

# Evidencia del impacto de los anticuerpos anti-HLA y anti-MICA en la pérdida del injerto renal

Luis E. Morales-Buenrostro,<sup>a</sup> Roxana Rodríguez-Romo,<sup>b</sup> Claudia de Leo-Cervantes,<sup>b</sup> Mayra López,<sup>b</sup> Jesús Pérez-Garrido,<sup>b</sup> Norma Uribe-Uribe,<sup>c</sup> Josefina Alberú-Gómez<sup>b\*</sup>

Departamentos de <sup>a</sup>Nefrología-Metabolismo Mineral, <sup>b</sup>Trasplantes y <sup>c</sup>Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México D.F., México.

Recibido en su versión modificada: 23 de abril de 2008

Aceptado: 25 de abril de 2008

## RESUMEN

**Antecedentes:** Los anticuerpos anti-HLA y anti-MICA se han asociado cada vez con mayor frecuencia a menor supervivencia del injerto renal. El objetivo de este estudio es comunicar la frecuencia de pérdida del injerto dos años después de la detección de anticuerpos anti-HLA, anti-MICA, o ambos, en un grupo de receptores de trasplante renal (RTR).

**Métodos:** Estudiamos a 196 RTR con injerto funcional. El suero de los pacientes fue analizado para la presencia de anticuerpos IgG anti-HLA clase I y clase II con Luminex utilizando LABScreen® Mixed y LABScreen® PRA. La presencia de anticuerpos anti-MICA en el mismo suero se analizó por Luminex.

**Resultados:** De 196 RTR (edad promedio 36.7 años, 42% sexo femenino), 124 (63.3%) fueron negativos a todos los anticuerpos estudiados y 72 (36.7%) fueron positivos: 34 para anticuerpos anti-HLA solo, 29 para anticuerpos anti-MICA solo y nueve para anticuerpos anti-HLA+anti-MICA. A una mediana de seguimiento de 20.5 meses (1.2-25.2), ocho pacientes perdieron el injerto por daño crónico del mismo, confirmado por biopsia: 2/124 (1.6%) del grupo de anticuerpos negativos y 6/72 (8.3%) del grupo de anticuerpos positivos, con una supervivencia del injerto significativamente inferior para el grupo de anticuerpos positivos ( $p=0.046$ , log-rank test).

**Conclusiones:** La presencia de anticuerpos circulantes estuvo asociados con riesgo incrementado para pérdida del injerto; la coexistencia de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA produjo el riesgo más alto para pérdida del injerto en la población analizada.

## Palabras clave:

Anticuerpos anti-HLA, anti-MICA, trasplante renal, supervivencia, función del injerto renal

## SUMMARY

**Background:** HLA and MICA antibodies are increasingly associated with poorer graft survival. The aim of this study is to report the frequency of graft loss 2 years after the detection of HLA abs and MICA abs among a group of kidney transplant recipients.

**Methods:** We tested 196 patients with a functioning graft. Sera were screened for HLA and MICA IgG abs by Luminex, using the LABScreen® Mixed, and LABScreen® PRA. The sera were screened for MICA abs by Luminex.

**Results:** Of 196 kidney transplant recipients (mean age 36.7 years, 42% female), one hundred twenty four (63.3%) were negative to all tested abs, and 72 (36.7%) were positive for: HLA abs alone=34, MICA abs alone=29, and HLA+MICA abs=9. At a median follow-up of 20.5 (1.2-25.2) months, 8 patients lost their grafts due to biopsy-confirmed chronic allograft injury: 2/124 (1.6%) ab-negative, and 6/72 (8.3%) ab-positive, with a significantly lower survival for the Ab-positive group ( $p=0.046$ , log-rank test).

**Conclusions:** The presence of circulating abs was associated with an increased risk of graft loss, and the coexistence of HLA and MICA abs increases the risk of graft loss.

## Key words:

HLA antibody, MICA antibody, kidney transplantation, survival, graft function

## Introducción

El efecto deletéreo de la respuesta inmune humoral en el injerto, descrita hace más de tres décadas, ha recobrado importancia en el escenario de trasplantes.<sup>1,2</sup>

Observaciones en el transcurso de los últimos 15 años han confirmado y descifrado progresivamente las características clínicas, histo e inmunopatológicas que ocurren en el rechazo humoral agudo y su fuerte correlación con anticuerpos anti-HLA clase I y clase II.<sup>3-5</sup> En forma temporalmente muy

\* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Josefina Alberú-Gómez. Departamento de Trasplantes, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Vasco de Quiroga 15, Col. Sección XVI, Del. Tlalpan, 14000 México D.F., México. Correo electrónico: josefinaalberu@hotmail.com

próxima y afortunada a las observaciones clínico-patológicas de esta "nueva era", asiste como un importante acontecimiento la descripción de depósitos capilares de fragmentos de complemento C4d en biopsias de injertos renales de pacientes con disfunción temprana del injerto, sugiriendo alorreactividad humoral.<sup>6</sup> Posteriormente, estos depósitos de C4d en capilares peritubulares fueron correlacionados con la presencia de anticuerpos circulantes anti-HLA *de novo*, donador específico al momento de disfunción del injerto,<sup>7</sup> hallazgos que aunados ponían en evidencia los mecanismos de daño que resultan de la interrelación de anticuerpos unidos al endotelio y la activación del complemento.

Menor supervivencia y mayor intensidad del rechazo (frecuentemente resistente a terapias antirrechazo convencionales) han sido asociados al desarrollo postrasplante de anticuerpos *de novo* donador específico.<sup>8</sup> Adicionalmente, ha sido establecida una correlación significativa entre la presencia pre o postrasplante de anticuerpos anti-MICA y pérdida de injerto ( $p < 0.001$ ), ya sea por rechazo agudo irreversible<sup>9</sup> o contribuyendo significativamente junto con anticuerpos *de novo* anti-HLA después del trasplante a la pérdida crónica del injerto ( $p < 0.01$ ).<sup>10</sup>

Los anticuerpos anti-HLA están dirigidos a antígenos HLA clase I y clase II presentes en el injerto. Su generación obedece a las diferencias antigénicas en estas moléculas entre donador y receptor. Estas moléculas antigénicas codificadas en la región del complejo principal de histocompatibilidad contenida en el brazo corto del cromosoma 6, se expresan en todas las células nucleadas del organismo —para el caso de las moléculas clase I—, y tienen una expresión celular más restringida en las moléculas antigénicas clase II (células presentadoras de antígeno como linfocitos B, monocitos o macrófagos, células endoteliales activadas).<sup>11</sup> De manera sucinta recordaremos que la respuesta inmune que ocurre en el huésped ante la exposición a los antígenos presentes en el injerto, involucra un evento de tres señales, en el cual la señal 1 está otorgada por los antígenos HLA "no propios" distintos a los del receptor y contenidos en el injerto, al unirse al receptor correspondiente de la célula T; la señal 2 la aportan las moléculas de coestimulación (CD40-CD40L y CD28-B7) y la señal 3 está dada por una citocina, como la interleucina 2, que se une a su receptor y conduce a la célula linfocitaria T a dividirse causando expansión clonal. Las células T "activadas" interactuarán subsecuentemente con células efectoras de la respuesta de rechazo vía contacto célula-célula y secreción de citocinas. Es en esta forma como el linfocito T CD4 originalmente activado, promoverá la producción de aloanticuerpos por interacción, activación y función de linfocitos B.<sup>11</sup>

Por su parte, MICA (cadena A relacionada a MHC clase I) fue descrita en 1994 junto con MICB, como dos nuevas familias de genes polimórficos localizados de manera cercana al *locus* HLA-B del cromosoma 6; codifican glucoproteínas de superficie celular de 62 kDa que comparten homología de secuencia limitada con moléculas HLA clase I y no se asocian a  $\beta$ 2-microglobulina.<sup>12</sup> Las células endoteliales expresan MICA en su superficie haciendo de esta molécula polimórfica un posible blanco para la respuesta inmune celular y humoral durante el rechazo del injerto.<sup>13</sup>

Los anticuerpos anti-HLA desarrollados postrasplante no necesariamente resultan en eventos de rechazo agudo a través de una vía dependiente del complemento. Mecanismos efectores adicionales —independientes de daño mediado por complemento— han sido propuestos mediante la unión del anticuerpo a moléculas de superficie celular seguido por transducción de señales, activación y proliferación de células endoteliales y de músculo liso, procesos que contribuyen a la arterioesclerosis del trasplante.<sup>14</sup>

Previamente informamos los resultados de un estudio transversal realizado en 198 receptores de trasplante renal, cuyo objetivo fundamental fue evaluar el impacto de anticuerpos anti-HLA clase I y clase II en la función de los injertos. La comunicación señala la ausencia de correlación entre la presencia de anticuerpos anti-HLA y una peor función renal.<sup>15</sup> En virtud del número de informes que indican que la contribución de estos anticuerpos al deterioro y pérdida de injertos es más evidente a largo plazo, decidimos llevar a cabo un nuevo análisis para conocer el destino de los injertos renales de los pacientes dos años después de la determinación de anticuerpos anti-HLA. Adicionalmente, los sueros obtenidos dos años antes, almacenados y congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , fueron analizados para determinación de anticuerpos anti-MICA. En esta forma, el análisis actual evalúa la asociación entre anticuerpos anti-HLA clase I, clase II y anti-MICA en la función y pérdida de injerto de estos pacientes.

## Material y métodos

De una cohorte de 408 pacientes que han recibido trasplante renal en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" entre enero de 1990 y diciembre de 2003, 283 se encontraban con injerto funcional al momento de la planeación del estudio (marzo de 2004). El injerto funcional fue definido como creatinina sérica  $\leq 5$  mg/dl y tasa de filtración glomerular estimada por la fórmula MDRD  $\geq 10$  ml/min. A todos se les invitó a participar y acudieron 198 pacientes, los cuales firmaron el consentimiento informado constituyendo de esta forma la población de estudio. Se obtuvo una muestra de sangre de cada participante entre mayo y agosto de 2004. Las muestras fueron procesadas y el suero obtenido fue congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . En septiembre de 2004 los sueros fueron analizados para documentar la presencia de anticuerpos anti-HLA. A finales de 2005, 196 de 198 muestras de suero congelado (muestra insuficiente de suero de dos pacientes) fueron enviadas a los laboratorios de *Terasaki Foundation* para la determinación de anticuerpos anti-MICA. De esta forma, el análisis actual incluye a 196 pacientes.

Los datos obtenidos de los expedientes clínicos fueron sexo, edad al momento de la toma de la muestra para determinación de anticuerpos, transfusiones sanguíneas, embarazos postrasplante, fecha del trasplante renal, procedencia del injerto, rechazo agudo y, por último, esquema de inmunosupresión utilizado al momento de la toma de muestra sanguínea para determinación de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA. Para evaluar el impacto de estos anticuerpos en la función y supervivencia de los injertos renales a dos años de

su detección, se utilizaron las cifras de creatinina sérica y la tasa de filtración glomerular estimada mediante la fórmula de MDRD al momento de la toma de la muestra (2004) y en la última consulta (dos años posterior a la determinación de anticuerpos). Adicionalmente, se calculó la delta de creatinina sérica y de la tasa de filtración glomerular entre estas dos mediciones. De igual forma se obtuvieron estos marcadores de función renal al tercer mes postrasplante, momento en que la función renal ya se considera estable, con el fin de comparar la evolución desde el momento de la toma de la muestra hasta dos años después.

### *Detección de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA*

El suero de los 198 receptores de trasplante renal fue examinado para presencia de anticuerpos IgG anti-HLA clase I o II con LABScreen®Mixed, de acuerdo con las instrucciones del productor (One Lambda, Inc., Canoga Park, California, USA); se realizó LABScreen® PRA para clase I y II en los sueros positivos.

Los anticuerpos anti-MICA fueron determinados por Luminex flow. Los alelos de MICA utilizados para estudio de los sueros fueron 001, 002, 004, 007, 008, 012, 018, 019 y 027. Un valor de fluorescencia normalizado de 3000 o más fue informado como positivo.

### *Análisis estadístico*

Los resultados son presentados como media $\pm$ desviación estándar para las variables numéricas continuas con distribución paramétrica, mientras que las variables con distribución no paramétrica como medianas con valores mínimos y máximos. Las variables nominales se muestran como frecuencia y proporción. Para demostrar diferencias entre pacientes positivos y negativos (Cuadro I) utilizamos t de Student para variables paramétricas, U de Mann-Whitney para variables no paramétricas, así como  $\chi^2$  con corrección de Yates o prueba exacta de Fisher según aplicara para las variables nominales. Cuando dividimos los pacientes en cuatro grupos (Cuadro II), utilizamos Anova de una vía para las variables numéricas con distribución paramétrica y prueba de Kruskal-Wallis para aquellas con distribución no paramétrica. Para comparar la proporción de pacientes que perdieron el injerto entre los grupos sin anticuerpos, con solo un tipo de anticuerpo o ambos anticuerpos, aplicamos  $\chi^2$  de tendencia. La supervivencia del injerto se analizó con curvas de Kaplan-Meier con *log-rank*. Se consideró estadísticamente significativa  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

La edad promedio al momento de determinación de anticuerpos fue de  $36.7 \pm 13.8$  años. Los 196 pacientes estudiados, 114 hombres y 82 mujeres, tenían una media de edad de  $36.7 \pm 13.8$  años al momento de la medición de anticuerpos. La mediana de seguimiento del grupo desde el trasplante hasta la medición de anticuerpos fue de 51.4 meses (4.3 a

176.3). La procedencia de los injertos fue de donador vivo en 152 casos y el resto de donador fallecido.

**Anticuerpos anti-HLA y anti-MICA.** Setenta y dos pacientes (36.7%) fueron positivos para alguno de los anticuerpos estudiados; de ellos, 34 mostraron positividad solamente para anticuerpos dirigidos a antígenos HLA, en 29 la positividad fue exclusiva para anticuerpos anti-MICA y en nueve se documentaron anticuerpos tanto para HLA como para MICA. De los 43 pacientes con anticuerpos positivos contra HLA —solos o en combinación con anticuerpos anti-MICA—, 10 fueron positivos para clase I, 22 para clase II y 11 para ambos. Las características demográficas de los pacientes, agrupados por tipo de anticuerpos documentados, se muestran en el cuadro I. Cabe señalar que no ocurrieron diferencias significativas del tiempo de seguimiento señalado entre los pacientes con anticuerpos anti-HLA positivos a clase I, clase II o ambos (clase I y clase II) y los que resultaron negativos a estos anticuerpos ( $p=0.25$ , dato no mostrado en el cuadro I).

**Función del injerto.** La mediana de seguimiento desde el trasplante hasta la última consulta fue de 67.4 (14.6-198.8) meses. Uno de los aspectos más relevantes consistió en documentar la evolución de la función renal a la vuelta de dos años desde su determinación. El cuadro II muestra que todos los grupos, independientemente del estatus de anticuerpos, tuvieron un incremento en las cifras de creatinina sérica y en la delta de creatinina sérica, así como disminución en la tasa de filtración glomerular en cada uno de los grupos entre los valores basales (tres meses postrasplante) hasta la toma de la muestra (para determinación de anticuerpos) y entre la toma de la muestra a la evaluación efectuada dos años después.

Aun cuando no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes negativos comparados con los que tenían exclusivamente anticuerpos anti-HLA, anticuerpos anti-MICA o ambos, es evidente que el deterioro de estos indicadores de la función renal fue mayor para el grupo de pacientes en los que se detectaron anticuerpos combinados (anti-HLA+anti-MICA) (Cuadro II). Es necesario destacar que para el cálculo de la función renal de los pacientes que perdieron la función del injerto, las cifras fueron las previas inmediatas a que alcanzaran criterios de pérdida de la función acorde con los parámetros señalados en el apartado de Material y métodos.

**Pérdida del injerto.** A un seguimiento promedio de 20.5 meses (1.2-25.2) después de la determinación de anticuerpos, ocho pacientes perdieron su injerto. La causa en todos fue nefropatía crónica del injerto confirmada por biopsia. El impacto real de los anticuerpos determinados en este estudio pudo documentarse en la frecuencia de pérdida del injerto asociada a la presencia de los mismos. En esta forma, la pérdida del injerto ocurrió en 1.6% (2/124 pacientes) del grupo de pacientes con ausencia de anticuerpos comparado con 8.3% (6/72 pacientes) en quienes se documentó al menos alguno de los anticuerpos estudiados. Cabe resaltar que existió aumento en la pérdida de injerto proporcional al número de anticuerpos detectados: 0 *versus* 1 *versus* 2 anticuerpos ( $p=0.003$ ,  $\chi^2$  de tendencia). La figura 1 muestra las curvas de supervivencia de injerto para el grupo de

**Cuadro I. Características de los pacientes**

Variable	Negativos (n = 124)	Positivos (n = 72)	p
Sexo masculino	71 (57.3)	43 (59.7)	0.85
Edad (años en la toma de la muestra)	37.9 ± 11.15	38.5 ± 12.90	0.76
Seguimiento postrasplante (meses)	65.4 (46.0–108.5)	71.4 (47.9–108.9)	0.73
Donador fallecido	28 (22.6)	16 (22.2)	1.00
DVNR	10 (8.1)	3 (4.2)	0.38
DVR			
2 Haplotipos	14 (16.3)	5 (6.9)	0.46
1 Haplotipos	64 (74.4)	39 (54.2)	0.84
0 Haplotipos	8 (9.3)	9 (12.5)	0.24
Transfusiones	75 (60.5)	44 (61.1)	1.00
Embarazos	27 (21.8)	12 (16.7)	0.55
Tacrolimus	38 (30.6)	19 (26.4)	0.64
CyA	63 (50.8)	33 (45.8)	0.60
AZA	80 (64.5)	44 (61.1)	0.75
MMF	36 (29.0)	24 (33.3)	0.64
RAPA	8 (6.5)	6 (8.3)	0.84
Inducción con anti-IL2r	39 (31.5)	24 (33.3)	0.91
Primer trasplante	116 (93.5)	68 (94.4)	1.00
Rechazo agudo	24 (19.7)	18 (25.0)	0.46

VNR = donador vivo no relacionado, DVR = donador vivo relacionado, CyA = ciclosporina, AZA = azatioprina, MMF = micofenolato de mofetilo, RAPA = rapamicina.

pacientes negativos a todo tipo de anticuerpos estudiados (n=124) *versus* los que conformaban el grupo en quienes al menos un anticuerpo fue detectado (n=72); fue documentada una supervivencia significativamente inferior para el grupo positivo a anticuerpos ( $p=0.046$ ).

De los seis pacientes que perdieron el injerto pertenecientes al grupo de anticuerpos positivos, dos tenían anticuerpos anti-MICA y otro solamente anticuerpos anti-HLA clase II; los tres restantes tuvieron una combinación de anticuerpos: uno, anti-MICA+anti-HLA clase I; uno, anti-MICA+anti-HLA clase II; uno, anti-HLA clase I+anti-HLA clase II.

Decidimos analizar la supervivencia del injerto en pacientes con o sin anticuerpos anti-HLA sin excluir la presencia de anticuerpos anti-MICA. Como se muestra en la figura 2, la

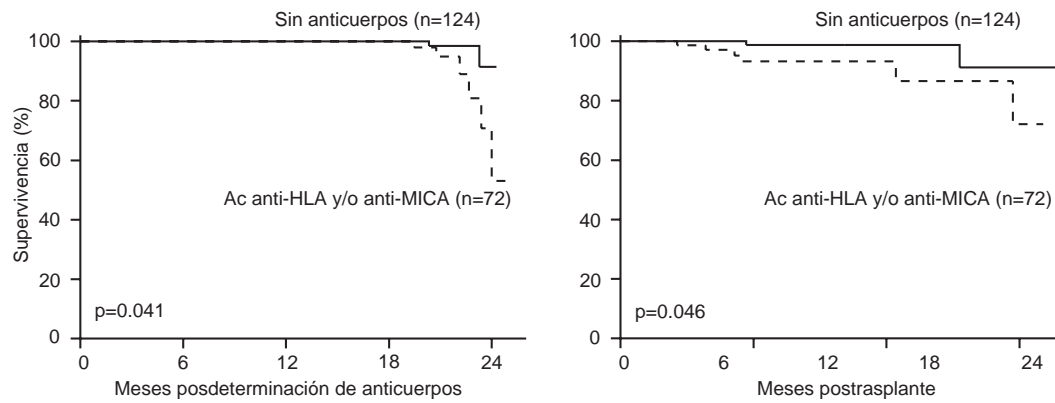
supervivencia del injerto tendió a disminuir en el grupo con anticuerpos anti-HLA, sin que se estableciera una diferencia significativa ( $p=0.097$ ). No se encontraron diferencias entre pacientes anti-HLA negativos, con solo anticuerpos anti-HLA clase I, clase II o con ambos (clase I y clase II). De manera similar, cuando analizamos el grupo con o sin anticuerpos anti-MICA sin excluir la presencia de anticuerpos anti-HLA, observamos tendencia a disminución en la supervivencia del injerto en el grupo que tenía anticuerpos anti-MICA,  $p=0.058$  (figura 3).

El impacto, independiente en la supervivencia del injerto, de la presencia de anticuerpos anti-HLA, anti-MICA y de la coexistencia de estos anticuerpos (anti-HLA y anti-MICA) se muestra en la figura 4. Una diferencia significativa en la

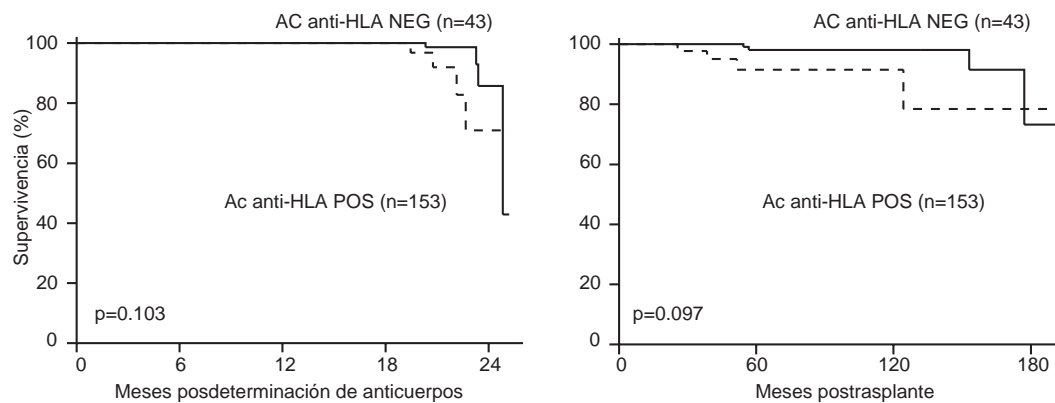
**Cuadro II. Función del injerto de acuerdo al tipo de anticuerpo**

	Negativos (n= 124)	Ac anti-HLA (n= 34)	Ac anti-MICA (n= 29)	Ac anti-HLA + Ac anti-MICA (n= 9)	p
CrS basal(3 meses)	1.34 ± 0.41	1.23 ± 0.31	1.47 ± 0.68	1.31 ± 0.28	0.57
CrS a la evaluación de Ac	1.45 ± 0.64	1.41 ± 0.60	1.60 ± 0.91	1.84 ± 1.44	0.84
CrS última visita	1.48 ± 0.74	1.51 ± 0.99	1.65 ± 1.22	2.30 ± 1.70	0.33
Δ CrS (última vs. Basal)	0.14 ± 0.58	0.28 ± 0.96	0.19 ± 0.85	0.99 ± 1.75	0.27
Δ CrS (última vs. evaluación de Ac)	0.03 ± 0.36	0.10 ± 0.55	0.05 ± 0.50	0.46 ± 1.2 8	0.55
TFGe basal (3 meses)	63.41 ± 18.38	71.06 ± 26.07	58.23 ± 20.13	67.05 ± 19.14	0.081
TFGe a la evaluación de Ac	57.32 ± 19.15	60.27 ± 22.86	53.52 ± 22.35	54.11 ± 26.66	0.60
TFGe última visita	56.60 ± 21.55	59.96 ± 25.20	52.99 ± 27.10	45.88 ± 28.63	0.36
Δ TFGe (última visita vs. basal)	- 6.80 ± 16.1	-11.10 ± 18.07	- 5.7 ± 14.4	-21.2 ± 22.7	0.11
Δ TFGe (última visita vs. evaluación de Ac)	- 0.71 ± 14.5	- 0.31 ± 11.15	- 0.53 ± 17.4	- 8.2 ± 13.5	0.27

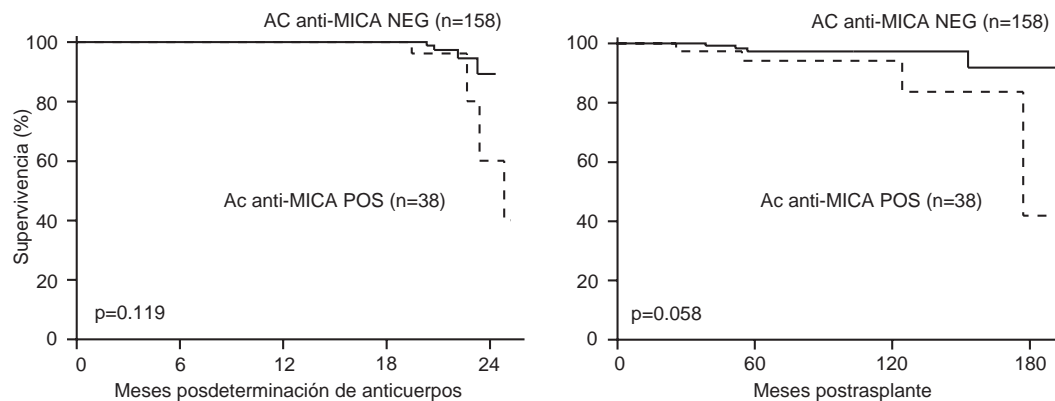
Ac = anticuerpos, CrS = creatina sérica, TFG = tasa de filtración glomerular estimada por la fórmula MDRD.



**Figura 1.** Supervivencia del injerto acorde a la determinación de anticuerpos. El grupo positivo incluye a los pacientes con anticuerpos anti-HLA o anticuerpos anti-MICA. A) Resultados a partir del momento de la toma de la muestra para determinación de anticuerpos. B) Resultados a partir de la fecha del trasplante.



**Figura 2.** Supervivencia del injerto acorde a la presencia de anticuerpos anti-HLA.

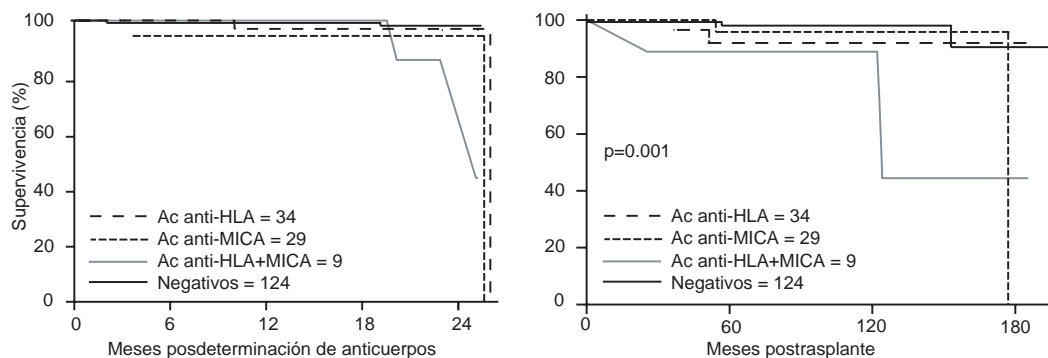


**Figura 3.** Supervivencia del injerto acorde a la presencia de anticuerpos anti-MICA.

supervivencia del injerto ocurrió para el grupo que mostró coexistencia de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA comparado con el grupo negativo a anticuerpos ( $p=0.001$ ) y no se observaron diferencias significativas cuando existían exclusivamen-

te anticuerpos anti-HLA ( $p=0.19$ ) o anticuerpos anti-MICA ( $p=0.12$ ), comparados con el grupo negativo a anticuerpos.

Debido a que no todos los pacientes de este estudio contaban con biopsias del injerto a tiempos de evolución



**Figura 4.** Supervivencia del injerto acorde al tipo de anticuerpos;  $p=0.001$  para anticuerpos anti-HLA+anti-MICA versus negativos. No hubo diferencia entre los otros grupos.

semejante postrasplante, optamos por no analizar si se establecía algún tipo de asociación entre la intensidad o tipo de daño histológico y la presencia o no de anticuerpos. Seguramente este factor hubiera creado un sesgo de interpretación.

Durante el periodo de seguimiento tras la evaluación de anticuerpos, dos pacientes fallecieron, ambos con injerto funcional, debido a infarto agudo del miocardio y a neumonía de focos múltiples adquirida en la comunidad, respectivamente. Uno fue negativo a todo tipo de anticuerpos y el otro correspondía al grupo de pacientes con anticuerpos anti-HLA clase I y clase II.

## Discusión

Cuando se determinó de manera transversal la existencia de anticuerpos anti-HLA en el grupo de pacientes referidos en esta serie, encontramos que la presencia de estos anticuerpos no mostraba asociación negativa con la función de los injertos renales en el momento de la evaluación. No fue posible precisar si se trataba de anticuerpos anti-HLA existentes pretrasplante o desarrollados postrasplante, debido a la inexistencia de determinaciones previas.<sup>15</sup>

El estudio de anticuerpos anti-MICA en el suero de estos pacientes, adicional al de anticuerpos anti-HLA, amplió las posibilidades del análisis para evaluar su posible efecto en la evolución de los injertos a dos años de su determinación. La prevalencia obtenida de anticuerpos anti-HLA de 21.9% es similar a la encontrada en estudios previos,<sup>16</sup> y la correspondiente a anticuerpos anti-MICA de 19.4% resultó inferior a la informada por otros autores, quienes por la naturaleza de sus estudios pudieron evaluar la frecuencia acumulada de estos anticuerpos.<sup>9,10</sup>

Actualmente, el seguimiento del grupo de nuestros pacientes ha permitido documentar que la existencia de estos anticuerpos circulantes se asoció a mayor pérdida de injertos renales. En forma global, el porcentaje de pacientes que han perdido el injerto a una mediana de seguimiento de 20.5 meses tras la evaluación de anticuerpos es de 4.1%. Conforme a lo expresado, el grupo de pacientes con al menos uno

de los anticuerpos determinados comparados con los que no tenían anticuerpo alguno, resultaba en una diferencia significativa en la supervivencia del injerto ( $p=0.046$ ). Sin embargo, la evaluación independiente del impacto representado por la sola existencia de anticuerpos anti-HLA, anti-MICA o por la presencia de ambos, evidencian que hasta el momento el impacto real lo estableció poseer la combinación de anticuerpos circulantes anti-HLA+anti-MICA ( $p=0.001$ ). Datos recientemente publicados, producto de un estudio prospectivo,<sup>10</sup> señalan que anticuerpos anti-HLA se encontraron en 72% de los pacientes que eventualmente perdieron su injerto comparados con 46% con injertos funcionales ( $p<0.05$ ). El porcentaje de los que perdieron el injerto se incrementó a 77% cuando se analizó a los que tenían anticuerpos anti-HLA+anti-MICA ( $p<0.01$ ). Por otra parte, información muy reciente procedente de 1910 receptores de trasplante renal muestran de manera contundente que en los sujetos con buena compatibilidad HLA, la sensibilización a MICA estuvo asociada de manera independiente con una supervivencia inferior del injerto ( $83.2\pm 5.8\%$  entre los que tenían anticuerpos anti-MICA versus  $95.1\pm 1.3\%$  entre aquellos sin estos anticuerpos,  $p=0.002$ ).<sup>17</sup>

El motivo por el cual en este estudio no se observó asociación entre la presencia aislada de anticuerpos anti-HLA o anti-MICA y la pérdida de injerto podría sugerir que se requiere mayor tiempo de evolución para documentar su influencia en la reducción de la supervivencia de éstos; ciertamente, el factor tiempo en la pérdida del injerto asociada a anticuerpos anti-HLA *de novo* postrasplante fue evaluado en un estudio con determinaciones anuales a lo largo de ocho años, en éste la detección de anticuerpos pudo anteceder por años la pérdida del injerto.<sup>18</sup> Abundando en este aspecto, el seguimiento a dos años tras la determinación de anticuerpos anti-HLA en receptores de trasplante renal que tenían por lo menos seis meses de evolución postrasplante, mostró incremento sustancial de la falla de injerto a 15.1% en los que tenían anticuerpos comparados a 6.8% en el grupo de pacientes que no los tenían, porcentajes que duplicaron las cifras encontradas en el mismo estudio un año antes. Estos datos, que proceden de una investigación colaborativa en más de 2 mil pacientes, definen que la

detección de anticuerpos anti-HLA postrasplante conlleva un incremento sustancial en el riesgo de pérdida de injerto subsiguiente conforme el tiempo avanza.<sup>19</sup>

Por otra parte, el presente estudio no pretendía buscar anticuerpos anti-HLA o anti-MICA específicos *versus* inespecíficos. En esta forma, el suero fue analizado para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-HLA clase I o clase II y anti-MICA. No establecimos si los anticuerpos anti-HLA o anti-MICA existían pretrasplante o si aparecieron postrasplante. Independientemente, existen significativamente más pérdidas de injertos en pacientes con anticuerpos anti-HLA y anti-MICA a dos años de su detección. Este hallazgo ocurrió en ausencia de otros factores asociados a este fenómeno. Ciertamente no fue posible relacionar la detección de anticuerpos anti-HLA o anti-MICA con ninguno de los eventos sensibilizantes conocidos, por ejemplo, transfusiones sanguíneas previas, embarazos y episodios de rechazo agudo.

Aun cuando no se observaron diferencias significativas en la función del injerto entre los diferentes grupos con anticuerpos y los que no tenían anticuerpos, es evidente que los del grupo conformado por pacientes con anticuerpos anti-HLA+anti-MICA mostraban mayor cifra de creatinina sérica en la última visita y una delta de tasa de filtración glomerular que traduce mayor pérdida funcional del injerto. Sería posible formular que el daño dual producido por estos anticuerpos (HLA+MICA) contra antígenos que se expresan en las células del endotelio vascular del injerto condujera a deterioro crónico del mismo más evidente y posiblemente en menor tiempo que el derivado de la acción de anticuerpos anti-HLA o anti-MICA de manera individual. En el estudio colaborativo previamente citado se evaluó la relación entre el valor de creatinina sérica al momento de evaluación de anticuerpos y la pérdida de injerto dos años después; se documentó mayor proporción de pérdidas de injertos en los que teniendo anticuerpos anti-HLA tenían cifras de creatinina sérica entre 2 y 3.4 mg/dl, independientemente del tiempo transcurrido desde el trasplante a la evaluación de anticuerpos.<sup>19</sup> Basados en esos datos y en la función renal actual de los pacientes que integran el subgrupo con anticuerpos anti-HLA+anti-MICA de este estudio, es factible suponer que tendrán una menor supervivencia del injerto comparados con el resto.

La secuencia de eventos que ha sido propuesta para explicar el daño a ultranza que ocurre en el injerto señala que la fijación de anticuerpos al endotelio produce un ciclo de daño y reparación, con proliferación de células endoteliales y de músculo liso, resultando en engrosamiento de la íntima. Este proceso contribuye como factor inmunológico a un peor resultado a largo plazo, ejemplificado por el patrón histológico de arterioesclerosis del trasplante.<sup>14,20</sup>

Es también conocido que los anticuerpos anti-HLA y posiblemente otros producidos *de novo* postrasplante, pueden estar presentes por años en forma indolente antes de condicionar pérdida del injerto.<sup>18</sup> Una fracción importante de receptores de injerto renal desarrollará anticuerpos donador específico en la etapa postrasplante. Worthington y colaboradores encontraron que 25% de 235 receptores de trasplante renal desarrolló anticuerpos anti-HLA donador específico a un tiempo promedio de 1582 días postrasplante; el impacto

de estos anticuerpos donador específico fue evidente al observar que 52% de 112 pacientes del estudio que tuvieron falla del injerto había desarrollado estos anticuerpos, comparado con solamente 1.6% de 123 pacientes con injerto funcional; el tiempo promedio desde la detección de anticuerpos donador específico a la pérdida del injerto fue de 1409 días.<sup>21</sup> Este documento plantea dos aspectos de inusitada relevancia: establece y reitera la necesidad de efectuar un seguimiento prospectivo postrasplante que permita identificar a los pacientes que desarrollan anticuerpos HLA donador específico, quienes serían candidatos a la utilización de agentes inmunomoduladores para regular a la baja la producción de anticuerpos anti-HLA; demuestra también que existe una brecha temporal entre la detección de estos anticuerpos y la pérdida del injerto, que permitiría efectuar la mencionada intervención inmunomoduladora, mitigando posiblemente el curso del daño inmunológico crónico que conduciría a reducción en la supervivencia del injerto.

Como maniobra inmunomoduladora al detectar anticuerpos anti-HLA postrasplante, hay algunos datos que indican que la combinación de tacrolimus y mofetil micofenolato suprime efectivamente la producción de anticuerpos antidonador a corto y largo plazo en receptores con disfunción aguda o tardía del injerto mediado por aloanticuerpos.<sup>22,23</sup> Aún no hay estudios prospectivos para evaluar si esta combinación farmacológica u otra, incluyendo tacrolimus o ciclosporina con sirolimus o everolimus, resultará más efectiva para este propósito. También será necesario investigar el efecto de depletar las células B a través de anticuerpos monoclonales anti-CD20 y a través de las propiedades inmunomoduladoras de IVIG para una terapia "anticipada" en pacientes que producen anticuerpos anti-HLA postrasplante, mucho antes que ocurran lesiones glomerulares a través de mecanismos inmunológicos. Como propusieran Akalin y Pascual,<sup>24</sup> un seguimiento de receptores de trasplante renal que incluya monitorización secuencial de anticuerpos anti-HLA *de novo* —con métodos sensibles y específicos— junto con biopsias seriadas protocolizadas, contribuirán a identificar las diferencias entre desarrollo temprano y tardío de anticuerpos anti-HLA sobre la patología del injerto. La información así generada adicional al estudio de los eventos secuenciales a nivel de la célula endotelial, probablemente permitirá un mejor entendimiento del fenómeno de acomodamiento,<sup>25,26</sup> y determinar en qué condiciones de este escenario ocurre este fenómeno.

Finalmente, los hallazgos aquí presentados apoyan la noción de que el estudio secuencial de anticuerpos anti-MICA en adición a anticuerpos anti-HLA en el seguimiento de receptores de trasplante renal puede delinear mejor a los pacientes con mayor riesgo de pérdida del injerto. Esta observación, sin embargo, requiere confirmación en un estudio prospectivo de gran escala.

## Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con recursos del proyecto Salud 2004 CO1-030/A1 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

## Referencias

1. Jeannet M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med* 1970;282:111-117.
2. Terasaki PI, Kreisler M, Mickey RM. Presensitization and kidney transplant failures. *Postgrad Med J* 1971;47:89-100.
3. Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation* 1990;49:85-91.
4. Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, Lassman C, Wilkinson AH, Kendrick E, et al. Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. *Transplantation* 2005;79:591-598.
5. Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, et al. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2807-2814.
6. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Beretz A, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early graft loss. *Kidney Int* 1993;43:1333-1338.
7. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: incidence, serology, and clinical characteristics. *Transplantation* 2001;71:652-658.
8. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 2000;69:319-326.
9. Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, Soderstrom K. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2002;74:268-277.
10. Mizutani K, Terasaki P, Rosen A, Esquenazi V, Miller J, Shih RN, et al. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant* 2005;5:2265-2272.
11. Alberú J, Dib-Kuri A. Inmunología de los trasplantes. En: Aguirre-Rivero R, de la Garza-Villaseñor L, editores. *Tratado de cirugía general*. México: El Manual Moderno/Consejo Mexicano de Cirugía General; 2003. pp. 1315-1325.
12. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6259-6263.
13. Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, Zou Y, Stastny P. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Human Immunol* 2000;61:917-924.
14. Reed EF. Signal transduction via MHC molecules in endothelial and smooth muscle cells. *Crit Rev Immunol* 2003;23:109-128.
15. Morales-Buenrostro LE, Buzo-Romero JM, de Leo C, López M, Ortiz-Arroyo VM, Pérez-Garrido J, et al. Prevalence of HLA antibodies and its impact on graft function in a group of kidney transplant recipients: a cross-sectional study. *Transplant Proc* 2006;38:899-902.
16. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2003;4:438-443.
17. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med* 2007;357:1293-1300.
18. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, et al. All chronic rejection failures of kidney transplant were preceded by development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002;74:1192-1194.
19. Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation* 2005;80:1194-1197.
20. Harris PE, Bian H, Reed EF. Induction of high affinity fibroblast growth factor receptor expression and proliferation in human endothelial cells by anti-HLA antibodies: a possible mechanism for transplant atherosclerosis. *J Immunology* 1997;159:5697-5704.
21. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RWG. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 2003;75:1034-1040.
22. Pascual M, Saidman S, Tolkoff-Rubin N, William WW, Mauiyyedi S, Duan JM, et al. Plasma exchange and tacrolimus-mycophenolate rescue for acute humoral rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 1998;66:1460-1464.
23. Theruvath TP, Saidman SL, Mauiyyedi S, Delmonico FL, Williams WW, Tolkoff-Rubin N, et al. Control of antidonor antibody production with tacrolimus and mycophenolate mofetil in renal allograft recipients with chronic rejection. *Transplantation* 2001;72:77-83.
24. Akalin E, Pascual M. Sensitization after kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:433-440.
25. Salama AD, Delikouras A, Pusey CD, Cook HT, Bhargal G, Lechler RI, et al. Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. *Am J Transplant* 2001;1:260-269.
26. Williams JM, Holzkecht ZE, Plummer TB, Lin SS, Brunn GJ, Platt JL. Acute vascular rejection and accommodation: divergent outcomes of the humoral response to organ transplantation. *Transplantation* 2004;78:1471-1478.