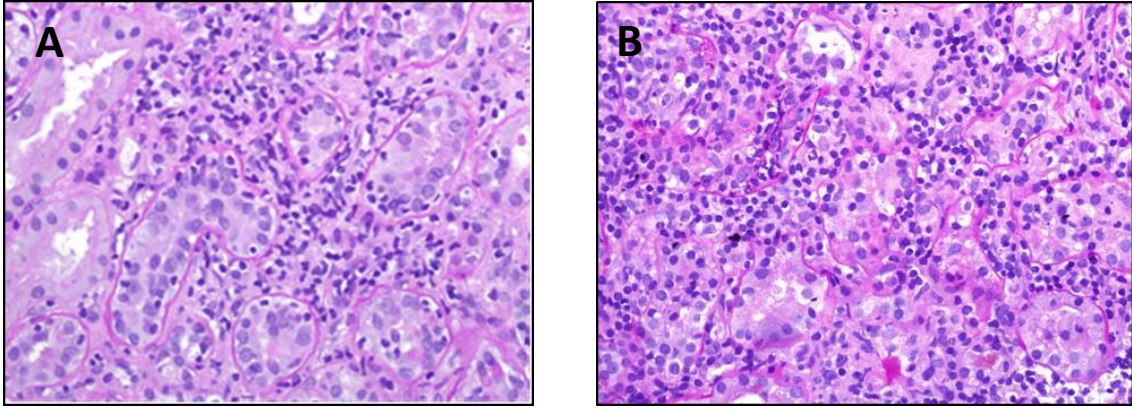


Figura 1. Histología de rechazo celular grado 1A. **A y B.** Infiltrado inflamatorio intersticial (i1) y tubulitis (t2). Tinción de PAS (400 x). Cortesía de M. Vidal. Departamento de Patología del H. Vall d' Hebrón.

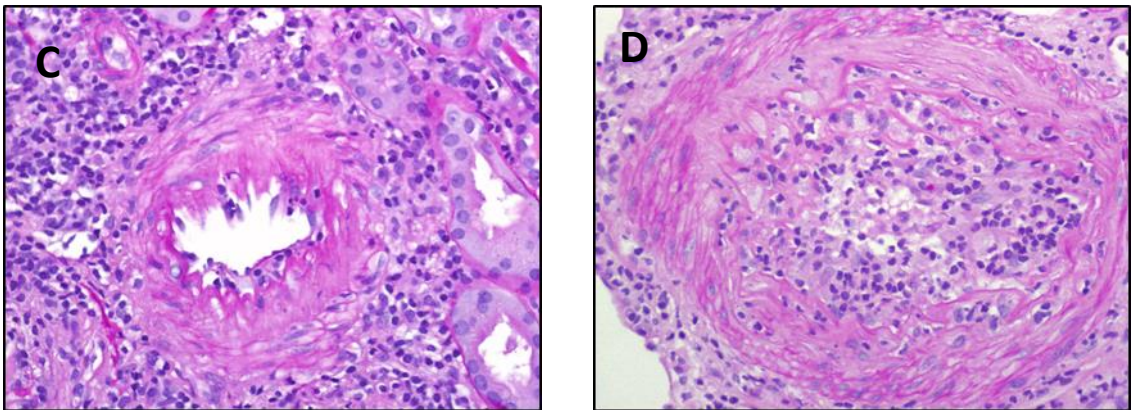


Figura 2. Histología de rechazo celular grado 2A y 2B. **C.** Imagen de endotelialitis (v1). **D.** Imagen de endotelialitis (v2). Tinción de PAS (400 x). Cortesía de M. Vidal. Departamento de Patología del H. Vall d'Hebrón.

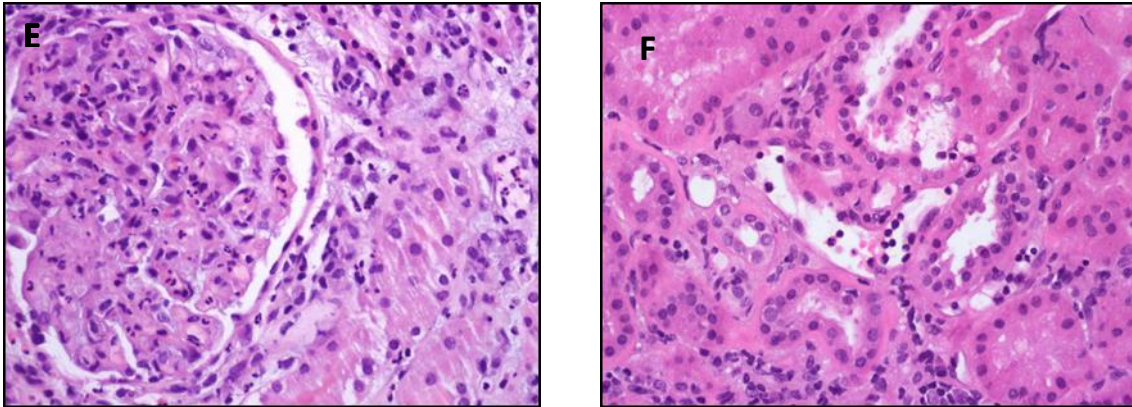


Figura 3. Histología de rechazo agudo humoral. **E**, infiltrado celular inflamatorio por neutrófilos en capilares glomerulares (Tinción PAS 400x). **F**, infiltrado inflamatorio en capilares peritubulares (H&E400x).

Cortesía de M. Vidal y MT Salcedo. Departamento de Anatomía Patológica. H. Vall d' Hebrón.

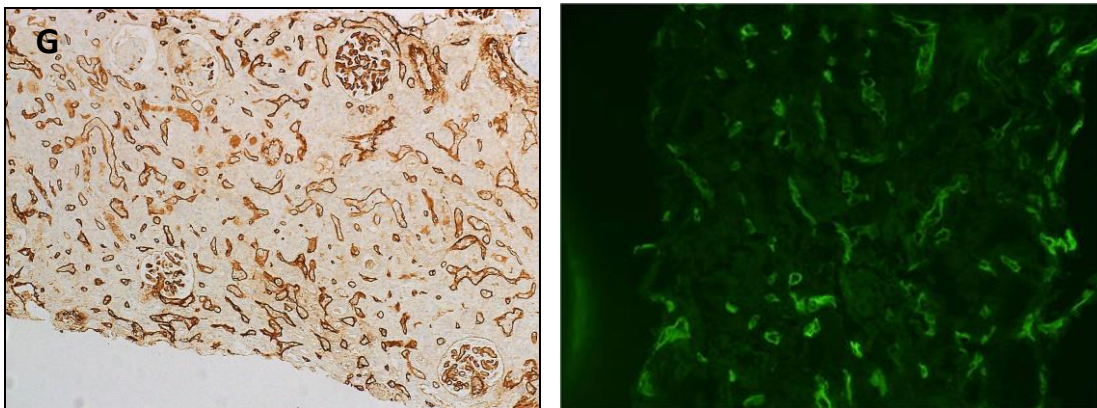


Figura 4. **G**, depósito de C4d difuso en capilares peritubulares (Tinción por Inmunohistoquímica). **H**, imagen de depósito de C4d difuso mediante técnica de Inmunofluorescencia. Cortesía de M. Vidal y MT

Salcedo. Departamento de Anatomía Patológica. H. Vall d' Hebrón.

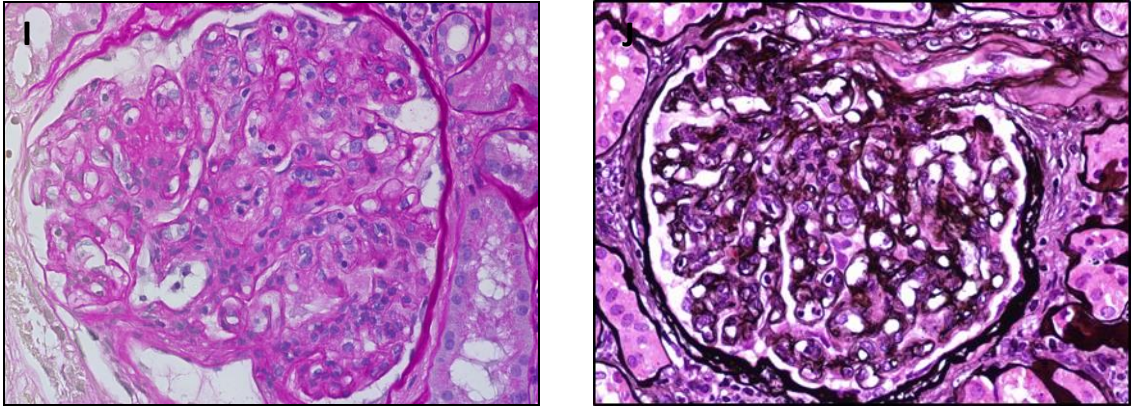


Figura 5. Histología de rechazo humoral crónico. **I y J**, imagen de Glomerulopatía del Trasplante (cg3) e inflamación de capilares glomerulares (g1) en paciente con anticuerpos anti-HLA positivos y C4d negativo (Tinciones PAS 400x y Plata Metenamina respectivamente). Cortesía de M.Vidal y MT Salcedo. Departamento de Anatomía Patológica de Hospital Vall d' Hebrón.

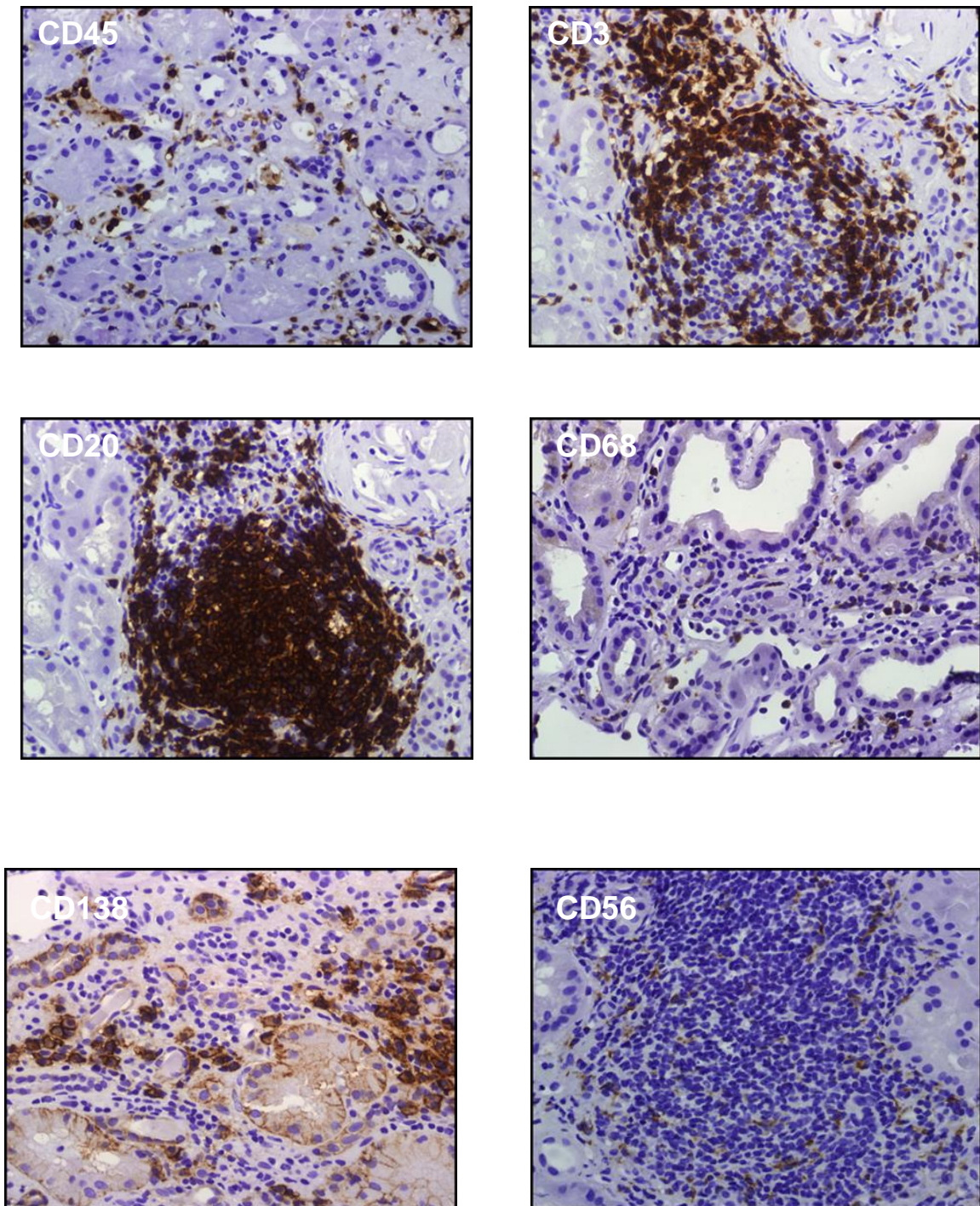


Figura 6. Infiltrado inflamatorio tubulointersticial y de la microcirculación mediante técnica de Inmunohistoquímica. **CD45:** leucocitos totales, **CD3:** linfocitos T, **CD20:** linfocitos B, **CD68:** monocitos/macrófagos, **CD138:** células plasmáticas, **CD56:** células Natural Killer.