



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
Departamento de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

**La inflamación subclínica del
injerto como modulador de la
evolución del trasplante renal:
repercusión a nivel inmunológico,
histológico y sistémico.**

Clara García Carro

Barcelona 2019

Tesis doctoral
Departamento de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

La inflamación subclínica del injerto
como modulador de la evolución del
trasplante renal: repercusión a nivel
inmunológico, histológico y
sistémico.

Doctoranda: Clara García Carro

Directores: Daniel Serón Micas, Francesc Moreso Mateos

Tutor: Vicent Fonollosa Pla

2019

A mis padres,

AGRADECIMIENTOS

A Daniel Serón, mucho más que un director de tesis. Gracias por la confianza depositada en mí, por empujarme a hacerme preguntas y por despertar en mí la curiosidad investigadora. Gracias por tu disponibilidad, siempre con una sonrisa, y por tu cercanía. Gracias por enseñarme el camino y darme herramientas para recorrerlo sola. Eres un ejemplo a seguir, gracias por creer en mí.

A Francesc Moreso, por contagiar su pasión por el trasplante renal.

Al equipo de Nefrología del hospital Vall d'Hebron, gracias por haberme enseñado a ser médico, nefróloga e investigadora. Gracias por vuestro entusiasmo y por vuestra calidez. Recorrer el pasillo de la sexta anexos es entrar en casa. Gracias a mis compañeras de despacho estos últimos años, por la ayuda y por la risa. Gracias a Juliana y a Karla, mis residentes pequeñas, por haberme enseñado mucho más que yo a vosotras.

A Hallvard Holdaas, Christina Dörje y todo el grupo de trasplante renal de Oslo Rikshospitalet, por haberme permitido formar parte de vuestro equipo, por la generosidad y la humanidad. Gracias por vuestra gran aportación a este trabajo, sin vosotros no habría sido posible.

A los pacientes, porque ellos son la fuente de las preguntas. Gracias por motivarme cada día para seguir aprendiendo. Gracias por hacer de esta profesión la más bonita del mundo.

A mis amigos, los antiguos y las nuevas incorporaciones, porque sin vosotros el camino habría sido mucho menos divertido. Gracias por apoyarme ya en aquellas *longas noites de pedra* en Santiago y por seguir aquí, incondicionales. Gracias por tanto.

A mi familia, mis padres y Germán, sois mi pilar y mi cable a tierra. Me sobran los motivos para daros las gracias.

ABREVIATURAS

IRC: insuficiencia renal crónica

HLA: human leukocyte antigens

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

IL: interleukina

PRA: panel reactive antibodies

ERA-EDTA: European Renal Association – European Dialysis and Transplantation Association

PPM: pacientes por millón de habitantes

TSR: tratamiento sustitutivo renal

IFTA: fibrosis intersticial y atrofia tubular

i-IFTA: inflamación en zonas con IFTA

DSA: donor specific antibodies (anticuerpos donante-específicos)

CAN: nefropatía crónica del injerto

eFG: filtrado glomerular estimado

MMF: micofenolato de mofetil

CsA: ciclosporina A

imTOR: inhibidores de mTOR (mammalian target of rapamycin)

SCR: rechazo subclínico celular

CNI: anticalcineurínicos

PA: presión arterial

PAS: presión arterial sistólica

PCR: proteína C reactiva

IMC: índice de masa corporal

MFI: intensidad de fluorescencia media (mean fluorescence intensity)

OR: Odds ratio

ÍNDICE

1. Resumen.....	11
2. Introducción.....	16
2.1. Biopsia renal: historia, indicaciones, técnica y complicaciones.....	17
2.2. Trasplante renal.....	19
2.2.1. Generalidades e historia.....	19
2.2.2. Situación actual y retos de futuro.....	21
2.3. Biopsia del injerto renal.....	27
2.3.1. Generalidades.....	27
2.3.2. Diagnósticos histológicos.....	28
2.4. Biopsia de protocolo: monitorización histológica del injerto renal...31	
2.4.1. Cambios crónicos: fibrosis intersticial y atrofia tubular.....	32
2.4.2. Cambios agudos: inflamación túbulo-intersticial y rechazo celular.....	34
2.5. Rechazo mediado por anticuerpos.....	40
2.6. Relación entre inflamación, DSA <i>de novo</i> y rechazo humoral.....	42
2.7. Inflamación local en el injerto y repercusión sistémica.....	44

3. Hipótesis.....	47
4. Objetivos.....	49
5. Material y métodos.....	51
6. Artículos publicados.....	58
6.1. <i>Inflammation in early kidney allograft surveillance biopsies with and without associated tubulo-interstitial chronic damage as a predictor of fibrosis progression and development of de novo donor specific antibodies.....</i>	59
6.2. <i>Kidney allograft subclinical rejection modulates systemic inflammation measured by C-reactive protein at 1 year after transplantation.....</i>	65
7. Resultados globales y discusión.....	72
8. Conclusiones.....	84
9. Líneas de investigación de futuro.....	86
10. Bibliografía.....	89

1. RESUMEN

El trasplante renal es el tratamiento de elección de la ERC terminal. En las últimas décadas, ha mejorado de manera notable la supervivencia del paciente y del injerto a corto y medio plazo. Sin embargo, a los 10 años del trasplante, el 25-35% presenta disfunción del órgano, requiriendo tratamiento dialítico. Además, aproximadamente el 30% de los pacientes trasplantados que mueren con injerto funcionando lo hace por causa cardiovascular. Los datos son similares entre los diferentes registros y series.

La hipótesis de este trabajo es que la inflamación subclínica temprana del injerto puede contribuir a la disfunción crónica del mismo y al incremento de la inflamación sistémica y, por tanto, del riesgo cardiovascular. El objetivo de esta tesis es evaluar si la inflamación subclínica del injerto renal durante el primer año post-trasplante modula la progresión de la fibrosis en el propio injerto, se relaciona con el desarrollo de DSA de novo y tiene repercusión en la inflamación sistémica medida mediante la proteína C reactiva sérica.

Para ello, se estudió una cohorte de pacientes con riesgo inmunológico estándar trasplantados renales en Oslo University Hospital Rikshospitalet entre 2009 y 2012, con biopsias de protocolo a las seis semanas y al año del trasplante. En un primer trabajo, se evaluó la relación existente entre la inflamación subclínica a las seis semanas del trasplante y la progresión de la fibrosis al año. También se analizó la relación entre la inflamación subclínica a las seis semanas y el desarrollo de DSA de novo al año del trasplante. Se objetivó que la inflamación temprana asociada a cambios crónicos (IFTA), junto a los episodios de rechazo agudo, es un predictor independiente de la progresión de la fibrosis al año del trasplante. También se observó que la inflamación temprana, aislada o asociada a cambios crónicos, se relaciona con un aumento del riesgo de desarrollar DSA de novo al año del trasplante. En un segundo trabajo, se incluyeron pacientes de esta cohorte en situación clínica estable y que dispusieran de una determinación de proteína C reactiva sérica en el momento de la biopsia

a los 12 meses del trasplante. Los pacientes se agruparon en cuartiles en función de los niveles de proteína C reactiva. Las biopsias se clasificaron de acuerdo a la inflamación en el túbulo-intersticio como “normal”, “borderline” y “rechazo subclínico”. La presencia de rechazo subclínico en la biopsia resultó un predictor independiente de pertenecer al grupo con proteína C reactiva elevada, además del IMC y el presentar una infección del tracto urinario los días previos a la biopsia.

En conclusión, en esta tesis doctoral se pone de manifiesto que la inflamación subclínica temprana no es una lesión anodina y que se relaciona directamente con la progresión de la fibrosis y con el desarrollo de DSA, siendo probablemente uno de los múltiples responsables de la disfunción del injerto a largo plazo. Además, la inflamación subclínica es un predictor independiente de la elevación en los niveles séricos de proteína C reactiva, reflejo del estado de inflamación sistémica y, por tanto, en probable relación con el incremento del riesgo cardiovascular en la población trasplantada renal.

Kidney transplantation is the treatment of choice for end-stage CKD. In the last decades, graft and patient survival have dramatically improved. However, at 10 years after transplantation, 25-35% of patients present graft failures and the necessity of renal replacement therapy. In addition to this, 30% of patients dying with a functioning graft die from a cardiovascular cause. These data are consistent between different series and registries.

Our hypothesis is that early allograft subclinical inflammation can contribute to chronic graft dysfunction and promote systemic inflammation, what could be linked to the high cardiovascular risk in this population. The aim of this study is to evaluate whether allograft subclinical inflammation during the first year after transplantation modulates the progression of fibrosis, is related to the development of *de novo* DSA and to systemic inflammation as measured by C reactive protein.

Patients with standard immunological risk receiving a single kidney transplantation at Oslo University Hospital Rikshospitalet between 2009 and 2012, with a surveillance graft biopsy at six weeks and at one year after transplantation, were studied. In a first study, the association between subclinical inflammation at six weeks and the progression of fibrosis at one year was evaluated. We also analyzed the association between early inflammation and *de novo* DSA at one year after transplantation. Early subclinical inflammation, when associated with chronic changes –IFTA-, together with clinical episodes of acute rejection, was an independent predictor of the progression of fibrosis at one year after transplantation. Early inflammation, alone or associated with chronic changes, was associated to an increased risk of development of *de novo* DSA at one year after transplantation. A second study was performed including patients with a stable clinical situation and a C-reactive protein determination at the time of one year biopsy. Patients were grouped into quartiles according to C reactive protein levels. One year biopsies were classified according to tubule-interstitial inflammation as normal, borderline or subclinical rejection. The diagnosis

of subclinical rejection was an independent predictor of increased C-reactive protein levels at one year after transplantation, together with BMI and the presence of an urinary tract infection some days before the biopsy.

In conclusión, this thesis shows that early subclinical inflammation is a significant lesion. It is directly associated with the progression of fibrosis and with the development of *de novo* DSA, being probably one of the causes of elevation of C-reactive protein levels, marker of systemic inflammation and, therefore, probably associated with the high cardiovascular risk in this population.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Biopsia renal: historia, indicaciones, técnica y complicaciones.

La palabra biopsia deriva del griego bio (vida) y opsia (observar) y significa, literalmente, visión de la vida. La biopsia renal es el *gold standard* para el diagnóstico de las enfermedades parenquimatosas renales(1). Además, es una herramienta irremplazable para establecer el pronóstico y tratamiento de la mayor parte de nefropatías glomerulares, vasculares y del túbulo-intersticio (2).

La primera biopsia renal reportada se llevó a cabo en 1901 mediante cirugía abierta. La primera serie de biopsias renales la realizó en 1944 Nils Alwall, nefrólogo sueco conocido por ser el creador de la hemodiálisis (3). Como herramienta para obtener la muestra de tejido renal, utilizó una aguja de aspiración adaptada de la biopsia hepática. Localizó el riñón derecho de los pacientes mediante radiografía simple y la punción se realizó con el paciente en sedestación. Obtuvo material viable para estudio histológico en diez de los trece pacientes sometidos al procedimiento.

El primer protocolo para la realización de biopsias de riñón nativo fue publicado en 1951 por Iversen y Brun (4). Al contrario que Alwall, localizaban el riñón derecho por pielografía intravenosa. Obtuvieron muestras adecuadas para estudio únicamente en el 53% de los pacientes sometidos a la técnica. Fue Kark quien introdujo en 1954 la posición de decúbito prono para la realización de la biopsia renal, así como la utilización de una nueva aguja, minimizando los riesgos y obteniendo muestras adecuadas en el 96% de los pacientes (5).

En la década de los sesenta se introdujeron las técnicas de imagen en tiempo real para la punción renal y a partir de 1980 se popularizó la biopsia guiada por ecografía. Este hecho, sumado al auge de la radiología intervencionista en las últimas décadas, ha llevado a que la biopsia renal en la actualidad sea realizada por radiólogos y no por nefrólogos en una gran mayoría de hospitales (6).

En la actualidad, la biopsia renal percutánea se lleva a cabo generalmente bajo anestesia local y mediante dispositivos de punción automáticos y desechables, de resorte, que usan agujas de calibre 14, 16 ó 18 G (7). Es conveniente extraer al menos dos cilindros renales y no se recomienda extraer más de cuatro. El material ha de ser procesado de manera inmediata en Anatomía Patológica identificándose si es suficiente (idealmente más de 10 glomérulos por cilindro) (8). Asimismo, se ha de seleccionar material para estudio mediante microscopía óptica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica (9).

Las indicaciones para la realización de una biopsia renal pueden variar en función del médico tratante, experiencia del centro, medios económicos y tendencia del área geográfica. En Australia se practica una política muy liberal a la hora de realizar esta prueba y cuenta con una ratio de 21.5 biopsias por 100000 habitantes por año en la década de los noventa. En Italia, sin embargo, la política es mucho más restrictiva, siendo esta ratio de 3.3 biopsias por 100000 habitantes por año en la misma época (10). En general, las indicaciones universalmente aceptadas son (6,11): síndrome nefrótico, proteinuria mayor a 1gr/día sin causa conocida, síndrome nefrítico, hematuria de presunta causa glomerular, fracaso renal agudo tras haberse descartado la causa pre y post renal, enfermedad sistémica con evidencia de afectación renal salvo en la diabetes mellitus (discutible), ERC de causa no filiada e inexplicable por la historia del paciente.

En cualquier caso, a la hora de realizar una biopsia renal siempre se ha de tener en cuenta el equilibrio entre el beneficio que aporta en cuanto a diagnóstico, pronóstico y tratamiento y el riesgo de complicaciones. Las complicaciones más comunes en nuestro medio son (1,9): sangrado en diferentes grados (desde hemorragia grave que puede comprometer la vida a macrohematuria autolimitada), dolor en la zona de punción, hematoma, fístula arterio-venosa, hipertensión arterial secundaria a

riñón de Page por sangrado intracapsular, infección, punción accidental de otro órgano o estructura.

En conclusión, la biopsia renal es un procedimiento indispensable, rentable y seguro en el estudio de las enfermedades renales que se ha de realizar mediante la técnica adecuada a pacientes con indicaciones para la misma a fin de evitar riesgos y complicaciones.

2.2. Trasplante renal

2.2.1. Generalidades e historia

La insuficiencia renal crónica terminal fue una causa de mortalidad no despreciable hasta el desarrollo de las técnicas de hemodiálisis en la segunda-tercera década del siglo XX. La incidencia actual de la IRC estadio 5 varía según las zonas geográficas, pero se estima de entorno al 8-16% (12). Si bien las técnicas de diálisis han experimentado un gran desarrollo en las últimas décadas, aumentando en gran medida la supervivencia de pacientes afectados de esta patología, estos tratamientos aproximan la función depurativa del riñón, pero no ejercen sus funciones metabólicas o endocrinas.

El trasplante renal es el tratamiento sustitutivo de elección en la mayor parte de los pacientes con enfermedad renal estadio 5 (13). Mejora la calidad de vida de los pacientes al permitir prescindir de la diálisis y aumenta su supervivencia con respecto a el tratamiento dialítico (14). En este estudio realizado en USA en el que se incluyeron más de 40000 pacientes, la mortalidad a 3 años fue un 68% más baja en los pacientes que recibieron un trasplante renal. El mayor beneficio en términos de mortalidad se observó en pacientes de entre 20 y 39 años en el momento de la inclusión en la lista de espera, así como en los pacientes con diabetes mellitus.

Comparado con la diálisis, resulta además un tratamiento más económico (15,16). La aplicabilidad de este tratamiento viene limitada por las características del receptor y la disponibilidad de órganos.

La historia del trasplante renal se remonta a inicios del siglo XX, cuando el 1902 Von de Castello realiza el primer trasplante entre perros. Posteriormente, en 1906, Jaboluay realizó el primer xenotrasplante a un humano: implantó un riñón de un cerdo a una paciente, anastomosándolo a la arteria humeral. Funcionó durante una hora. Un salto importante se produjo a partir de 1912, cuando Carrel perfeccionó las suturas vasculares, hecho por el que le fue concedido el premio Nobel de Medicina en 1912 (17).

En 1933, el soviético Voronoy realizó el primer trasplante de donante cadáver, que fracasó. En este caso, se trataba de un donante con grupo sanguíneo B y el receptor, 0. En 1946, Hufnagel, Hume y Landsteiner realizaron un trasplante de donante cadáver a una paciente con necrosis tubular aguda, que funcionó el tiempo suficiente para permitir la recuperación del riñón nativo de la enferma.

No fue hasta la década de los 50 cuando se llevaron a cabo los primeros trasplantes con suficiente éxito. El primero tuvo lugar en 1953 en París y se realizó a un paciente monorreno que sufrió un traumatismo en su único riñón. El injerto procedía de su madre y funcionó durante 22 días. En 1955, Murray realizó el primer trasplante entre gemelos univitelinos y el órgano funcionó durante 8 años (18).

En la década de los 60 se sentaron las bases de la inmunosupresión actual y se buscó someter al paciente a un estado de inmadurez inmunológica que permitiera anular la reactividad frente a los antígenos HLA del donante. Inicialmente se llevó a cabo mediante la irradiación linfática total, desestimada por la alta mortalidad entre los receptores. Bajo este procedimiento se llevaron a cabo, sin embargo, los primeros trasplantes renales exitosos entre pacientes no emparentados. También

en esta década se popularizó el uso del tipaje HLA y el crossmatch pre-trasplante.

El primer trasplante renal en España tuvo lugar en el Hospital Clínic de Barcelona en 1965, a manos del Dr Gil-Vernet. Pocos meses después, la Fundación Jiménez-Díaz de Madrid realizó el segundo trasplante renal con éxito.

2.2.2. Situación actual y retos de futuro

La ERA-EDTA elabora anualmente un informe en el que se recogen los datos de los diferentes estados europeos en cuanto a tratamiento sustitutivo renal. Compararemos los datos de Noruega, por basarse esta tesis en datos del país nórdico, con los de nuestro medio.

El informe que recoge los datos del año 2015 (23) registra una incidencia inicio de tratamiento sustitutivo renal que varía desde los 105 PPM en Noruega a los 125 PPM en España y los 162 PPM en Cataluña. En el grueso de Europa, en 2015, la técnica de TSR en los casos incidentes ha sido la hemodiálisis en el 85% de los casos y el trasplante renal únicamente en el 4% de los casos.

En cuanto a la prevalencia del TRS en 2015, en Noruega es de 969 PPM mientras que la de España es de 1145 y la de Cataluña de 1326 PPM. En el contaje general europeo, el 58% de los pacientes prevalentes realizan hemodiálisis, mientras que el 36% portan un injerto renal funcional. En Noruega, sin embargo, el 70.3% de los pacientes prevalentes bajo TSR son portadores de un injerto funcional según The Norwegian Renal Registry 2016 (24). En España el 52.5% de los pacientes bajo TSR portan un injerto renal funcional según datos del Registro de Enfermos Renales 2016 (25) y en Cataluña, el 54.1% según el Registre de malalts renals de Catalunya 2015 (26).

En el año 2015, la tasa de trasplante renal en Noruega es de 49 PPM, mientras que la de España es de 62 PPM y la de Cataluña 86 PPM, de las más altas de Europa según la ERA-EDTA.

En el mismo informe se recogen los datos globales europeos de supervivencia de paciente e injerto tras el primer trasplante renal a 5 años en la cohorte 2006-2010. La supervivencia a 5 años global de pacientes en TSR es del 51.1% mientras que la de los pacientes que reciben un primer injerto de donante cadáver es de 91.7% y de donante vivo de 94.5% también a 5 años. La supervivencia del injerto a 5 años si procede de donante cadáver es 80.7% y si procede de donante vivo es de 86.6%.

Figure A.5.1
Adjusted patient survival by modality:
Incident dialysis patients
from day 91, adjusted for age, gender, and primary renal disease

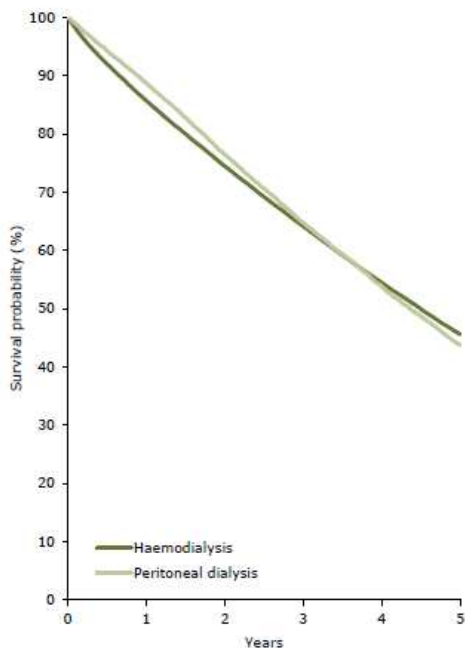


Figure A.5.2
Adjusted patient survival by donor type:
Patients receiving a first kidney transplant
from day of transplant, adjusted for age, gender, and primary renal disease

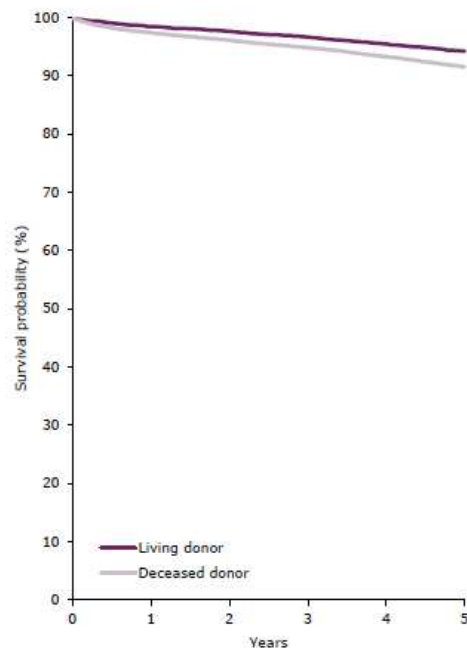


Figura 1. Supervivencia de pacientes en diálisis (incidentes, hemodiálisis y diálisis peritoneal) y de pacientes que reciben un primer injerto renal (donante vivo y cadáver) a 5 años (23).

La supervivencia del injerto renal en Noruega se resume en el siguiente gráfico. Varía entre el 50-70% a los 10 años del trasplante según el injerto proceda de donante cadáver o vivo emparentado (24).

Survival of first renal grafts By donor source. Norway 2000-2016

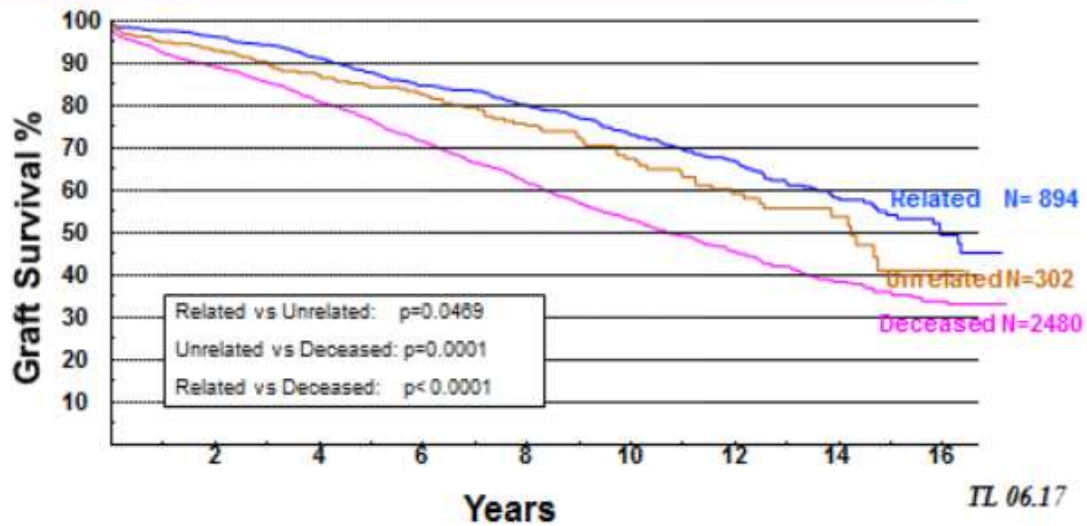


Figura 2. Supervivencia del injerto a 16 años según el tipo de donante (vivo emparentado, vivo no emparentado y cadáver) en pacientes portadores de un primer trasplante renal en Noruega.

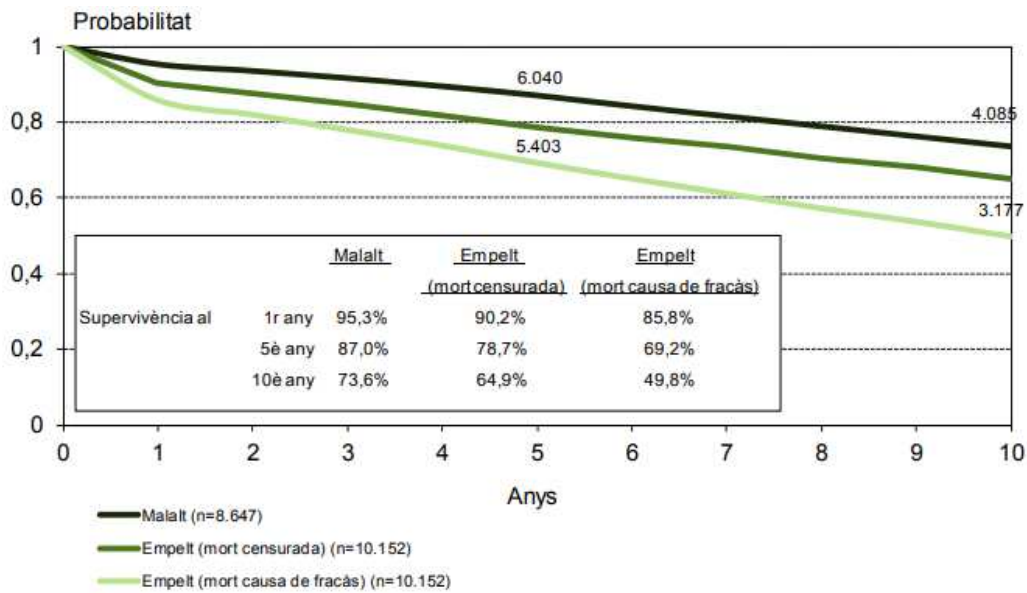


Figura 3. Supervivència del injerto y del paciente en portadores de un primer trasplante renal a diez años (26).

La supervivència del injerto a 5 y 10 años es muy similar entre Cataluña y Noruega: entorno al 80% a 5 años y entorno al 65% a 10 años.

La causa de la muerte en pacientes portadores de injerto renal en Noruega en la cohorte 2010-2016 es en el 37% cardiovascular, siendo también habitual la muerte de causa infecciosa y por neoplasias. Los datos en Cataluña son similares en el año 2015: el 36% de las muertes de pacientes trasplantados son de causa cardiovascular.

Cause of death in RRT

Pat.s dying 2000-2016, by final treatment

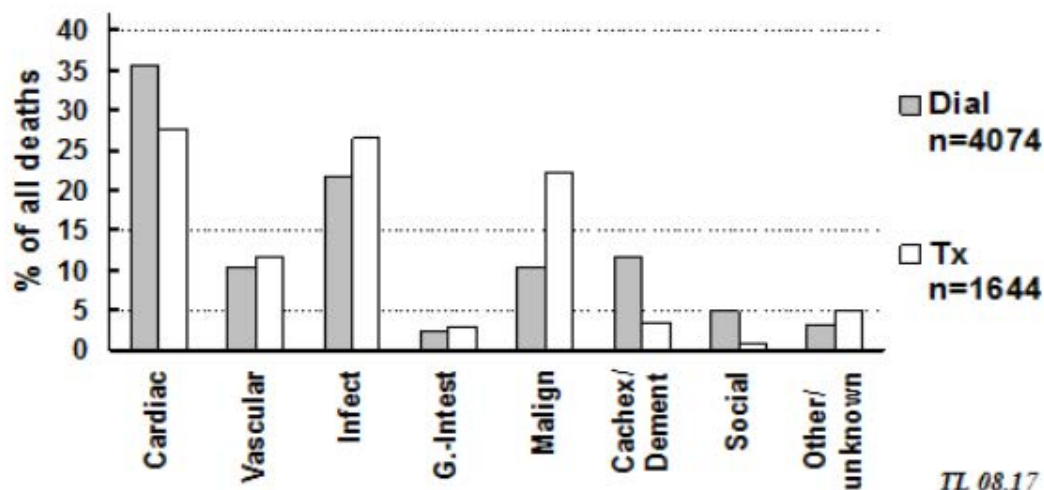


Figura 4. Causas de muerte en pacientes bajo TSR (diálisis y trasplante renal) en la cohorte 2010-2016 (24).

Taula 14. Distribució de les causes de mort. Any 2015
 Tabla 14. Distribución de las causas de muerte. Año 2015
 Table 14. Causes of death, 2015

	n	%
Desconegudes Desconocidas <i>Unknown</i>	83	9,4
Cardíacues Cardíacas <i>Cardiac</i>	200	22,7
Vasculares Vasculares <i>Vascular</i>	124	14,1
Infecioses Infecciosas <i>Infectious</i>	170	19,3
Hepàtiques Hepáticas <i>Hepatic</i>	6	0,7
Socials Sociales <i>Social</i>	116	13,2
Neoplàsies Neoplasias <i>Neoplasia</i>	94	10,7
Miscel·lània Miscelania <i>Miscellaneous</i>	89	10,1
Total	882	100

Distribución de las causas de muerte en el año 2015 en los pacientes portadores de un trasplante renal (26).

De esta manera, evaluando los datos europeos y locales, se objetivan tendencias globales que tienen que ver con la elevada supervivencia tanto del paciente como del injerto en el primer y primeros años post-

trasplante, que ha mejorado mucho en las últimas décadas, situándose alrededor del 90%. Sin embargo, se observa también que a los 10 años del trasplante no se logran superar tasas de supervivencia del injerto mayores del 65-75%. Hay, por tanto, un 25-35% de los pacientes trasplantados que a los 10 años han regresado a diálisis. Además, llama la atención que entorno al 35% de los pacientes trasplantados que mueren con injerto funcionando lo hacen por una causa cardíaca o vascular.

El avance en el conocimiento profundo del rechazo celular agudo y la inmunosupresión personalizada han sido los avances que han permitido aumentar en gran medida la supervivencia temprana del injerto (27). El rechazo mediado por anticuerpos es uno de los grandes problemas que actualmente dificultan el aumento de la supervivencia del trasplante y del paciente a largo plazo (28,29). Por otra parte, la expansión en edad y comorbilidades tanto de donantes como de receptores lleva también a una peor supervivencia de los injertos y a una susceptibilidad mayor a eventos graves que condicionen la muerte de los receptores. El aumento de la supervivencia del injerto a medio-largo plazo y el descenso de la morbi-mortalidad cardiovascular (30–32) son dos de los grandes retos que ha de superar el trasplante renal en los próximos años.

2.3. La biopsia del injerto renal

2.3.1. Generalidades

La biopsia es la herramienta *gold standard* para el diagnóstico y pronóstico de la patología del injerto renal más allá de los problemas de causa obstructiva/urológica o vascular. La biopsia del injerto renal es una modificación de la biopsia renal percutánea del riñón nativo, que se lleva a cabo de manera rutinaria desde mediados del siglo XX. En nuestro medio, entorno al 70-80% de las biopsias del injerto renal se realizan por motivos diagnósticos (33) y, pese a ser una técnica segura y

que ha avanzado en los últimos años, es un procedimiento invasivo no exento de riesgos.

La única contraindicación absoluta para la realización de una biopsia del injerto es la presencia de un trastorno de la coagulación no modificable y las complicaciones más habituales son el sangrado leve (hematuria o hematoma) o en ocasiones grave con hemorragia activa y la formación de una fístula arterio-venosa. La utilización de la ecografía en tiempo real y de agujas automáticas ha disminuido significativamente la tasa de complicaciones, así como la estandarización de protocolos (34). En un estudio español que incluye más de 300 biopsias, la tasa de complicaciones globales fue de 12.7% (mayores 5.6%) (35). Lo más habitual es el uso de agujas de 16G o 18G en función del centro. Además, la biopsia del injerto renal es un procedimiento que se puede realizar de forma ambulatoria sin que implique un mayor riesgo para el paciente siempre y cuando éste no presente contraindicaciones (tratamiento anticoagulante, trombocitopenia, obesidad mórbida...)(36).

2.3.2. Diagnósticos histológicos

Cuando se realiza en análisis histológico de la biopsia del injerto renal, los diagnósticos más frecuentes se relacionan con mecanismos inmunológicos: rechazo celular mediado por células T, identificado en la biopsia por la presencia de inflamación tubulo-intersticial +/- endotelialitis, y rechazo humoral o mediado por anticuerpos, que se identifica histológicamente por la presencia de inflamación en la microcirculación (glomerulitis y capilaritis peritubular) +/- depósito de C4d. También es frecuente el diagnóstico de procesos infecciosos (nefropatía por virus BK, CMV o infecciones bacterianas) o vasculares (microangiopatía trombótica). No es excepcional la presencia de recidiva de la glomerulopatía de base sobre el injerto (nefropatía IgA, glomeruloesclerosis segmentaria y focal...) o aparición de patología *de novo*, como la nefropatía diabética, tras años de evolución del trasplante.

Asimismo, es muy corriente la presencia de IFTA en distinto grado, lesiones crónicas e irreversibles del parénquima.

En 1991, un grupo nefropatólogos liderados por Solez, Keown y Racusen, dieron los primeros pasos para la publicación de un documento de consenso acerca de la histopatología del injerto renal. Este grupo, conocido como grupo de Banff o Banff Foundation (su primera reunión tuvo lugar en Banff, Canadá), se reúne cada dos años para discutir acerca de las últimas investigaciones en esta materia, publicando tras cada reunión un documento de consenso (37). Actualmente, el diagnóstico histopatológico del injerto renal se basa en las directrices marcadas por este grupo, aceptadas fielmente por la comunidad científica. Entre sus publicaciones más destacables cabe mencionar la de 1997 (38), en la que se recogen los criterios en cuanto a número de glomérulos y arterias para considerar una biopsia apta para el diagnóstico, así como las recomendaciones en cuanto a técnicas a realizar. A principios de la década de los 2000 se establecieron los criterios para el diagnóstico del rechazo humoral (39), parcialmente modificados en las reuniones posteriores.

La reunión del grupo de Banff de 2017 fue en Barcelona y sus conclusiones se publicaron en enero de 2018 (40). Se consensuó la inclusión de un nuevo subtipo de rechazo entre los diagnósticos histológicos: el rechazo celular mediado por células T crónico activo. Se ha denominado así a la presencia de inflamación moderada/severa en zonas de fibrosis (i-IFTA) asociado a tubulitis moderada/severa. Se sabe que este hallazgo se relaciona con una peor supervivencia del injerto y, generalmente, con niveles bajos de inmunosupresión. Además, se han validado herramientas moleculares para mejorar el diagnóstico del rechazo mediado por anticuerpos, sumado al C4d y a la determinación sérica de anticuerpos donante-específicos (DSA).

La última clasificación de los diagnósticos histológicos de Banff se recoge en la siguiente tabla.

TABLE 5 Revised Banff 2017 classification of antibody-mediated rejection (ABMR) and T cell-mediated rejection (TCMR) in renal allografts: revisions highlighted in boldface type

<i>Category 1: Normal biopsy or nonspecific changes</i>	
<i>Category 2: Antibody-mediated changes</i>	
Active ABMR; all 3 criteria must be met for diagnosis	
1. Histologic evidence of acute tissue injury, including 1 or more of the following: Microvascular inflammation (g > 0 and/or ptc > 0), in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis, although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, ptc ≥ 1 alone is not sufficient and g must be ≥ 1 Intimal or transmural arteritis (v > 0) ¹ Acute thrombotic microangiopathy, in the absence of any other cause Acute tubular injury, in the absence of any other apparent cause	
2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, including 1 or more of the following: Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections) At least moderate microvascular inflammation ([g + ptc] ≥ 2) in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis, although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, ptc ≥ 2 alone is not sufficient and g must be ≥ 1 Increased expression of gene transcripts/classifiers in the biopsy tissue strongly associated with ABMR, if thoroughly validated	
3. Serologic evidence of donor-specific antibodies (DSA to HLA or other antigens). C4d staining or expression of validated transcripts/classifiers as noted above in criterion 2 may substitute for DSA; however thorough DSA testing, including testing for non-HLA antibodies if HLA antibody testing is negative, is strongly advised whenever criteria 1 and 2 are met	
Chronic active ABMR; all 3 criteria must be met for diagnosis²	
1. Morphologic evidence of chronic tissue injury, including 1 or more of the following: Transplant glomerulopathy (cg > 0) if no evidence of chronic TMA or chronic recurrent/de novo glomerulonephritis; includes changes evident by electron microscopy (EM) alone (cg1a) Severe peritubular capillary basement membrane multilayering (requires EM) ³ Arterial intimal fibrosis of new onset, excluding other causes; leukocytes within the sclerotic intima favor chronic ABMR if there is no prior history of TCMR, but are not required	
2. Identical to criterion 2 for active ABMR, above	
3. Identical to criterion 3 for active ABMR, above, including strong recommendation for DSA testing whenever criteria 1 and 2 are met	
C4d Staining without Evidence of Rejection; all 4 features must be present for diagnosis⁴	
1. Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections)	
2. Criterion 1 for active or chronic, active ABMR not met	
3. No molecular evidence for ABMR as in criterion 2 for active and chronic, active ABMR	
4. No acute or chronic active TCMR, or borderline changes	
<i>Category 3: Borderline changes</i>	
Suspicious (Borderline) for acute TCMR	
Foci of tubulitis (t > 0) with minor interstitial inflammation (i0 or i1), or moderate-severe interstitial inflammation (i2 or i3) with mild (t1) tubulitis; retaining the i1 threshold for borderline with t > 0 is permitted although this must be made transparent in reports and publications	
No intimal or transmural arteritis (v = 0)	
<i>Category 4: TCMR</i>	
Acute TCMR	
Grade IA	Interstitial inflammation involving >25% of nonsclerotic cortical parenchyma (i2 or i3) with moderate tubulitis (t2) involving 1 or more tubules, not including tubules that are severely atrophic ⁵
Grade IB	Interstitial inflammation involving >25% of nonsclerotic cortical parenchyma (i2 or i3) with severe tubulitis (t3) involving 1 or more tubules, not including tubules that are severely atrophic ⁵
Grade IIA ¹	Mild to moderate intimal arteritis (v1), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis
Grade IIB ¹	Severe intimal arteritis (v2), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis
Grade III ¹	Transmural arteritis and/or arterial fibrinoid necrosis of medial smooth muscle with accompanying mononuclear cell intimal arteritis (v3), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis
Chronic Active TCMR	
Grade IA	Interstitial inflammation involving >25% of the total cortex (ti score 2 or 3) and >25% of the sclerotic cortical parenchyma (i-IFTA score 2 or 3) with moderate tubulitis (t2) involving 1 or more tubules, not including severely atrophic tubules ⁵ ; other known causes of i-IFTA should be ruled out
Grade IB	Interstitial inflammation involving >25% of the total cortex (ti score 2 or 3) and >25% of the sclerotic cortical parenchyma (i-IFTA score 2 or 3) with severe tubulitis (t3) involving 1 or more tubules, not including severely atrophic tubules ⁵ ; other known causes of i-IFTA should be ruled out
Grade II ¹	Chronic allograft arteriopathy (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell inflammation in fibrosis and formation of neointima)

Figura 6. Clasificación del rechazo mediado por anticuerpos y el rechazo mediado por células T en el injerto renal. Revisión Banff 2017 (40)

2.4. Biopsia de protocolo: monitorización histológica del injerto renal

A partir de finales de los años 70 y principios de los 80, diferentes unidades de trasplante renal a lo largo del mundo comienzan a practicar biopsias del injerto a pacientes clínicamente estables, sin deterioro de la función renal ni aparición de proteinuria. Estas biopsias se denominaron biopsias de protocolo o seguimiento. En un primer momento, y dado que en aquella época el rechazo agudo era la barrera a superar, los estudios se centraron en buscar lesiones histológicas que precedieran a la aparición del rechazo clínico (41). Se observó inicialmente que en los injertos estables aparecía infiltrado inflamatorio en el túbulo-intersticio en mayor o menor medida, así como cambios crónicos en forma de IFTA. El término rechazo subclínico y su definición (presencia de infiltrado inflamatorio intersticial y tubulitis en injertos estables) fue descrita por Rush en la década de los 90 (42). Más adelante, los esfuerzos se concentraron en relacionar estas lesiones subclínicas con el pronóstico del trasplante renal (43,44).

Actualmente, está globalmente reconocido el papel de la biopsia de protocolo del trasplante renal como una herramienta segura y útil para el seguimiento y monitorización del injerto, al igual que los estudios analíticos y radiológicos (44). No se realizan de manera rutinaria a todos los pacientes en todas las unidades de trasplante renal, pero cada vez son más los grupos que cuentan con un programa de biopsias de protocolo ambulatorio. Se suelen realizar durante el primer mes/primeros tres meses post-trasplante, a los 6-12 meses del trasplante y posteriormente anualmente o a los 5 años en función de las características del paciente y del programa implementado. Además, los cambios histológicos objetivados en las biopsias de protocolo ya se utilizan como variable de eficacia (igual que la función renal, proteinuria,

etc) en diversos estudios en el momento actual. Se ha demostrado la seguridad de la realización de estas biopsias de manera ambulatoria, sin aumento de las complicaciones (36).

2.4.1. Cambios crónicos: fibrosis intersticial y atrofia tubular

La presencia de IFTA es el resultado histológico final de varios procesos fisiopatológicos (45,46). Por una parte, es una característica propia del órgano que ocasionalmente ya puede ser visible en la biopsia preimplante en caso de que se realice (IFTA preimplante), así como consecuencia de los procesos derivados de la isquemia reperfusión y de la eventual necrosis tubular aguda post-implante, que puede dejar huella histológica en forma de IFTA (47,48).

Tras el implante, contribuyen a la presencia de lesiones crónicas la nefrotoxicidad por anticalcineurínicos y los episodios de rechazo agudo clínico o subclínico (48,49). Dado que las características propias del órgano no son modificables y la presencia de necrosis tubular aguda post-trasplante tampoco lo es en su totalidad, la estrategia para prevenir los cambios crónicos en el túbulo intersticio, que aparecen de manera rápida durante el primer año post-trasplante y para los que no existe tratamiento, consiste en el equilibrio en la inmunosupresión, permitiendo que evite el rechazo sin llegar a producir excesiva toxicidad renal (50). A diferencia de las lesiones inflamatorias, la presencia de IFTA, una vez establecida, es irreversible y conlleva irremediablemente a la pérdida de función renal. A largo plazo, a las lesiones crónicas túbulo-intersticiales, se suman las lesiones vasculares y la glomeruloesclerosis. En los primeros años de su estudio, estas lesiones crónicas del injerto se denominaban CAN (nefropatía crónica del injerto).

Los primeros estudios en cuanto al papel pronóstico de las lesiones túbulo-intersticiales crónicas datan de los años 90. Isoniemi y colaboradores (51,52) publicaron una de las primeras series de biopsias de protocolo realizadas a los dos años del trasplante, en la que 2/3 presentaban cambios crónicos, siendo esta lesión crónica predictora de la evolución del injerto. En 1994-1995 se publica otra serie de biopsias

realizadas a los 6 meses del trasplante (42,53), en la que sólo el 25% de los injertos presentan IFTA en pacientes tratados con triple terapia (ciclosporina, azatioprina y corticoides). En esta serie, sin embargo, el 28% de las biopsias objetivan rechazo agudo, lo que podría deberse a unos niveles bajos de anticalcineurínico, que no provocan nefrotoxicidad pero tampoco protegen de manera suficiente contra el rechazo.

En el trabajo publicado por Serón en 1997 (54) se revisaron 98 biopsias de protocolo realizadas en pacientes estables con función renal óptima a los 3 meses del trasplante, observando la presencia de lesiones crónicas en el 42% de los injertos. En este trabajo, la presencia de episodios de rechazo agudo previo a la biopsia y los niveles séricos de ciclosporina en el momento de la biopsia fueron predictores independientes de la presencia de lesiones crónicas. Asimismo, la presencia de lesiones crónicas fue un predictor independiente de la supervivencia del injerto a los 4.8 años del trasplante.

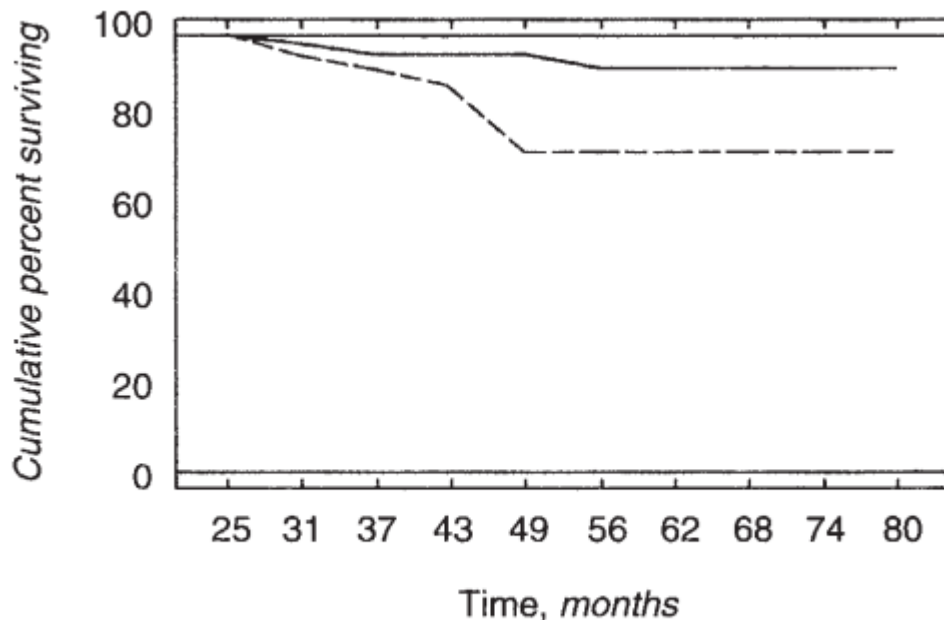


Fig. 1. Actuarial graft survival in patients with chronic transplant nephropathy (dashed line) and in patients without CTN (solid line). $P = 0.024$.

Figura 7. Supervivencia del injerto en pacientes que presenta CAN a los 3 meses del trasplante frente a pacientes sin esta lesión (54)

De la misma manera, Nankivell y cols en su trabajo publicado en el NEJM en 2003 (55), evaluaron la historia natural de la CAN en biopsias seriadas durante los 10 primeros años post-trasplante de injertos sin daño crónico y con mínima necrosis tubular (receptores de riñón-páncreas). Observaron que la presencia de IFTA aumenta de manera progresiva durante el primer año post-trasplante y persiste una vez establecida, hecho que se objetivó en otros trabajos posteriormente (56,57). Además, relacionaron el eFG al año del trasplante con la presencia de CAN (66.3 ± 15.8 ml/min en pacientes sin lesiones crónicas vs 49.8 ± 21.8 ml/min en pacientes con nefropatía crónica grado II o superior). Los episodios de rechazo agudo grave y la presencia de necrosis tubular aguda resultaron predictores de la presencia de IFTA entre el mes 1 y 12 post-trasplante.

2.4.2. Cambios agudos: inflamación túbulo-intersticial y rechazo celular.

Al contrario que la presencia de IFTA, que es el resultado final de noxas diversas sobre el injerto y que aumenta de manera progresiva con el tiempo tras el trasplante, la inflamación túbulo-intersticial, clínica (rechazo) o subclínica (cambios borderline o rechazo subclínico), es una lesión típica del post-trasplante reciente, disminuyendo de manera significativa su presencia a partir del sexto mes post-trasplante. En las últimas décadas, su presencia ha disminuido como consecuencia de la optimización de la inmunosupresión (58,59). Es importante diferenciarlo del rechazo mediado por anticuerpos, que abordaremos más adelante y en el que es característica la inflamación de la microcirculación, no del túbulo-intersticio.

La presencia de inflamación túbulo-intersticial en mayor o menor grado varía según las series y el tiempo de evolución del trasplante, así como en función del tratamiento inmunosupresor. Heilman et al (60) realizan biopsias de protocolo a pacientes bajo un régimen de retirada rápida de esteroides manteniendo MMF y tacrolimus en los primeros 4 meses postrasplante (n=256), objetivando inflamación subclínica en el 20%,

rechazo subclínico en el 7% y rechazo agudo clínico en el 6%. Cifras similares de rechazo subclínico a los 6 meses del trasplante mostraron Rush et al (61). Shishido (62) estudió la presencia de inflamación asociada a cambios crónicos, observando cambios borderline en 9% y CAN en el 48% de 95 pacientes biopsiados al año del trasplante. El 50% de los pacientes con CAN presentaban además cambios compatibles con rechazo subclínico. El mismo grupo de pacientes presentaba una menor tasa de rechazo subclínico en biopsias seriadas posteriores al año del trasplante. Por el contrario, cuanto más cercanas a la fecha de trasplante son las biopsias, de mayor grado son los cambios inflamatorios. Nankivell et al (63) analizaron 119 pacientes trasplantados de riñón-páncreas con biopsias seriadas y el porcentaje de rechazo subclínico fue del 60.8% al mes del trasplante y del 45.7% a los tres meses.

La inflamación en el túbulo-intersticio es el resultado de un proceso inmunológico, depende del tratamiento inmunosupresor y de las características del donante y del receptor.

La disminución de la presencia de inflamación aguda clínica o subclínica en las últimas décadas se relaciona en gran medida con la utilización de regímenes de inmunosupresión más potentes. Este hecho queda bien retratado en el trabajo de Roberts (64), en el que compara una cohorte histórica de pacientes trasplantados bajo tratamiento con CsA y azatioprina versus un grupo de pacientes en los que la inmunosupresión se individualiza en función del riesgo inmunológico (tacrolimus, MMF y corticoides para riesgo inmunológico alto; CsA, MMF y corticoides para riesgo intermedio y CsA, azatioprina y corticoides para riesgo bajo). La presencia de rechazo en biopsias de protocolo a los 7 y 28 días post-trasplante fue significativamente menor en los pacientes con inmunosupresión individualizada (32.6% VS 57.2%). Las pautas basadas en CsA y azatioprina muestran unas tasas de rechazo mayores al 50% en los primeros meses post-trasplante, que se reducen a entorno a 30% con la introducción del MMF. Con los regímenes actuales, basados en tacrolimus y MMF o imTOR, la presencia de SCR es de entorno al 15%

en los primeros meses post-trasplante. Las pautas libres de CNI han mostrado resultados discrepantes: en ausencia de imTOR las tasas de rechazo superan el 50% (65), mientras que pautas con imTOR, MMF y corticoides se relacionan con una prevalencia de rechazo similar a las basadas en tacrolimus (18% VS 14%) (66).

Sin embargo, en los trabajos de Moreso et al (67,68), el uso de tacrolimus es un factor protector de la aparición de rechazo celular. En su trabajo de 2006, en el que se analizan 435 biopsias de protocolo realizadas durante los primeros seis meses post-trasplante, la presencia de SCR es del 16% en pacientes tratados con tacrolimus y del 56% en regímenes libres de CNI. Por otra parte, se ha descrito que el MMF juega un papel protector en la aparición de SCR (69) y, concretamente, de tubulitis (63).

La influencia de las características del donante en la presencia de inflamación clínica o subclínica a corto o medio plazo es difícil de atestiguar, ya que la mayoría de estudios se han llevado a cabo con injertos procedentes de donante cadáver. Uno de los más relevantes en este ámbito es el realizado por Choi et al (69), en que se analizan 302 biopsias de seguimiento a los 14 días post-trasplante en órganos procedentes de donante vivo. Se objetiva que el donante vivo no emparentado (vs emparentado) supone un factor de riesgo para la aparición de rechazo subclínico. En otro estudio en el que se evalúan 361 pacientes con biopsia de protocolo a los 6 meses, se observa que la donación procedente de donante cadáver aumenta la incidencia de rechazo subclínico (24% vs 13% en donante vivo) (70). El grupo francés estudia un grupo de 1001 pacientes a los que se realiza una biopsia de seguimiento al año del trasplante y observa que los injertos con SCR proceden en mayor medida de donantes cadavéricos que los injertos que no muestran inflamación (88% vs 71%, $p=0.02$) (71). Mehta et al (72) publican un trabajo en el que se estudian 200 pacientes que presentan inflamación subclínica versus histología normal en la biopsia de seguimiento a los 3 meses del trasplante. En cuanto a las características del donante (sexo, edad, vivo/cadáver), no hay

diferencias significativas entre el grupo que presenta inflamación y el de histología normal.

En cuanto a las características propias del receptor que influyen en el desarrollo de inflamación, se sabe que la más definitoria es la inmunológica. Diferentes autores han relacionado la presencia de mismatches HLA o PRA elevado, ambos factores de riesgo para la presencia de DSA, con mayor inflamación clínica/subclínica en biopsias de protocolo. El trabajo de Choi et al (69), en el que se analizan 304 pacientes portadores de un injerto renal estable con biopsia de seguimiento a los 14 días post-trasplante, muestra que los pacientes con rechazo subclínico presentaban más mismatches HLA que los pacientes con cambios borderline o histología normal (3.5 ± 1 vs 2.9 ± 1.3 en borderline y 2.6 ± 1.5 en histología normal). De la misma manera, sólo el 2.7% de los pacientes sin mismatches HLA presentaron rechazo mientras que la presencia de un mismatch incrementaba la incidencia de rechazo en un 15.4%.

Conclusiones similares obtiene Moreso (68) analizando 435 trasplantes renales con biopsia de seguimiento en los primeros seis meses post-trasplante: los pacientes que presentaban SCR aislado o asociado a CAN mostraban un PRA más elevado que los pacientes con histología normal o CAN aislada. En este caso, no había diferencias entre los mismatches en el HLA pero sí se observaba que la presencia de rechazo asociado o no a CAN se relacionaba con una mayor incidencia de episodios previos de rechazo. En biopsias seriadas en los meses 1 a 4 post-trasplante, Heilman et al (60) muestran también que los pacientes con rechazo clínico tienen un PRA mayor y mayor número de mismatches HLA que los pacientes con histología normal, cambios borderline y SCR. Los episodios de rechazo previo también se relacionan con el SCR persistente en un estudio que revisa 119 pacientes con biopsias de seguimiento seriadas al mes, 3 meses, 12 meses y posteriormente (63).

Por el contrario, el grupo de Pittsburgh (72) ha publicado recientemente un artículo en el que evalúan la inflamación mínima (por debajo de los cambios borderline establecidos por Banff, $i+t=1$) y, al contrario que en los trabajos previos, en los que se investiga acerca de mayores grados de inflamación, no hay diferencias en cuanto a las características del receptor ni mismatches HLA con respecto al grupo sin inflamación alguna ($i+t=0$).

La repercusión de la inflamación temprana sobre el injerto a medio y largo plazo varía según las series. Estas variaciones son debidas a los diferentes regímenes inmunosupresores y a las diferencias en el tiempo de realización de las biopsias. Uno de los trabajos más recientes es el de Mehta et al (72), en el que la presencia de inflamación subclínica a los 3 meses del trasplante se relaciona con mayor tasa de SCR a medio plazo (24% vs 10%, $p=0.015$) y con peor función renal a los 24 meses del trasplante (creatinina 1.60 ± 0.7 vs 1.380 ± 0.45 en el grupo de histología normal, $p=0.02$). El grupo de Alberta (28) analiza la relación entre el diagnóstico histológico de biopsias realizadas por indicación a un grupo de 315 pacientes desde los 6 días post-trasplante hasta más de 30 años post-trasplante: observan que durante los 6 primeros meses, la lesión más frecuente son los cambios borderline y el rechazo celular (61% de los pacientes presentan este diagnóstico en esta etapa del trasplante). Sin embargo, de entre los 60 pacientes que pierden el injerto durante el seguimiento, solo el 4% presentan un diagnóstico de rechazo celular o cambios bordeline en la biopsia temprana.

El grupo de Bellvitge (73) publica, sin embargo, resultados discordantes. Analizan el impacto a largo plazo (a los 15 años) de la histología de la biopsia de seguimiento a los 6 meses del trasplante en un pool de casi 1000 pacientes de dos hospitales europeos (Helsinki y Bellvitge). El 60% de los pacientes presentan alteraciones histológicas en la biopsia de seguimiento. Se observa que el patrón histológico de la biopsia temprana que tiene mayor repercusión en la supervivencia a largo plazo es la inflamación. La supervivencia se ve afectada incluso en biopsias que únicamente muestran inflamación aislada ($i>1$, con resto de

parámetros normales, sin tubulitis). Mientras que los pacientes con $i=1$ presentan una supervivencia del injerto a los 15 años similar a la de los pacientes con $i=0$, ligeramente inferior al 80%, los pacientes con $i>1$ aislada, en ausencia de tubulitis, presentan una supervivencia del injerto a los 15 años inferior al 60%. Este trabajo replantea la aparente inocuidad con la que se había tratado previamente a la inflamación leve y aislada.

También se ha relacionado la presencia de inflamación subclínica y SCR temprano, que al fin y al cabo son dos estadios evolutivos del mismo proceso, con un mayor índice de fibrosis al año del trasplante (60).

Cuando la inflamación se produce más tardíamente en el injerto, parece no tener gran repercusión a nivel de supervivencia del mismo salvo que se desarrollen anticuerpos anti HLA o glomerulopatía del trasplante. Este hecho queda reflejado en el artículo de Loupy et al (71), en el que 1001 pacientes son sometidos a biopsias de seguimiento al año del trasplante, presentando un 13% SCR. A los 8 años de seguimiento, el 88% de los pacientes con SCR presentaban injerto funcional, sin diferencias con los pacientes que tenían histología normal en la biopsia del año. La presencia de injerto no funcional en el grupo de rechazo celular se relacionó con el desarrollo de DSA y glomerulopatía del trasplante.

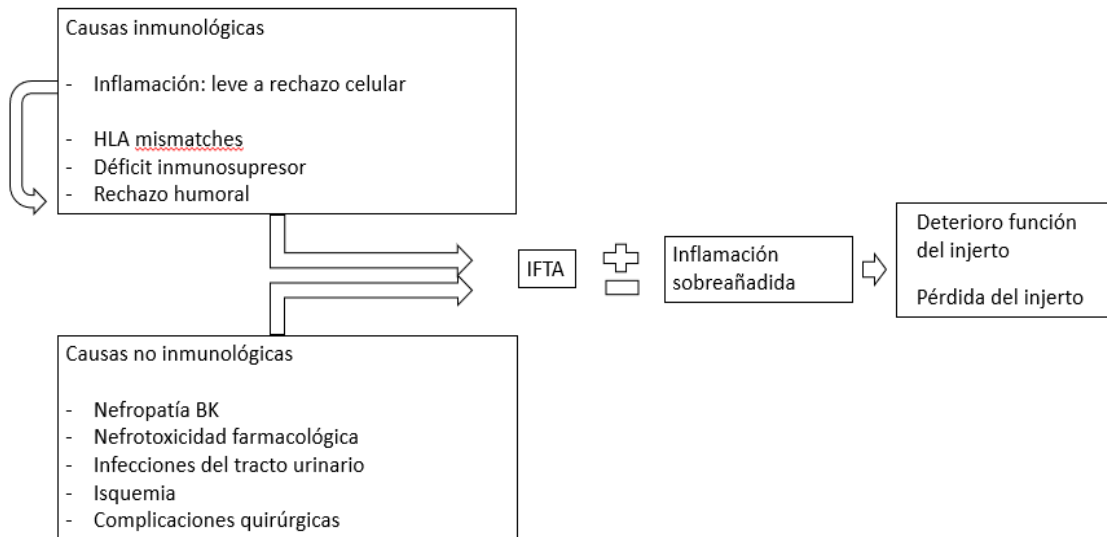


Figura 8. La etiología de los cambios crónicos en el compartimento túbulo-intersticial es multifactorial, concurren causas inmunológicas y no inmunológicas. Si a IFTA se suman cambios inflamatorios, agudos, la progresión al deterioro de la función del injerto parece ser más rápida.

2.5. Rechazo mediado por anticuerpos

En los últimos años, la inflamación túbulo-intersticial o rechazo celular ha dejado de ser una de las causas directas de pérdida del injerto a medio plazo. No se puede descartar, sin embargo, su repercusión sobre la formación de anticuerpos y desarrollo de rechazo humoral. Actualmente, el rechazo humoral, en mayor medida en su vertiente crónica, es el caballo de batalla del trasplante renal y una de las causas principales de que se sigan perdiendo injertos de manera reiterada (74).

El desarrollo y lesividad del rechazo mediado por anticuerpos se describe en el artículo de revisión publicado por Mengel en 2012 (75). Los DSA son anticuerpos anti HLA en su mayoría, si bien en este grupo se podrían incluir también los del grupo ABO, actualmente anecdóticos por la ausencia de

trasplante ABO incompatible en ausencia de desensibilización previa. Los DSA son los promotores del rechazo humoral, provocando daño sobre la microcirculación endotelial. El espectro clínico-patológico del rechazo humoral es amplio, abarcando desde el rechazo humoral hiperagudo, que en la actualidad apenas tiene lugar ante la ausencia de trasplante en presencia de DSA circulantes (técnicas de desensibilización), al rechazo humoral crónico activo o a la presencia de C4d en ausencia de signos de rechazo mediado por anticuerpos. Además, hoy en día se cree que no todos los DSA presentan la misma capacidad para el desarrollo de rechazo. Los anticuerpos capaces de fijar complemento (subclases de IgG 1 y 3) son más nocivos que los que no fijan complemento (subclases IgG 2 y 4) y, de esta manera, la presencia de DSA circulantes capaces de fijar complemento tiene una función deletérea para el injerto (76). De la misma manera, la persistencia de la capacidad para fijar complemento (C1q) tras tratamiento para el rechazo humoral supone un factor de riesgo para la pérdida del injerto en pacientes con rechazo mediado por anticuerpos según los últimos trabajos publicados por el grupo de París (77,78).

El rechazo mediado por anticuerpos se definió en la reunión de Banff de 2001. Se establecieron los tres pilares diagnósticos del rechazo humoral agudo: la evidencia histológica de daño tisular agudo (glomerulitis o capilaritis peritubular), la evidencia inmunohistológica del efecto de los anticuerpos (depósito de C4d) y la presencia de DSAs circulantes. En caso de cumplirse únicamente dos de los tres criterios, se catalogaba como sospecha de rechazo humoral. En Banff 2005 (79) se suma al diagnóstico de rechazo agudo el de rechazo humoral crónico, en el que las lesiones en la microcirculación no son puramente inflamatorias, si no residuales como la presencia de dobles contornos en la membrana basal glomerular y/o la laminación en la membrana basal del capilar peritubular. El rechazo agudo o crónico son diferentes momentos evolutivos del mismo proceso. En Banff 2013 (80), se redefinió el rechazo humoral agudo o activo sin necesidad de depósito de C4d pero siendo necesaria la evidencia de la interacción de los DSA con el endotelio vascular (al menos presencia de inflamación microvascular moderada o expresión genética). Se redefinió también el rechazo crónico activo, para cuyo diagnóstico tampoco es necesaria la presencia de C4d. De la misma manera, se revisó la

presencia de depósitos de C4d en ausencia de datos histológicos o clínicos de rechazo humoral, siendo aparentemente no patológica.

En los últimos años, el rechazo crónico mediado por anticuerpos supone una de las principales causas de pérdida del injerto a medio plazo. El grupo de Alberta, en conjunto con la Clínica Mayo, reportó que la pérdida de injertos debida a rechazo humoral en su población alcanzaba el 63% (81,82). De la misma manera, Ciancio et al (83) describen una pérdida del injerto del 53.6% en los primeros 8 años post trasplante en pacientes que habían presentado rechazo humoral en algún momento tras el trasplante. Por este motivo, comprender su fisiopatología y promover su prevención es uno de los hitos en el futuro del trasplante renal.

2.6. Relación entre inflamación, DSA *de novo* y rechazo humoral

En la actualidad, la monitorización de la presencia de anticuerpos anti HLA es una práctica habitual. La presencia de DSA, bien sean preformados o bien aparezcan *de novo*, es una condición imprescindible para el desarrollo de rechazo humoral. Sin embargo, el desarrollo de DSA no implica necesariamente que se produzca un rechazo mediado por anticuerpos. Entre un 2-3% y un 20% de los pacientes que reciben un trasplante renal acaban desarrollando DSA durante el primer año post-trasplante (84). Se sabe que la presencia de mismatches en el HLA es una condición predisponente (85). En los últimos años, se han publicado varios trabajos en los que se relaciona la presencia de inflamación temprana, clínica o subclínica, con la aparición de DSA a medio plazo y posterior rechazo humoral (86,87). La hipótesis es que el reclutamiento linfocitario a nivel del injerto, necesario y secundario al propio proceso inflamatorio, es el propio trigger para la aparición de los anticuerpos.

Moreso et al (88) analizan 517 receptores de trasplante renal que disponen de una biopsia renal de seguimiento durante los seis primeros meses post-trasplante, de los cuales 109 se someten posteriormente a una segunda biopsia diagnóstica por disfunción del injerto: 44 presentan rechazo humoral. Se objetiva que el grupo que presenta rechazo humoral en la segunda biopsia

tiene una incidencia mucho mayor de SCR en la primera biopsia que los pacientes que presentan cambios crónicos -IFTA- (52.3% vs 28.6%, $p=0.0253$), confirmándose la relación en un modelo predictivo. También se aprecia que el grado de inflamación túbulo-intersticial en la primera biopsia es mayor en los pacientes con rechazo humoral.

El grupo de la Universidad de Manitoba (89) publicó una serie similar. Analizaron 315 pacientes sin DSA preformados al momento del trasplante con un seguimiento medio de 6 años, que disponían de biopsias a lo largo de este período. 47 pacientes desarrollaron DSA durante el seguimiento. La incidencia de rechazo subclínico en las biopsias previas fue mayor en los pacientes que desarrollaron DSA, sin alcanzar la significación estadística (26% vs 15%, $p=0.10$). Los predictores independientes de la aparición de anticuerpos fueron la presencia de algún mismatch en el HLA DR, la no adherencia al tratamiento inmunosupresor y haber presentado algún episodio previo de rechazo clínico.

En la Clínica Mayo (90) también analizaron una serie de 797 trasplantes renales sin DSA preformados, a los que realizaron una biopsia de protocolo al año del trasplante. El 15.2% de estos pacientes había presentado episodios de rechazo celular durante el primer año y, en la biopsia de seguimiento mencionada, todos presentaban alteraciones histológicas (inflamación + fibrosis, fibrosis moderada-severa o glomerulopatía del trasplante). Llama la atención que la glomerulopatía al año apareció en mucho mayor grado en los pacientes con episodios previos de rechazo (1.4% vs 8.3%, $p < 0.0001$). De la misma manera, la glomerulopatía del trasplante era responsable de la pérdida del 31% de los injertos que presentaron rechazo durante el primer año. Los episodios de rechazo también se asociaron a la aparición de DSA (11.1% en el grupo sin rechazo durante el primer año vs 21.2% en el grupo con rechazo, $p=0.039$).

2.7. Inflamación local en el injerto y repercusión inflamatoria sistémica

Los pacientes portadores de un trasplante renal, por el hecho de haber presentado insuficiencia renal de larga evolución, así como por la activación constante del sistema inmune propiciada por un aloinjerto pese al tratamiento inmunosupresor, presentan una inflamación sistémica mayor que la población sana. Se ha postulado también que el hecho de ser portador de un injerto renal predispone al paciente a un mayor grado de inflamación sistémica independientemente de la función renal que presente (91). Es decir, para el mismo grado de insuficiencia renal, un paciente trasplantado renal se encuentra más inflamado que un paciente con IRC no portador de trasplante.

En 2013, Vereyken et al (92) estudiaron las características de los monocitos y macrófagos circulantes durante los primeros meses post-trasplante y los compararon con población no trasplantada. Evaluaron a 33 pacientes sanos, a 30 pacientes en el momento del trasplante, a 19 pacientes a los tres meses y a los seis meses del trasplante. En la población sana, el 80% de los monocitos son CD14+CD16-, alterándose su relación en condiciones proinflamatorias como pueden ser las infecciones, dando lugar a monocitos CD16+, capaces de secretar mediadores proinflamatorios. En el post-trasplante inmediato, los pacientes presentan un aumento los CD16+, así como un incremento en los niveles de TNF alfa, interferon gamma e IL 1 beta. A los tres y a los seis meses del trasplante, pese a la mejoría en la función renal y a las altas dosis de inmunosupresión, la presencia de CD16+ todavía está incrementada y los mediadores proinflamatorios todavía se encuentran elevados, presentando tendencia a la normalización con el paso del tiempo. De manera paralela, el porcentaje de monocitos CD14+CD 16- es significativamente mayor en los pacientes sanos (82.4% vs 76.7%). En trabajos previos (93) ya se había establecido una relación entre la IL beta1, la IL 6 y el TNF alfa producidos por los monocitos circulantes en pacientes trasplantados y la glomerulopatía del trasplante.

Asimismo, Batal et al (94) analizaron las células mononucleares periféricas y las citocinas proinflamatorias de pacientes trasplantados a quienes se había realizado una biopsia diagnóstica. Clasificaron a los pacientes en tres grupos

según el diagnóstico histológico: no inflamación, inflamación sin glomerulitis y glomerulitis. Observaron que los pacientes con glomerulitis presentaban niveles más elevados de IL 6 e IL beta 1 y que éstos se asociaban al número de glomérulos inflamados y al número de monocitos intraglomerulares.

También en esta línea, el grupo de Vall d'Hebron (95) evaluó marcadores proinflamatorios y PA en pacientes trasplantados renales estables y en una cohorte de pacientes pareados por edad y función renal, a fin de caracterizar los factores de riesgo cardiovascular de la población trasplantada estable. Observaron que los pacientes trasplantados presentaban una presión arterial más elevada (PAS 133.9 ± 14.3 vs 120.5 ± 14.6 , $p=0.0001$) y con menor caída de las cifras durante la noche. Los pacientes trasplantados también mostraban un mayor nivel de inflamación sistémica medido mediante IL 6 sérica (\log IL 6 0.89 ± 0.33 vs 0.71 ± 0.31 en los pacientes no trasplantados). También se estudió el número de pacientes con placas carotídeas, que resultó mayor en la población trasplantada (55.4 vs 30% , $p=0.016$), y el número de placas por paciente, también mayor (1.17 ± 1.48 vs 0.53 ± 1.07 , $p= 0.013$). La creatinina, la inflamación sistémica medida mediante IL 6 y el número de placas carotídeas resultaron predictores independientes de la menor caída de cifras de PA durante la noche.

El grupo de Nefrología del Gregorio Marañón de Madrid (96) postuló la idea de que el injerto, incluso con disfunción crónica y no siendo ya funcional, promueve un incremento en la inflamación sistémica en los pacientes trasplantados. Para corroborar esta hipótesis, compararon un grupo de pacientes incidentes en diálisis con un grupo de pacientes que empezaban hemodiálisis tras el fracaso del trasplante renal. Observaron que los portadores de un injerto presentaban más anemia (Hb 10.4 ± 1.9 vs 12.7 ± 1.4 , $p<0.001$), menor albuminemia (3.2 ± 0.6 vs 3.8 ± 0.4 , $p<0.001$) y mayor PCR (4.1 ± 4.7 vs 1.3 ± 1.9 $p<0.001$), todos ellos marcadores de inflamación. Posteriormente, a un subgrupo de los pacientes trasplantados se le realizó trasplantectomía por indicación clínica. Se comparó este grupo a los 6 meses de la nefrectomía con los pacientes todavía portadores del injerto renal, observado que los pacientes sometidos a trasplantectomía mejoraban en cuanto a cifras de hemoglobina, albúmina sérica y disminuían la PCR.

Al mismo tiempo, en la población portadora de un injerto renal, un incremento en la inflamación sistémica medida mediante los niveles séricos de IL 6 y PCR se ha relacionado con un mayor riesgo de evento cardiovascular y mortalidad de cualquier causa (97). También se ha asociado a pérdida del injerto y a aumento de las cifras de creatinina sérica en pacientes trasplantados estables (98).

En conjunto, estos datos sugieren que el propio trasplante renal favorece la producción y movilización de citocinas pro-inflamatorias que pueden, a su vez, favorecer la disfunción endotelial y, por tanto, aumentar el riesgo cardiovascular, de pérdida del injerto y de muerte de estos pacientes. En la población general, la inflamación sistémica (medida por diferentes vías, tales como la PCR, IL6, albúmina...) se relaciona con una mayor mortalidad de cualquier causa (99) y lo mismo sucede en los pacientes en hemodiálisis (100).

3. HIPÓTESIS

En las biopsias de seguimiento del injerto renal, a lo largo de la evolución del trasplante, se objetivan frecuentemente diferentes grados de inflamación túbulo-intersticial, sin repercusión clínica en el momento de su hallazgo. Esta inflamación puede aparecer aislada o en presencia de daño crónico (IFTA). Los datos publicados hasta el momento actual hacen pensar que esta inflamación no es una lesión anodina y que tiene repercusión a nivel local en el propio injerto, a nivel inmunológico y también a nivel sistémico.

Las hipótesis de este trabajo de investigación son:

1. La presencia de inflamación túbulo-intersticial subclínica temprana tras el trasplante renal, acompañada de fibrosis intersticial y atrofia tubular, confiere un mayor riesgo de progresión de la fibrosis en el injerto que la presencia de inflamación aislada.
2. La presencia de inflamación túbulo-intersticial subclínica temprana tras el trasplante renal, acompañada de fibrosis intersticial y atrofia tubular, conlleva un aumento en el riesgo de aparición de anticuerpos donante-específicos similar al de la inflamación aislada.
3. La presencia de inflamación túbulo-intersticial subclínica en injertos estables se relaciona con un mayor grado de inflamación sistémica.

4. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Evaluar la repercusión de la inflamación túbulo-intersticial subclínica del injerto renal a nivel inmunológico, histológico y sistémico durante el primer año post-trasplante.

Objetivos secundarios:

1. Evaluar si la presencia de inflamación túbulo-intersticial subclínica temprana, asociada a IFTA, se relaciona con una mayor progresión de la fibrosis al año del trasplante que la presencia de inflamación aislada.
2. Evaluar si la presencia de inflamación túbulo-intersticial subclínica temprana, asociada a IFTA, se relaciona con un mayor riesgo de desarrollo de DSA al año del trasplante que la inflamación aislada.
3. Evaluar si la presencia de inflamación túbulo-intersticial en injertos estables al año del trasplante se relaciona con un mayor grado de inflamación sistémica medido a través de PCR sérica.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio: estudio retrospectivo, unicéntrico y con un seguimiento de un año para la evaluación de la repercusión de la inflamación subclínica en el injerto renal.

2. Sujetos del estudio: pacientes trasplantados renales entre enero 2009 y diciembre 2012 en el hospital universitario de Oslo - Rikshospitalet, mayores de 18 años en el momento del trasplante, con seguimiento de al menos un año y que cumplan los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

a) Estudio de la repercusión local e inmunológica de la inflamación subclínica del injerto renal:

Criterios de inclusión:

- Riesgo inmunológico estándar: PRA < 20%, ausencia de DSA en el momento del trasplante y crossmatch por citotoxicidad para células T y B negativo en el momento del trasplante.
- Régimen de inmunosupresión basado en CNI.
- Biopsia de seguimiento a las 6 ± 2 semanas del trasplante.
- Biopsia de seguimiento al año ± 2 meses del trasplante.
- Determinación de anticuerpos anti HLA a las 6 semanas del trasplante y al año del trasplante (en el momento de las biopsias de seguimiento).
- Firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Trasplante multiorgánico.
- Trasplante de donante ABO incompatible.
- Trasplante de donante HLA idéntico.

b) Estudio de la repercusión sistémica de la inflamación subclínica del injerto:

Criterios de inclusión:

- Riesgo inmunológico estándar: PRA < 20%, ausencia de DSA en el momento del trasplante y crossmatch por citotoxicidad para células T y B negativo en el momento del trasplante.
- Régimen de inmunosupresión basado en CNI.
- Biopsia de seguimiento al año +/- 2 meses del trasplante.
- Determinación de PCR sérica al año del trasplante.
- Situación clínica estable: proteinuria < 1 + en tira reactiva de orina y creatinina sérica < 300 mmol/L.
- Firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Trasplante multiorgánico.
- Trasplante de donante ABO incompatible.
- Trasplante de donante HLA idéntico.

Ambos estudios fueron aprobados por el "South-Eastern Regional Committee for Medical and Health Research Ethics en Noruega y fueron realizados de acuerdo con la Declaración de Helsinki y con los Principios de la Declaración de Estambul de tráfico de órganos y turismo de trasplante.

3. Variables del estudio

- Variable principal: inflamación subclínica en el injerto renal durante el período de seguimiento.

-Variables secundarias:

- progresión de la fibrosis en el injerto renal durante el período de seguimiento.

- desarrollo de DSA durante el período de seguimiento.

- valoración del estado de inflamación sistémica medida mediante el nivel sérico de PCR al año del trasplante.

-Variables clínicas:

Mediante revisión de la historia clínica y entrevista con el paciente se recogieron los datos demográficos: fecha de nacimiento, sexo, raza, antecedentes patológicos (hipertensión arterial y diabetes mellitus), historia de tabaquismo, peso y talla para cálculo del IMC en kg/m² y cifras de PA en mmHg.

Se recogieron también las variables demográficas del donante tales como edad y sexo, donante cadáver o donante vivo. También se recogieron las relacionadas con el trasplante: mismatches en el HLA A, B y DR, tiempo de isquemia fría, presencia de retraso en la función del injerto (definida como necesidad de al menos una sesión de diálisis durante los primeros siete días post-trasplante), episodios de rechazo durante el período de seguimiento, presencia de infección urinaria en los días previos a la biopsia y tratamiento inmunosupresor.

En cuanto al tratamiento inmunosupresor, cabe mencionar que todos los pacientes recibieron inducción con basiliximab y posteriormente un CNI en combinación con MMF y corticoides. Destacar que los pacientes con riesgo de desarrollar diabetes mellitus post-trasplante (mayores de 50 años o pacientes con test de sobrecarga oral de glucosa alterado en el estudio pre-trasplante) fueron tratados con ciclosporina y el resto con tacrolimus.

El rechazo celular agudo se trató con 1375 mg de metilprednisolona intravenosa dividida en 5 infusiones y se incrementó la dosis de prednisona oral a 30 mg diarios, con descenso posterior de 5 mg semanales. En caso de resistencia a los corticoides, se administró timoglobulina.

El rechazo agudo mediado por anticuerpos se trató con plasmaféresis e inmunoglobulinas intravenosas. De manera rutinaria, se realizaron cinco

sesiones de plasmaféresis y en caso de resistencia, se administró rituximab o timoglobulina.

- Biopsia del injerto:

En ambos estudios, las biopsias del injerto se realizaron mediante guía ecográfica. En cada biopsia, se obtuvieron al menos dos cilindros mediante pistola de 18G, uno de los cuales se utilizó para la histología (hematoxilina-eosina, PAS y tricrómico de Masson) y otro para C4d. Cada biopsia, para considerarse válida, habría de contener al menos un glomérulo y al menos una arteria, así como suficiente material túbulo-intersticial para evaluar inflamación, tubulitis, fibrosis intersticial y atrofia tubular. El depósito de C4d se estudió mediante inmunofluorescencia indirecta en congelado (anticuerpo monoclonal; Quidel, San Diego, CA). La presencia de C4d difuso, grado 3, en más del 50% de los capilares peritubulares, se consideró positiva. Las áreas con cicatrices fueron excluidas del análisis.

Para el estudio de la repercusión inmunológica y local de la inflamación, como se mencionó anteriormente, se obtuvieron biopsias a las seis semanas y al año del trasplante. Estas biopsias se clasificaron de acuerdo a los criterios de Banff de la siguiente manera:

a) histología normal: $i+t \leq 1$ y $ci+ct \leq 1$

b) inflamación: $i+t \geq 2$ y $ci+ct \leq 1$

c) IFTA: $i+t \leq 1$ y $ci+ct \geq 2$

d) IFTA + i: $i+t \geq 2$ y $ci+ct \geq 2$

Por el contrario, para el estudio de la repercusión sistémica de la inflamación solo se tuvieron en cuenta las biopsias realizadas al año del trasplante. Se clasificaron según los criterios de Banff atendiendo únicamente a los cambios agudos, de la siguiente manera:

a) histología normal: i 0-3 y t 0

b) cambios borderline: i 0-1 y t 1-3 ó i 2-3 y t 1

c) rechazo subclínico: i 2-3 y t 2-3

- Anticuerpos anti HLA:

En todos los trasplantes se realizó crossmatch citotóxico para linfocitos T y B previamente al implante. Además, se llevó a cabo un análisis en la plataforma Luminex LX200 para la identificación de HLA clase I y clase II. Las especificidades IgG se exploraron utilizando paneles de antígeno aislado en el momento del trasplante, a las seis semanas del mismo en el caso de los pacientes que participaron en el primer estudio, y al año del trasplante. Se utilizó un MFI de 1000 como valor de corte. Como control negativo, se utilizó suero que proporcionó el fabricante del kit. Ningún paciente presentaba DSA en el momento del trasplante o un PRA mayor del 20%.

- PCR:

En el estudio de la repercusión sistémica de la inflamación subclínica del injerto, se analizó la PCR en sangre el día de la biopsia, al año del trasplante. Para ello, se utilizó un test de inmunoensayo turbidométrico (Roche Modular Kit) en el analizador Roche Modular. El nivel mínimo de cuantificación fue 0.06 mg/L. El coeficiente de variación fue menor del 7.5% (para valores de PCR > 5 mg/L). El intervalo de referencia del laboratorio es de 0-4 mg/L y el rango acreditado reportado de 0.6-700 mg/L.

- Análisis estadístico:

Los resultados fueron expresados en frecuencias en el caso de las variables categóricas y como media \pm desviación estándar para las variables continuas. Kruskal Wallis, chi cuadrado y el análisis de la varianza fueron usadas para comparar variables categóricas, ordinales, continuas no normalmente distribuidas y continuas normalmente distribuidas respectivamente. Todos los valores de p se calcularon usando un test de dos colas y valores inferiores a

0.05 fueron considerados significativos. Se llevaron a cabo análisis de regresión logística binomial y multinomial para identificar los predictores independientes de las variables a estudio. Las variables con un valor de p inferior a 0.05 en el análisis univariado fueron incluidas en el análisis multivariado.

Para el análisis de la PCR, sus niveles fueron divididos en terciles, cuartiles y quintiles, ya que no siguen una distribución normal incluso tras la transformación logarítmica. Se analizó la asociación entre diagnóstico histológico (histología normal, cambios borderline y rechazo subclínico) y proteína C reactiva expresada en terciles, cuartiles y quintiles. La mejor asociación entre diagnóstico histológico y la PCR se obtuvo cuando ésta se clasificó en cuartiles. Además, y de cara a simplificar el análisis, los niveles de PCR fueron binarizados: PCR alta (cuartiles 1, 2 y 3) y PCR baja (cuartil 4). Para analizar los predictores independientes de los niveles de PCR se utilizó un análisis de regresión logística binomial en el que se incluyeron las variables con una p inferior a 0.05 en el análisis univariado.

6. ARTÍCULOS PUBLICADOS



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

Clara García-Carro, MD,¹ Christina Dörje, MD,² Anders Åsberg, MD, PhD,^{2,3} Karsten Midtvedt, MD, PhD,² Helge Scott, MD, PhD,³ Finn P. Reinholt, MD, PhD,⁴ Halvard Holdaas, MD, PhD,² Daniel Seron, MD, PhD,¹ and Anna V. Reisaeter, MD, PhD²

Background. Interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) associated with interstitial inflammation in nonscarred areas (IFTA+) is associated with poorer graft outcome than inflammation without IFTA or IFTA without inflammation. **Methods.** We evaluated if histological categories at week 6 could predict the development of interstitial fibrosis and de novo donor specific anti-HLA antibodies (dnDSA) at 1 year. Biopsies were classified according to Banff criteria as normal ($i+t \leq 1$ and $ci+ct \leq 1$), inflammation ($i+t \geq 2$ and $ci+ct \leq 1$), IFTA ($i+t \leq 1$ and $ci+ct \geq 2$) or IFTA+ ($i+t \geq 2$ and $ci+ct \geq 2$). **Results.** We analyzed 598 standard immunological risk recipients. The histological diagnosis at 6 weeks was: normal ($n = 206$), inflammation ($n = 29$), IFTA ($n = 255$), and IFTA+ ($n = 108$). Moderate/severe interstitial fibrosis (≥ 2) at 1 year was observed in 4.2% of patients with prior (6 weeks) normal histology, in 3.4% with inflammation, in 13.8% with IFTA, and in 24.5% with IFTA+ ($P = 0.0001$). Fifty-three recipients (8.9%) had dnDSA at 1 year. Independent predictors of development of dnDSA at 1 year were: HLA-DR mismatches (odds ratio [OR], 1.95; 95% confidence interval [95% CI], 1.09-3.49), the presence of inflammation (OR, 5.49; 95% CI, 1.67-18.03) or IFTA+ (OR, 4.09; 95% CI, 1.67-10.0) in the 6-week surveillance biopsy. **Conclusions.** Early subclinical inflammation in surveillance biopsies with or without tubulointerstitial chronic lesions is associated with an increased risk of dnDSA development.

(*Transplantation* 2016;00: 00-00)

The presence of tubulointerstitial inflammation in early surveillance renal allograft biopsies has been associated with progression of interstitial fibrosis¹ and decreased renal allograft survival.² However, in these studies, the presence or absence of interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) was not taken into consideration for the evaluation of subclinical inflammation. In later studies, it was observed that renal allograft survival was significantly shortened if surveillance biopsies showed IFTA with interstitial inflammation in nonscarred areas (IFTA+), whereas inflammation not

associated with IFTA was a relatively uncommon finding and was associated with graft survival comparable to normal biopsies and biopsies with IFTA without inflammation.³⁻⁵ The reason why IFTA+ is associated with a poor outcome has not been clarified.

The presence of inflammation in early surveillance biopsies has been associated with an enhanced donor specific memory T cell response,⁶ suggesting that subclinical inflammation may represent a surrogate of the alloimmune response. Recently, this notion has been reinforced by the description of a temporal association between early subclinical inflammation and an increased risk for de novo donor-specific anti-HLA antibodies

Received 6 January 2016. Revision received 25 February 2016.

Accepted 4 March 2016.

¹ Nephrology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

² Department of Transplant Medicine, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway.

³ Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo, Oslo, Norway.

⁴ Department of Pathology, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway.

This work was supported by the Instituto Carlos III grants, PIE13/00027, PI14/01383 and Red de Investigación renal REDInREN grant 12/0021/0013. García-Carro C was supported by a Spanish Society of Nephrology grant for international stages in 2015. Dörje C was supported by a grant from the Norwegian Foundation for Health and Rehabilitation.

The authors declare no conflicts of interest.

G.-C.C. and D.C. contributed equally to this work.

G.-C.C. contributed to the study design, collected clinical variables, participated in data analysis and writing of the article. D.C. contributed to the study design, collected clinical variables, participated in data analysis and writing of the article. A.A. contributed to the study design, participated in data analysis and critical revision of the article. M.K. contributed to the study design critical revision of the article. S.H. evaluated the biopsies and contributed to the critical revision of the article. R.F.P. evaluated the biopsies and contributed to the critical revision of the article. H.H. contributed to the study design and critical revision of the article. S.D. contributed to the study design, participated in data analysis and writing of the article. R.A.V. contributed to the study design and critical revision of the article. Correspondence: Daniel Seron, MD, PhD, Nephrology Department Hospital Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. (dsaron@vhebron.net). Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/16/0000-00

DOI: 10.1097/TP.0000000000001216

(dnDSA), as well as antibody-mediated rejection (AMR).^{7,8} It is not known whether inflammation in otherwise normal biopsies and in biopsies with IFTA+i imply a different risk for development of dnDSA. Additionally, it is not clear whether the presence of microvascular injury in early surveillance biopsies also contributes to an increased risk of dnDSA.⁸

The aim is to evaluate if the presence of IFTA+i in 6 weeks surveillance biopsies implies a differential risk for the progression of fibrosis and development of dnDSA at 1 year than the presence of inflammation not associated with IFTA.

MATERIALS AND METHODS

Patients

All patients with a negative cytotoxic T cell and B cell crossmatch, panel-reactive antibody (PRA) of 20% or less and donor-specific antibodies (DSA) negative before transplantation, receiving a single kidney transplant at Oslo University Hospital Rikshospitalet between January 2009 and December 2012 were considered. Patients were followed up during the first year after transplantation. At our tissue-typing laboratory, a PRA of 20% or less is considered as low immunological risk. Only patients receiving a calcineurin-based immunosuppressive regimen with a surveillance biopsy at 6 ± 2 weeks and 1 year (±2 month) and an anti-HLA antibody determination at the time of both biopsies were included in the present analysis. Patients receiving a kidney from a HLA-identical donor or ABO-incompatible graft were excluded. The study was approved by the South-Eastern Regional Committee for Medical and Health Research Ethics in Norway 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. All patients gave their written informed consent.

Biopsies

Two cores were obtained with ultrasound guidance using an 18-gauge spring-loaded biopsy gun, 1 for histology (hematoxylin-eosin and saffron, periodic acid-Schiff and Masson trichrome) and 1 for C4d. Both biopsies contained at least 1 glomerular and 1 arterial profile and sufficient tubulointerstitial tissue to grade interstitial inflammation (i), tubulitis (t), interstitial fibrosis (ci), and tubular atrophy (ct). C4d was stained with indirect immunofluorescence on frozen sections (monoclonal antibody; Quidel, San Diego, CA). Grade 3 diffuse C4d staining in more than 50% of peritubular capillaries was classified as positive.

Histological Classification

Renal lesions were graded according to the Banff criteria.^{9,10} Biopsies were classified into 4 groups: (a) normal histology (i+t≤1 and ci+ct≤1), (b) inflammation (i+t≥2 and ci+ct≤1), (c) IFTA (i+t≤1 and ci+ct≥2), and (d) IFTA+i (i+t≥2 and ci+ct≥2). Areas with fibrotic scars were excluded from evaluation.

Anti-HLA Antibodies

Immunomagnetic cytotoxic T cell and B cell crossmatches were done at transplantation in all recipients. Additional testing on the Luminex platform LX200, using the LSM12-screening kit (1 Lambda) for identification of HLA class I and class II was performed. IgG antibody specificities was examined using single antigen-coated flow beads provided by

1 Lambda at transplantation and at the time of the 6-week and 1-year surveillance biopsies. We used a mean fluorescence intensity of 1000 as a cutoff value. As a negative control, we used serum (LS-NC) delivered by the kit producer (1 Lambda). No patient had DSA or PRA greater than 20% before or at transplantation.

Clinical Variables

All patients received induction therapy with basiliximab followed by a calcineurin inhibitor–based regimen (either cyclosporine [CsA] or tacrolimus [TAC]) in combination with mycophenolate and prednisone as previously described.¹¹ Cyclosporine-based immunosuppression was used in recipients older than 50 years and in younger patients with impaired glucose tolerance test before transplantation as a strategy to limit the impact on posttransplant diabetes mellitus. Acute cellular rejections were treated with intravenous methylprednisolone, total dosage of 1375 mg, divided into 5 infusions. The oral prednisolone dose was increased to 30 mg/day and tapered 5 mg every other week. In case of steroid resistant rejection, rabbit antithymocyte globulin was administered. Acute AMR was additionally treated with plasmapheresis and/or intravenous immunoglobulin. Routinely, 5 plasmapheresis sessions were performed with replacement preferentially 4% albumin in Ringer (50 mL/kg bodyweight). In therapy resistant cases rituximab or rabbit antithymocyte globulin was administered. Delayed graft function was defined as the need of at least 1 dialysis session during the first 7 days after transplantation.

Statistical Analysis

Results are expressed as frequencies for categorical variables or as the mean ± standard deviation for continuous variables. Kruskal-Wallis, χ^2 , and analysis of variance were used to compare categorical, ordinal, or non-normally distributed continuous variables, and continuous normally distributed variables, respectively. All *P* values were 2-tailed, and a *P* value less than 0.05 was considered significant. Binomial and multinomial logistic regression analyses were carried out to study independent predictors of outcome variables. Variables with a *P* value less than 0.05 in the univariate analysis were included in the multivariate analysis.

RESULTS

During the study period, 1156 kidney transplants were performed. A total of 598 patients with a 6-week and 1-year biopsy with sufficient tissue for evaluation and with determination of dnDSA at the time of early and late biopsies were included. Reasons for exclusion are summarized in Figure 1. Of note, 242 patients were excluded because 6-week biopsy or 1-year biopsy was not performed due to graft loss before 6 weeks (*n* = 9), graft loss between 6 weeks and 1 year (*n* = 6), patient death before 6 weeks (*n* = 1), patient death between 6 weeks and 1 year (*n* = 25), medical contraindication (*n* = 24), declined consent (*n* = 16), early transfer to the local hospital responsible for long-term follow-up (*n* = 105), and loss of follow-up (*n* = 56).

Reasons for graft failure during the first year were primary vascular problems (*n* = 6), acute rejection (*n* = 4), never functioning graft (*n* = 2), recurrence of primary kidney disease (*n* = 1), and not clarified reason (*n* = 2).

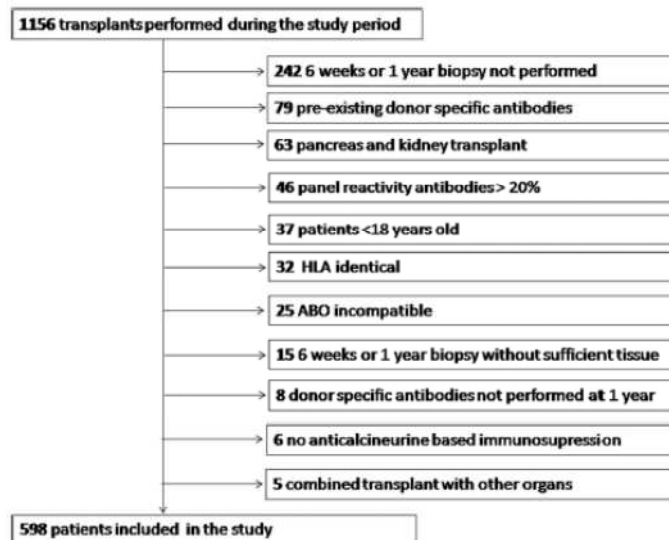


FIGURE 1. Patient flowchart.

Causes of death during the first year were septicemia ($n = 8$), malignancies ($n = 6$), myocardial infarction ($n = 2$), cerebrovascular accident ($n = 2$), pneumonia ($n = 2$), mesenteric infarction ($n = 1$), cardiac arrest ($n = 1$), liver failure ($n = 1$), accident ($n = 1$), suicide ($n = 1$), and unknown reason ($n = 1$).

Histological Diagnosis at 6 Weeks

A total of 598 surveillance biopsies obtained 6 weeks after transplantation were evaluated. Of those, 567 were representative according to Banff criteria showing at least 7 glomeruli and 1 artery and 31 biopsies were under the threshold of adequacy showing between 1 and 6 glomeruli. Histological

diagnoses were: normal (206), inflammation (29), IFTA (255), and IFTA+i (108). Thus, 12.3% (29 of 235) of patients had inflammation in biopsies without IFTA, whereas 29.8% (108 of 363) of patients had inflammation in biopsies already displaying IFTA ($P < 0.0001$).

Clinical Variables Associated With Histological Diagnosis at 6 Weeks

Characteristics of patients according to histological diagnosis at 6 weeks are summarized in Table 1. For multinomial logistic regression, the reference category was normal histology. The number of HLA-DR mm (odds ratio [OR], 2.59; 95%

TABLE 1.
Characteristics of patients according to histological diagnosis at 6 wk

	Normal 206	Inflammation 29	Fibrosis 255	IFTA+i 108	P
Donor age, y	44.6 ± 15.1	39.6 ± 17.4	56.8 ± 13.5 ^{a,b}	52.7 ± 14.8 ^{a,b,c}	<0.0001
Donor gender (female)	115 (55.8%)	16 (55.2%)	97 (38.0%)	46 (42.6%)	0.001
Recipient age, y	53.9 ± 14.7	49.7 ± 11.9	56.1 ± 13.7	55.1 ± 14.4	0.82
Recipient sex (female)	56 (27.2%)	11 (37.9%)	75 (29.4%)	23 (21.3%)	0.24
No. transplants >1	15 (7.3%)	4 (13.8%)	33 (12.9%)	13 (12.0%)	0.37
Living donor (yes)	79 (38.4%)	12 (41.4%)	61 (23.9%)	26 (24.1%)	0.0018
OLT, min	586 ± 394	518 ± 369	656 ± 365	647 ± 376	0.087
HLA-A mm	0.97 ± 0.62	1.03 ± 0.57	1.05 ± 0.63	1.046 ± 0.65	0.501
HLA-B mm	1.12 ± 0.68	1.31 ± 0.60	1.28 ± 0.64	1.42 ± 0.67	0.0012
HLA-DR mm	0.60 ± 0.62	0.93 ± 0.59 ^d	0.62 ± 0.61 ^b	0.83 ± 0.50 ^{a,c}	0.0005
PRA > 0 and ≤ 20% (yes)	3	0	4	0	0.548
DGF	11 (5.4%)	1 (3.4%)	20 (7.84%)	5 (4.6%)	0.5
CsA vs TAC (CSA yes)	84 (40.8%)	12 (41.8%)	135 (52.9%)	43 (39.8%)	0.007
AR before 6 wk	17 (8.3%)	3 (10.3%)	20 (7.8%)	15 (13.9%)	0.29
Recipient weight, kg	77.6 ± 14.6	83.6 ± 15.9 ^d	75.3 ± 15.8 ^b	80.6 ± 14.6 ^c	0.027

^a $P < 0.05$ versus normal.

^b $P < 0.05$ versus inflammation.

^c $P < 0.05$ versus IFTA.

OLT, cold ischemia time; HLA mm, human leukocyte antigen mismatches; DGF, delayed graft function; AR, acute rejection

confidence interval [95% CI], 1.28-5.25) and the use of CsA in comparison to TAC (OR, 2.32; 95% CI, 1.01-5.26) were independent predictors of inflammation at 6 weeks. Independent predictors of IFTA were donor age (OR, 1.06; 95% CI, 1.04-1.08), male donor sex (OR, 1.96; 95% CI, 1.29-2.99), and HLA-B mm (OR, 1.44; 95% CI, 1.05-1.98). Finally, independent predictors of IFTA+i were HLA-DR mm (OR, 2.16; 95% CI, 1.39-3.34), use of CsA in comparison to TAC (OR, 1.96; 95% CI, 1.17-3.33), HLA-B mm (OR, 1.79; 95% CI, 1.19-2.69), donor age (OR, 1.035; 95% CI, 1.02-1.05), and male donor sex (OR, 1.76; 95% CI, 1.05-2.96).

Serum creatinine at 6 weeks and at 1 year according to histological diagnosis at the time of the early surveillance biopsy is summarized in Figure 2.

Evolution of Histological Lesions Between 6 Weeks and 1 Year

From 6 weeks to 1 year after transplantation, Banff scores for interstitial inflammation (0.34 ± 0.70 vs 0.32 ± 0.69) and tubulitis (0.48 ± 0.78 vs 0.46 ± 0.75) were not significantly changed. Banff scores for interstitial fibrosis showed however a significant increase from 0.67 ± 0.59 to 0.85 ± 0.72 ($P < 0.0001$) and tubular atrophy from 0.80 ± 0.56 to 0.99 ± 0.66 ($P < 0.0001$).

Seventy-two of 598 patients (12.04%) had a ci score of 2 or greater at 1 year. In Figure 3, the relationship between histological diagnosis at 6 weeks and ci score of 2 or greater at 1 year is shown. In Table 2, clinical data and histological diagnosis at 6 weeks according to the presence of a ci score of 2 or greater at 1 year are summarized. Logistic regression analysis showed that donor age (OR, 1.04; 95% CI, 1.01-1.07), the presence of an episode of acute rejection before the 6-week biopsy (OR, 2.48; 95% CI, 1.18-5.20), the presence of an episode of acute rejection between 6-week and 1-year biopsy (OR, 2.38; 95% CI, 1.08-5.30), and the presence of IFTA+i in the 6 week biopsy (OR, 4.21; 95% CI, 1.80-9.90) were independent predictors of a ci score of 2 or greater at 1 year.

Predictors of dnDSA at 1 Year

Fifty-three of 598 patients (8.9%) had dnDSA at 1 year. In Table 3, clinical data and histological diagnosis at

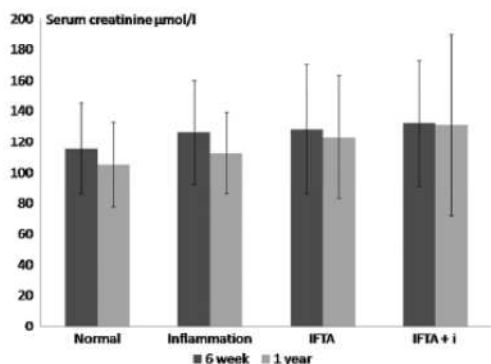


FIGURE 2. Serum creatinine according to histological diagnosis at 6 weeks and 1 year.

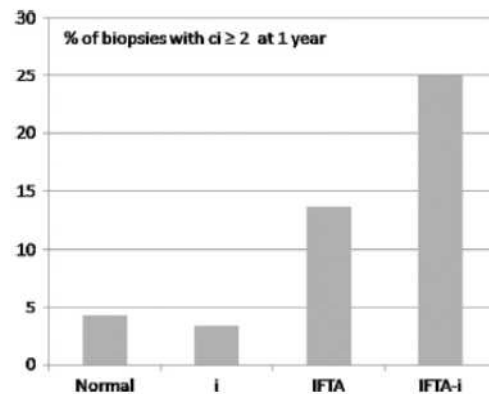


FIGURE 3. Relationship between histological diagnosis in 6 weeks surveillance biopsies and moderate or severe interstitial fibrosis (Banff ci score ≥ 2) in 1-year surveillance biopsies.

6 weeks according to the presence of dnDSA at 1 year are summarized. Logistic regression analysis including clinical and histologic data at 6 weeks showed that the number of HLA-DR mm (OR, 1.95; 95% CI, 1.09-3.49), inflammation in 6-week biopsy (OR, 5.49; 95% CI, 1.67-18.03) and IFTA+i at 6 weeks (OR, 4.09; 95% CI, 1.67-10.05) were independent predictors of dnDSA at 1 year. The analysis was repeated excluding the 12 patients with dnDSA at 6 weeks, and the results were not modified (data not shown).

Microcirculatory Injury, C4d Deposition and dnDSA

There was no association between microcirculatory injury at 6 weeks and dnDSA at 1 year but peritubular capillaritis

TABLE 2.

Characteristics of patients according to the presence of moderate or severe interstitial fibrosis (ci) at 1 y

	ci ≥ 2 (72)	ci < 2 (526)	P
Donor age, y	60.0 \pm 13.5	49.7 \pm 15.4	0.11
Donor sex (female)	25 (34.7%)	249 (47.3%)	0.04
Type of donor (living)	12 (16.6%)	166 (31.6%)	0.009
Recipient age, y	58.1 \pm 14.3	54.3 \pm 14.0	0.03
Recipient sex (female)	25 (34.7%)	249 (47.3%)	
CfT, min	718 \pm 351	610 \pm 380	0.02
CsA vs TAC (CsA yes)	41 (56.9%)	245 (46.6%)	rs
HLA-A mm	1.08 \pm 0.66	1.01 \pm 0.62	rs
HLA-B mm	1.26 \pm 0.67	1.25 \pm 0.66	rs
HLA-DR mm	0.74 \pm 0.55	0.66 \pm 0.61	rs
Number of transplant >1	6 (8.3%)	59 (11.2%)	rs
AR before 6-wk biopsy	11 (15.2%)	38 (7.2%)	0.01
AR between 6-wk and 1-y biopsies	12 (16.6%)	31 (5.8%)	0.0009
dnDSA 6 wk (yes)	3 (4.1%)	9 (1.7%)	rs
Histological diagnosis at 6 wk			0.0001
Normal	9 (12.5%)	197 (37.5%)	
Inflammation	1 (1.4%)	28 (5.3%)	
IFTA	35 (48.6%)	220 (41.8%)	
IFTA+i	27 (37.5%)	81 (15.4%)	

TABLE 3.
Characteristics of patients according to the presence of dnDSA at 1 y

	dnDSA yes (53)	dnDSA no (545)	P
Donor age, y	47.8 ± 17.6	51.3 ± 15.4	0.11
Donor sex (female)	24 (45.3%)	250 (45.9%)	0.93
Type of donor (living)	19 (35.8%)	159 (29.2%)	0.31
Recipient age, y	52.6 ± 14.2	55.0 ± 14.1	0.23
Recipient sex (female)	11 (20.8%)	154 (28.3%)	0.24
CIT, min	587 ± 396	627 ± 377	0.46
CsA vs TAC (CsA yes)	31 (58.5%)	255 (46.8%)	0.10
HLA-A mm	1.04 ± 0.59	1.02 ± 0.63	0.83
HLA-B mm	1.26 ± 0.65	1.25 ± 0.67	0.86
HLA-DR mm	0.96 ± 0.44	0.64 ± 0.61	0.0002
No. transplant >1	3 (5.6%)	62 (11.4%)	0.41
AR before 6-wk biopsy	5 (9.4%)	50 (9.2%)	0.95
AR between 6-wk and 1-yr biopsies	10 (18.9%)	33 (6.0%)	0.0006
dnDSA 6 wk (yes)	12 (22.6%)	0 (0.0%)	<0.0001
Historical diagnosis at 6 wk:			<0.0001
Normal	10 (18.9%)	196 (36.0%)	
Inflammation	9 (17.0%)	20 (3.7%)	
IFTA	11 (20.8%)	244 (44.8%)	
IFTA+i	23 (43.3%)	85 (15.5%)	

and C4d deposition at 1 year were more common in patients displaying dnDSA (Table 4).

DISCUSSION

The main finding of this surveillance biopsy analysis was that tubulointerstitial inflammation in biopsies without IFTA and in biopsies displaying IFTA+i at 6 weeks was associated with an increased prevalence of dnDSA at 1 year. Of note, the OR for dnDSA was similar in patients with inflammation and IFTA+i. On the contrary, microcirculatory injury at 6 weeks was not associated with an increased prevalence of dnDSA at 1 year, whereas the presence of dnDSA at 1 year was associated with microcirculatory injury at the same time.

Currently, AMR is regarded as a main cause of renal allograft failure¹² and the presence of DSA as an underlying necessity for its appearance.¹³ Our understanding of AMR has evolved in the last decade. Acute AMR was initially included in the 2003 Banff classification,¹⁴ chronic AMR in Banff 2005,¹⁵ and subclinical AMR^{10,16} was described few years later. Antibody-mediated rejection in patients with preformed DSA and dnDSA constitutes an evolving process that is manifested by different clinical phenotypes.¹⁷ In the present study, we confirm that there is a temporal association between early subclinical tubulointerstitial inflammation and an increased risk for development of dnDSA.^{7,8,18,19} Altogether, these observations suggest that tubulointerstitial inflammation may constitute a trigger of the complex process leading to dnDSA synthesis. In our study, microcirculatory injury at 6 weeks was not associated with presence of dnDSA 1 year after transplantation, whereas 1-year dnDSA was associated with the presence of microcirculatory injury in 1-year biopsies. Consequently, our data may indicate that microcirculatory injury is not a trigger but a consequence of dnDSA.

The risk of dnDSA at 1 year was similar in patients with inflammation and IFTA+i, suggesting that inflammation constitutes a risk factor for dnDSA regardless of the presence or absence of fibrosis. This observation, as far as we know, has not been made before. In previous studies, it has been described that IFTA+i, but not inflammation in the absence of IFTA, is associated with decreased graft survival.⁴ On the other hand, studies evaluating the relationship between early inflammation and the risk of dnDSA did not clarify whether the presence or absence of fibrosis in patients with inflammation modulates the risk of dnDSA. Thus, even mild inflammation in biopsies without fibrosis cannot be considered a nonsignificant lesion.

Risk factors associated with inflammation in biopsies without IFTA were the number of HLA-DR mm and the use of CsA in comparison to TAC, which can be considered surrogates of the alloimmune response. Donor age and male sex, representing surrogates of the quality of the kidney, and also HLA-B mm, were associated with IFTA. Finally, IFTA+i was associated with both: surrogates of the alloimmune response, that is, use of CsA, HLA-DR and HLA-B mm, as well as surrogates of the quality of the kidney such as donor age and male sex. Of note, the number of HLA-B mm can be considered a surrogate of the alloimmune response and was associated with IFTA. This association suggests that apart from preexisting donor-related chronic damage, alloimmune response might contribute to interstitial fibrosis in the absence of significant inflammation. This idea is in agreement with the observation that inflammation-related genes are upregulated in patients with chronic injury.^{20,21}

The prevalence and intensity of inflammation is lower in TAC-treated patients than CsA-treated patients, a result that was confirmed in the present study.²²⁻²⁵ However, it is not known whether the use of immunosuppressive regimens associated with a low prevalence of subclinical inflammation is also associated with a decreased risk of dnDSA. In the present study, the probability to develop dnDSA was similar in patients treated with CsA and TAC. Nevertheless, in some clinical trials, it has been described that the risk of dnDSA is associated with the immunosuppressive schedule.^{26,27} Unfortunately, in these trials, surveillance biopsies were not done. Thus, the question whether prevention of early inflammation constitutes a strategy to prevent dnDSA deserves further study.

TABLE 4.
Microcirculatory injury at 6 wk and at 1 y in patients with and without donor-specific antibodies at 1 y

Microcirculatory injury at 6 wk	dnDSA, Yes at 1 y (53)	dnDSA, No at 1 y (545)	P
g	0 (0%)	5 (0.91%)	0.92
ptc	3 (5.66%)	8 (1.46%)	0.11
C4d	1 (1.88%)	1 (0.18%)	0.42
cg	0 (0%)	0 (0%)	1.00
Microcirculatory injury at 1 y			
g	1 (1.88%)	3 (0.55%)	0.80
ptc	5 (9.43%)	8 (1.46%)	0.0001
C4d	9 (16.98%)	5 (0.92%)	0.0001
cg	0 (0%)	7 (1.28%)	0.88

g, glomerulitis > 0; ptc, peritubular capillaritis > 0; C4d positive in ≥ 50% of peritubular capillaries; cg, chronic glomerulopathy > 0.

The presence of IFTA+i, but not inflammation without IFTA at 6 weeks, was an independent predictor of the presence of moderate to severe interstitial fibrosis (ci score ≥ 2) at 1 year. Other independent predictors of the presence of ci score of 2 or greater at 1 year were donor age, the presence of a clinical episode of acute rejection before the 6 weeks surveillance biopsy, and the presence of an episode of acute rejection between the 2 surveillance biopsies. Altogether, these data not only suggest that clinical episodes of acute rejection constitute a driving force for the progression of fibrosis but also point out that in patients with fibrosis, superimposed inflammation accelerates the progression of fibrosis during the first year.


Our study has limitations. The most important one is the short follow-up of patients not allowing us to evaluate the relationship between inflammation, progression of interstitial fibrosis, dnDSA, and graft survival. Moreover, the relationship between type of treatment and inflammation or dnDSA cannot be properly analyzed since CsA was subscribed to patients at increased risk for posttransplant diabetes mellitus.

In summary, early subclinical inflammation in biopsies with or without tubulointerstitial chronic lesions, together with HLA DR mm, are associated with an increased risk of development of dnDSA 1 year after transplantation. In patients with IFTA+i in early biopsies, there is an increased risk for the progression of fibrosis at 1 year. Because type of immunosuppressive treatment modulates the severity of subclinical inflammation, it will be worth to explore whether treatment regimens associated with low prevalence of subclinical inflammation may in turn prevent the appearance of dnDSA.

REFERENCES

- Nankivil BJ, Borrows RJ, Fung CL, et al. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation*. 2004;78:242-249.
- Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, et al. Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: ten-year experience at a single center. *Am J Transplant*. 2005;5:1354-1360.
- Shishido S, Asanuma H, Nakai H, et al. The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1046-1052.
- Moreso F, Ibarren M, Goma M, et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant*. 2006;6:747-752.
- Park WD, Griffin MD, Cornell LD, et al. Fibrosis with inflammation at one year predicts transplant functional decline. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:1987-1997.
- Bestard O, Cruzado JM, Lucia M, et al. Prospective assessment of antidonor cellular alloreactivity is a tool for guidance of immunosuppression in kidney transplantation. *Kidney Int*. 2013;84:1226-1236.
- Moreso F, Carrera M, Goma M, et al. Early subclinical rejection as a risk factor for late chronic humoral rejection. *Transplantation*. 2012;93:41-46.
- Webe C, Gibson W, Blydt-Hansen TD, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant*. 2012;12:1157-1167.
- Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: antibody-mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*. 2010;10:464-471.
- Haas M, Montgomery RA, Segov DL, et al. Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. *Am J Transplant*. 2007;7:576-585.
- Dorje C, Midvedt K, Holdaas H, et al. Early versus late acute antibody-mediated rejection in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2013;96:79-84.
- Sellares 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;12:388-399.
- 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;14:272-283.
- Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant*. 2004;4:1562-1566.
- 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;7:518-526.
- Loupy A, Vemerey D, Tinel C, et al. Subclinical rejection phenotypes at 1 year post-transplant and outcome of kidney allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:1721-1731.
- Mengel M, Husain S, Hidaigo L, et al. Phenotypes of antibody-mediated rejection in organ transplants. *Transplant*. 2012;25:611-622.
- El Ters M, Grande JP, Kaddis MT, et al. Kidney allograft survival after acute rejection: the value of follow-up biopsies. *Am J Transplant*. 2013;13:2334-2341.
- Heilman RL, Nijm A, Desmarteau YM, et al. De novo donor-specific human leukocyte antigen antibodies early after kidney transplantation. *Transplantation*. 2014;98:1310-1315.
- Park W, Griffin M, Grande JP, et al. Molecular evidence of injury and inflammation in normal and fibrotic renal allografts one year posttransplant. *Transplantation*. 2007;83:1466-1476.
- Dean PG, Park WD, Cornell LD, et al. Intra-graft gene expression in positive crossmatch kidney allografts: ongoing inflammation mediates chronic antibody-mediated injury. *Am J Transplant*. 2012;12:1551-1563.
- Moreso F, Seron D, Carrera M, et al. Baseline immunosuppression is associated with histological findings in early protocol biopsies. *Transplantation*. 2004;78:1064-1068.
- Seron D, O'Valle F, Moreso F, et al. Immunophenotype of infiltrating cells in protocol renal allograft biopsies from tacrolimus-versus cyclosporine-treated patients. *Transplantation*. 2007;83:649-652.
- Anil Kumar MS, Ifan Saeed M, Ranganna K, 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*. 2008;20:32-42.
- Kanzelmeier NK, Ahlenstiel T, Kreuzer M, et al. Correlations with six-month protocol biopsy findings in pediatric transplant recipients on low- and regular-dose CNi regimens. *Clin Transplant*. 2013;27:319-323.
- Liefeldt L, Brakemeier S, Glander P, et al. Donor-specific HLA antibodies in a cohort comparing everolimus with cyclosporine after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2012;12:1192-1198.
- de Sandes-Freitas TV, Felipe CR, Campos EF, et al. Subclinical lesions and donor-specific antibodies in kidney transplant recipients receiving tacrolimus-based immunosuppressive regimen followed by early conversion to sirolimus. *Transplantation*. 2015;99:2372-2381.

Kidney allograft subclinical rejection modulates systemic inflammation measured by C-reactive protein at 1 year after transplantation

Clara García-Carro¹  | Christina Dörje² | Anders Åsberg^{2,3} |
Karsten Midtvedt² | Helge Scott⁴ | Finn P. Reinholt⁴ | Hallvard Holdaas² |
Anna V. Reisæter² | Daniel Seron¹

¹Nephrology Department Hospital Universitari Vall d'Hebron and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Department of Transplant Medicine, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway

³Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo, Oslo, Norway

⁴Department of Pathology, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway

Correspondence

Daniel Seron, MD, PhD, Nephrology Department Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.
Email: dseron@vhebron.net

Funding information

EkstraStiftelsen Helse og Rehabilitering; Instituto Carlos III, Grant/Award Number: PI14/01383 and PIE13/00027; Red de Investigación renal REDinREN, Grant/Award Number: 16/0009/30; Spanish Society of Nephrology

Abstract

Kidney allograft inflammation is associated with proinflammatory modifications of peripheral blood mononuclear cells, suggesting that renal inflammation contributes to systemic inflammation. Thus, the aim of this study was to evaluate the relationship between subclinical inflammation in surveillance biopsies performed at 1 year and systemic inflammation assessed by C-reactive protein (CRP) levels at the time of biopsy. We analyzed 544 surveillance biopsies performed at 1 year that were classified as normal ($n = 368$), borderline ($n = 148$), or subclinical rejection (SCR) ($n = 28$). CRP levels were divided into quartiles. Patients in 1st, 2nd, and 3rd quartile were classified as low CRP ($n = 408$) and patients in the 4th quartile as high CRP ($n = 136$). Univariate analysis showed that the proportion of patients with SCR was higher in the high CRP group (10.3% vs 3.4%, $P = 0.0067$). Multivariate analysis showed that independent predictors of high CRP were body mass index (odds ratio [OR] 1.072 and 95% confidence interval [CI] 1.027–1.119), a positive urine culture at the day of the biopsy (OR 2.760 and 95% CI 1.205–6.323), and the presence of SCR at 1-year surveillance biopsy (OR 7.260 and 95% CI 3.530–14.935). In summary, we describe that subclinical acute rejection constitutes an independent predictor of systemic inflammation as measured by CRP.

KEYWORDS

C-reactive protein, graft inflammation, surveillance allograft biopsy, systemic inflammation

1 | INTRODUCTION

C-reactive protein (CRP) is an acute phase reactant produced by the liver and other tissues in response to tissue damage and inflammation that is routinely employed in clinical practice to evaluate acute and chronic inflammation.¹ Chronic elevation of CRP is associated with all-cause mortality, especially cardiovascular mortality, and an increased risk for renal function deterioration.^{2–5} Classical cardiovascular risk factors such as age, smoking, obesity, and diabetes mellitus

are associated with increased CRP levels and, in patients with chronic kidney disease (CKD), degree of renal impairment constitutes an independent predictor of CRP.^{6,7} CRP is increased in kidney transplants with a failed graft returning to hemodialysis in comparison with incident hemodialysis patients, and resection of the failed graft is followed by a decrease in CRP levels.^{8,9}

Kidney transplantation is the treatment of choice for CKD. In kidney transplant recipients, CRP is also associated with cardiovascular events, all-cause mortality,¹⁰ and an accelerated deterioration of graft

function and graft loss.^{11,12} Kidney allograft surveillance biopsy studies have shown that a proportion of patients display mild-to-moderate renal inflammation, mainly tubulointerstitial mononuclear cell infiltration.¹³ In patients with a clinical episode of acute rejection, there is evidence of increased systemic inflammation as measured with the determination of proinflammatory gene activation in peripheral blood mononuclear cells (PBMC)¹⁴ or as the capacity of cultured PBMC to synthesize proinflammatory cytokines. On the other hand, the presence of subclinical inflammation is associated with progression of tubulointerstitial chronic lesions, an increased risk of donor-specific antibodies.^{15,16} Additionally, subclinical inflammation is associated with increased chemokine urinary excretion.¹⁵ However, it is not known whether subclinical inflammation can modulate systemic inflammation as measured by CRP. Thus, the aim of this study was to evaluate the relationship between the presence of borderline changes and/or subclinical rejection in 1-year surveillance biopsies and CRP levels at the time of biopsy.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Patients

Standard immunological risk patients receiving a single kidney transplant at Oslo University Hospital Rikshospitalet between January 2009 and December 2012 with stable renal function, creatinine ≤ 300 $\mu\text{mol/L}$ and proteinuria $\leq 1+$ at urine dipstick at 1 year, treated with a calcineurin inhibitor (CNI)-based immunosuppressive regimen were considered. Standard immunological risk was defined as a negative cytotoxic T- and B-cell cross-match, panel reactive antibody $\leq 20\%$, and negative donor-specific antibodies before transplantation. Patients receiving a kidney from a human leukocyte antigen (HLA) identical or ABO incompatible donor were excluded. Finally, patients with a 1-year (± 2 month) surveillance biopsy and determination of high sensitive CRP (hsCRP) at the time of biopsy were included.

Biopsies were performed in the outpatient clinic. Before biopsy, all patients were examined and temperature and blood pressure were determined to discard fever or uncontrolled hypertension. A blood sample for hemogram, coagulation factors, and biochemistry was collected at day of biopsy. Urine culture was collected the day of the biopsy or up until 4 days before.

The study was approved by the South-Eastern Regional Committee for Medical and Health Research Ethics in Norway 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. All patients gave their written informed consent.

2.2 | Biopsies

Two cores were obtained with ultrasound guidance using an 18 gauge spring-loaded biopsy gun, one for histology (hematoxylin eosin and saffron, periodic acid-Schiff and Masson's trichrome) and one for C4d. All biopsies contained at least one glomerular section and sufficient tubulointerstitial tissue to grade interstitial lesions. C4d was stained

with indirect immunofluorescence on frozen sections (monoclonal antibody; Quidel, San Diego, CA, USA). Renal lesions were graded according to the Banff criteria^{17,18} as normal (i 0-3, t0), borderline (i 0-1, t 1-3; i 2-3, t 1), or subclinical rejection (SCR) (i 2-3, t 2-3).

2.3 | Anti-HLA antibodies

Immunomagnetic cytotoxic T- and B-cell cross-matches were performed at the time of transplantation in all recipients. Additional testing on the Luminex platform LX200, using the LSM12-screening kit (One Lambda) for the identification of HLA class I and class II, was performed. IgG antibody specificities were examined using single-antigen-coated flow beads provided by One Lambda at transplantation and at the time of 1-year surveillance biopsy. We used a mean fluorescence intensity of 1000 as a cutoff value. As a negative control, we used serum (LS-NC) delivered by the kit producer (One Lambda).

2.4 | Clinical and analytical variables

All patients received induction therapy with basiliximab followed by a CNI-based regimen (either cyclosporine or tacrolimus) in combination with mycophenolate and prednisone as previously described.¹⁶ Cyclosporine-based immunosuppression was used in recipients older than 50 years and in younger patients with impaired glucose tolerance, tested prior to transplantation, as a strategy to limit the CNI impact on post transplantation diabetes mellitus (DM). Acute cellular rejections were treated with intravenous methylprednisolone, total dosage of 1375 mg, divided into 5 infusions. The oral prednisone dose was increased to 30 mg/d and tapered 5 mg every other week. In case of steroid-resistant rejection, rabbit antithymocyte globulin was administered. Acute antibody-mediated rejection was additionally treated with plasmapheresis and/or intravenous immunoglobulin. Routinely, 5 plasmapheresis sessions were performed with replacement preferentially 4% albumin in Ringer's (50 mL/kg bodyweight). In therapy-resistant cases, rituximab or rabbit antithymocyte globulin was administered. Delayed graft function was defined as the need of at least one dialysis session during the first 7 days after transplantation.

High sensitive C-reactive protein was measured the day of obtaining the biopsy, using a turbidometric immunoassay (Roche Modular Kit) on the Roche Modular analyzer (F. Hoffmann-La Roche, Mannheim, Germany). Lower level of quantification was 0.06 mg/L. The coefficient of variation was $\leq 7.5\%$ (for CPR > 5 mg/L). Laboratory reference interval ranged from 0 to 4 mg/L and the accredited reporter range was 0.6–700 mg/L.

2.5 | Statistical analysis

Results are expressed as frequencies for categorical variables or as the mean \pm standard deviation for continuous variables. Kolmogorov-Smirnov test was employed to check normal distribution of quantitative variables. Chi-squared, Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis and *t* test or ANOVA were used to compare categorical, ordinal or non-normally distributed continuous variables and continuous normally distributed variables, respectively. All *P*-values were two-tailed

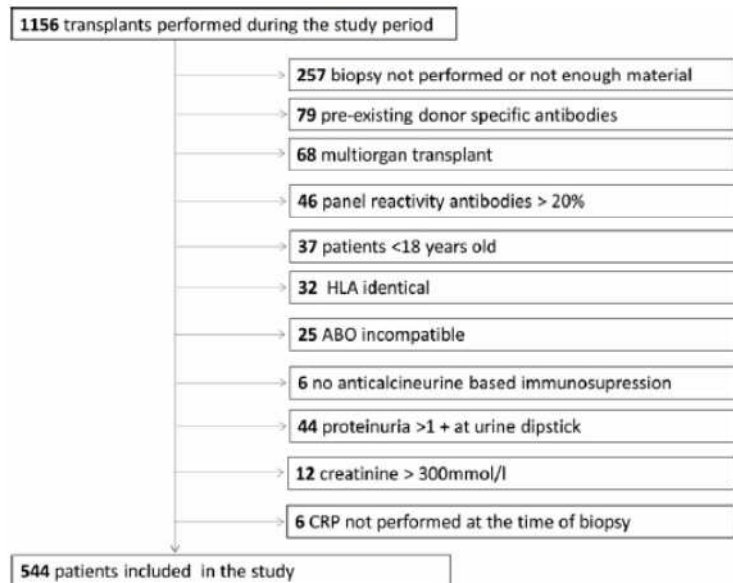


FIGURE 1 Flowchart

and a *P*-value less than .05 was considered significant. hsCRP levels were not normally distributed even after logarithmic transformation, and accordingly, hsCRP levels were divided into tertiles, quartiles, and quintiles. We analyzed the association between histological diagnosis (normal histology, borderline changes, and SCR) and hsCRP expressed as tertiles, quartiles, and quintiles. The best association between histological diagnosis and hsCRP was obtained when hsCRP was classified into quartiles. To simplify the analysis, hsCRP levels were binarized (see "Results"). Mean hsCRP values were calculated, considering a zero value for results below the lower level of quantification. Binomial logistic regression analysis was carried out to study independent predictors of hsCRP serum levels. Variables with a *P* value less than .05 in the univariate analysis were included in the multivariate analysis.

3 | RESULTS

3.1 | Patients and biopsies

A total of 544 patients accomplished the inclusion criteria of 1156 kidney transplants performed during the study period. Reasons for exclusion are summarized in Figure 1. In 257 patients, the biopsy was not evaluated or performed due to insufficient tissue for evaluation (*n* = 15), graft loss before 1 year (*n* = 15), patient death before 1 year (*n* = 26), medical contraindication (*n* = 24), declined consent (*n* = 16), and unable/unwilling to come to the 1-year investigation at Rikshospitalet (*n* = 161). Reasons for graft failure during the first year were primary vascular problems (*n* = 6), acute rejection (*n* = 4), never functioning graft (*n* = 2), recurrence of primary kidney disease (*n* = 1), and not clarified reason (*n* = 2). Causes of death during the first year were septicemia (*n* = 8), malignancies (*n* = 6), myocardial infarction (*n* = 2), cerebrovascular accident (*n* = 2), pneumonia (*n* = 2),

mesenteric infarction (*n* = 1), cardiac arrest (*n* = 1), liver failure (*n* = 1), accident (*n* = 1), suicide (*n* = 1), and unknown reason (*n* = 1).

There were 498 representative biopsies of 544 biopsies according to Banff criteria showing at least 7 glomeruli, and 46 of 544 biopsies were under the threshold of adequacy showing between 1 and 6 glomeruli.

3.2 | Distribution of patients according to hsCRP levels at 1 year

High sensitive C-reactive protein was not normally distributed. Thus, it was divided into quartiles as described in "Statistical analysis." In Table 1, mean \pm standard deviation and range of each quartile are summarized. The proportion of patients with the histological diagnosis of acute rejection was significantly higher in quartile 4 than in quartiles 1, 2, and 3 (Figure 2A). For this reason, patients were reclassified into two groups as low hsCRP (*n* = 408), including quartiles 1, 2, and 3, and high hsCRP (*n* = 136), including quartile 4, as shown in Figure 2B.

3.3 | Clinical variables associated with hsCRP levels

Characteristics of patients according to their hsCRP level are summarized in Tables 2 and 3. Patients with high hsCRP received a lower proportion of grafts from female donors (36.8% vs 47.8%, *P* = .025), had higher BMI (27.8 \pm 5.4 vs 26.1 \pm 4.6, *P* < .0001), showed higher prevalence of pretransplantation DM (24.6% vs 15.8%, *P* = .020), and a higher proportion of positive urine culture obtained at day of biopsy or 4 days before (19.1% vs 3.7%, *P* < .0001). The biopsy in patients with high hsCRP showed a higher proportion of SCR (10.3% vs 3.4%, *P* = .0067).

Multivariate logistic regression is summarized in Table 4. Independent predictors of high hsCRP levels in the multivariate logistic regression were BMI (odds ratio [OR] 1.072 and 95% confidence

	1st quartile: very low hsCRP	2nd quartile: low hsCRP	3rd quartile: intermediate hsCRP	4th quartile: high hsCRP
N	136	136	136	136
Mean ± SD	0.13 ± 0.26	1.16 ± 0.32	2.63 ± 0.60	11.57 ± 12.73
Range	<0.75	0.75-1.79	1.80-3.93	3.94-91

TABLE 1 hsCRP distribution according to quartiles

N, number of patients; SD, standard deviation; hsCRP, high sensitive C-reactive protein.

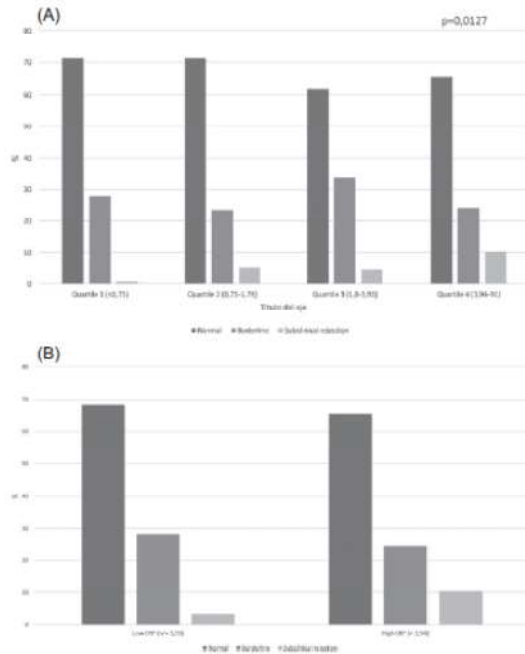


FIGURE 2 A, Distribution of histological diagnosis in each CRP quartile (chi-squared $P = .0127$). B, Reclassification of patients in two groups according to CRP levels and histology diagnosis in 1-year biopsy

interval [CI] 1.027-1.119), a positive urine culture (OR 2.760 and 95% CI 1.205-6.323), and the presence of SCR at 1-year surveillance biopsy (OR 7.260 and 95% CI 3.530-14.935).

3.4 | Diagnostic value of hsCRP

We evaluated the potential utility of high hsCRP for the diagnosis of SCR. Sensitivity was 50%, specificity 76%, positive predictive value 11%, and negative predictive value 79%.

4 | DISCUSSION

In the present study, we show that renal allograft inflammation in 1-year surveillance biopsies is an independent predictor of increased hsCRP levels. However, hsCRP was only elevated in patients with SCR but not in patients with borderline changes in whom hsCRP

TABLE 2 Clinical variables according to hsCRP (mg/L) levels at 1 y after transplantation

	Low CRP (N = 408)	High CRP (N = 136)	P
Donor age (y)	50.6 ± 15.0	51.5 ± 16	.5451
Donor sex (fem)	195 (47.8%)	50 (36.8%)	.025
Recipient age (y)	54.5 ± 14.3	56.4 ± 13.1	.169
Recipient sex (fem)	114 (27.9%)	42 (30.9%)	.431
No. of transplantation >1	45 (11%)	16 (11.8%)	.814
Living donor	127 (31.1%)	31 (22.8%)	.064
HLA A mismatch >0	329 (80.6%)	112 (82.3%)	.196
HLA B mismatch >0	358 (87.7%)	116 (85.3%)	.547
HLA DR mismatch >0	246 (60.3%)	77 (56.6%)	.572
Presence of DGF	26/405 (6.4%)	9/135 (6.7%)	.920
CsA vs TAC (CsA)	189 (46.3%)	69 (50.7%)	.796
TAC levels at time of biopsy (ng/mL), n = 289	6.207 ± 2.398	6.177 ± 1.946	.929
CsA levels at time of biopsy (ng/mL), n = 195	145.39 ± 143.0	189.51 ± 225.79	.113
Creatinine 1 y (mmol/L)	114.3 ± 34.4	119.5 ± 40.1	.146
eGFR(mL/min/1.73 m ²)			.121
<30	15 (3.7%)	8 (5.9%)	
31-60	211 (51.7%)	80 (58.8%)	
>60	182 (44.6%)	48 (35.3%)	

HLA, human leukocyte antigen; CsA, cyclosporine; TAC, tacrolimus; eGFR, estimated glomerular filtration rate (CKD-EPI); hsCRP, high sensitive C-reactive protein.

levels were not different from patients without kidney inflammation. This observation suggests that the relationship between the severity of renal inflammation and hsCRP levels does not follow a linear pattern. Other independent predictors of increased hsCRP were the presence of urinary tract infection at time of biopsy and BMI. These are expected findings, as a close relationship between infection or obesity and hsCRP levels has been repeatedly described in different populations.^{19,20} Both conditions, infection and increased BMI, are characterized by cytokine release favoring liver CRP production.

TABLE 3 Clinical variables according to hsCRP levels at 1 y after transplantation

	Low CRP (N = 408)	High CRP (N = 136)	P
Urine dipstick proteinuria			.139
Negative	298/386 (77.2%)	87/126 (69%)	
Trace	60/386 (15.5%)	29/126 (23%)	
1+	28/386 (7.3%)	10/126 (8%)	
BMI 1 y (kg/m ²)	26.1 ± 4.6	27.8 ± 5.4	.0005
De novo DSA at 1 y after transplant	31 (7.6%)	11 (8.1%)	.853
SBP (mm Hg)	132.5 ± 14.2	133.0 ± 14.9	.759
DBP (mm Hg)	77.8 ± 9.8	78.4 ± 10.2	.499
Pretransplant DM	64/406 (15.8%)	33/134 (24.6%)	.020
Prednisone mg 1 y	5.5 ± 3.8	5.7 ± 2.6	.622
Smoking			.288
Active	69/403 (17.1%)	27/134 (20.1%)	
Never	200/403 (49%)	56/134 (41.8%)	
Earlier	134/403 (32.9%)	51/134 (38.1%)	
Positive urine culture	15 (3.7%)	26 (19.1%)	<.0001
Biopsy diagnosis			.0067
Normal	279 (68.4%)	89 (65.4%)	
Borderline	115 (28.2%)	33 (24.3%)	
SCR	14 (3.4%)	14 (10.3%)	
AR before 6 wk after transplantation	39 (9.5%)	9 (6.61%)	.295
AR at 6 wk after transplantation	33 (8.09%)	9 (6.62%)	.587
AR between 6 wk and 1 y after transplantation	27 (6.62%)	7 (5.15%)	.539
BK	5 (1.22%)	1 (0.73%)	.6355
CMV	3 (0.73%)	1 (0.73%)	.7382

DSA, donor-specific antibodies; BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; DM, diabetes mellitus; SCR, subclinical rejection; AR, acute rejection; BK virus, polyomavirus viremia at the time of biopsy; CMV, cytomegalovirus viremia in treatment at the time of biopsy; hsCRP, high sensitive C-reactive protein.

TABLE 4 Independent predictors of high hsCRP levels. Multivariate logistic regression

	OR	95% CI	P
Donor sex (male)	1.524	0.988-2.350	.0566
BMI 1 y	1.072	1.027-1.119	.0016
Pretransplant DM	1.335	0.791-2.253	.2797
Positive urine culture	7.260	3.530-14.935	<.0001
Biopsy diagnosis			
Borderline	0.893	0.549-1.452	.6475
SCR	2.760	1.205-6.323	.0163

OR, odds ratio; CI, confidence interval; BMI, body mass index; DM, diabetes mellitus; SCR, subclinical rejection.

To the best of our knowledge, this is the first time that an association between subclinical rejection and hsCRP levels has been described, pointing out that specific conditions

affecting the transplant contribute to increase systemic inflammation with independence of classical cardiovascular risk factors or renal function.^{12,21} In patients with a failed graft returning to dialysis, CRP levels are increased in comparison with incident hemodialysis patients, showing that the inflamed graft contributes to systemic inflammation.⁹ Renal allograft inflammation in functioning grafts modulates the production of proinflammatory cytokines such as IL-6 and IL-1 β ²² and proinflammatory gene expression by peripheral blood mononuclear cells that may contribute to CRP liver production.¹⁴

C-reactive protein is not only synthesized in the liver but also in the kidney. However, the relationship between renal CRP production and CRP levels is not fully understood. Cultured renal cortical tubular cells express and shed CRP in the medium after stimulation with IL-6.²³ Moreover, CRP mRNA expression is increased in renal allograft biopsies from patients with acute rejection but not in patients with acute tubular necrosis.²³

Elevated CRP is associated with increased mortality in kidney transplant patients. CRP is an innate immunity protein that recognizes phosphocholine and glycans on the surface of different microorganisms. It also recognizes autologous ligands as lipoproteins on the cellular membrane of necrotic and apoptotic cells,²⁴ and activates the classical complement pathway, contributing to the defense against infection and to tissue healing. It has been shown that CRP recognizes oxidized LDL deposited in atherosclerotic plaques contributing to plaque inflammation and instability.²⁵ Thus, our data suggest that subclinical acute rejection may contribute to the increased cardiovascular risk observed in kidney transplant recipients.

C-reactive protein is a nonspecific rough marker of systemic inflammation. In the present study, we also evaluated the potential utility of CRP levels to diagnose SCR. However, the sensibility and sensitivity of high hsCRP to detect SCR were too low to consider high hsCRP levels of any utility to diagnose patients with SCR.

This study has limitations. It is a single-center observational study and CRP was only determined at the time of biopsy. The large number of patients included may overcome this first limitation. Furthermore, some variables that might influence CRP levels were not available as for example the use of statins. Time of follow-up was short, not allowing to explore the consequences of high CRP on long-term outcome. However, it is already described in previous studies that elevated CRP is associated with increased cardiovascular mortality. Our study raises the question whether SCR may constitute an independent cardiovascular risk factor and hypothesis that deserves further investigation.

In summary, we describe that SCR constitutes an independent predictor of systemic inflammation as measured by CRP. These data raise the question whether renal allograft inflammation might contribute to increased cardiovascular risk profile in stable kidney transplant recipients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Instituto de Salud (ISCIII) grant PI14/01383, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), and European Regional Development's Funds (FEDER) REDinREN grant RD 16/0009/0030. García-Carro C was supported by a Fundación SENEPRO grant for International stages in 2015. Dörje C was supported by a grant from the Norwegian Foundation for Health and Rehabilitation.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Clara García-Carro: Contributed to the study design, collected clinical variables, participated in data analysis, and writing of the manuscript; Christina Dörje: Contributed to the study design, collected clinical variables, participated in data analysis, and critical revision of the manuscript; Anders Åsberg: Contributed to the study design,

participated in data analysis, and critical revision of the manuscript; Karsten Midtvedt: Contributed to the study design and critical revision of the manuscript; Helge Scott: Evaluated the biopsies and contributed to the critical revision of the manuscript; Finn P. Reinholt: Evaluated the biopsies and contributed to the critical revision of the manuscript; Hallvard Holdaas: Contributed to the study design and critical revision of the manuscript; Daniel Seron: Contributed to the study design, participated in data analysis, and writing of the manuscript; Anna V. Reisæter: Contributed to the study design and critical revision of the manuscript.

ORCID

Clara García-Carro  <http://orcid.org/0000-0003-0546-2274>

REFERENCES

- Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340:448-454.
- Makita S, Nakamura M, Satoh K, et al. Serum C-reactive protein levels can be used to predict future ischemic stroke and mortality in Japanese men from the general population. *Atherosclerosis*. 2009;204:234-238.
- Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein and all-cause mortality—the Copenhagen City Heart Study. *Eur Heart J*. 2010;31:1624-1632.
- Proctor MJ, McMillan DC, Horgan PG, Fletcher CD, Talwar D, Morrison DS. Systemic inflammation predicts all-cause mortality: a Glasgow inflammation outcome study. *PLoS ONE*. 2015;10:e0116206.
- Bazeley J, Bieber B, Li Y, et al. C-reactive protein and prediction of 1-year mortality in prevalent hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6:2452-2461.
- Panichi V, Migliori M, De Pietro S, et al. C-reactive protein and interleukin-6 levels are related to renal function in predialytic chronic renal failure. *Nephron*. 2002;91:594-600.
- Stuveling EM, Hillege HL, Bakker SJL, Gans ROB, De Jong PE, De Zeeuw D. C-reactive protein is associated with renal function abnormalities in a non-diabetic population. *Kidney Int*. 2003;63:654-661.
- López-Gómez JM, Pérez-Flores I, Jofré R, et al. Presence of a failed kidney transplant in patients who are on hemodialysis is associated with chronic inflammatory state and erythropoietin resistance. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2494-2501.
- Gorgulu N, Yelken B, Caliskan Y, et al. Endothelial dysfunction in hemodialysis patients with failed renal transplants. *Clin Transplant*. 2010;24:678-684.
- Abedini S, Holme I, März W, et al. Inflammation in renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:1246-1254.
- van Ree RM, Oterdoom LH, de Vries APJ, et al. Elevated levels of C-reactive protein independently predict accelerated deterioration of graft function in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22:246-253.
- Dahle DO, Mjølne G, Oqvist B, et al. Inflammation-associated graft loss in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26:3756-3761.
- 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*. 2003;349:2326-2333.
- Roedder S, Sigdel T, Salomonis N, et al. The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: results of the multicenter AART study. *PLoS Med*. 2014;11:e1001759.

15. 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;12:1157-1167.
16. Garcia-Carro C, Dörje C, Åsberg 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;101:1410-1415.
17. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*. 2010;10:464-471.
18. 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;14:272-283.
19. Aronson D, Bartha P, Zinder O, et al. Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28:674-679.
20. Takemura Y, Ishida H, Saitoh H, et al. Economic consequence of immediate testing for C-reactive protein and leukocyte count in new outpatients with acute infection. *Clin Chim Acta*. 2005;360:114-121.
21. Cottone S, Palermo A, Vaccaro F, et al. Inflammation and endothelial activation are linked to renal function in long-term kidney transplantation. *Transpl Int*. 2007;20:82-87.
22. Batal I, De Serres SA, Mfarrej BG, et al. Glomerular inflammation correlates with endothelial injury and with IL-6 and IL-1 β secretion in the peripheral blood. *Transplantation*. 2014;97:1034-1042.
23. Jabs WJ, Lögering BA, Gerke P, et al. The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. *Eur J Immunol*. 2003;33:152-161.
24. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003;111:1805-1812.
25. de Beer FC, Soutar AK, Baltz ML, Trayner IM, Feinstein A, Pepys MB. Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated C-reactive protein. *J Exp Med*. 1982;156:230-242.

How to cite this article: Garcia-Carro C, Dörje C, Åsberg A, et al. Kidney allograft subclinical rejection modulates systemic inflammation measured by C-reactive protein at 1 year after transplantation. *Clin Transplant*. 2018;32:e13196. <https://doi.org/10.1111/ctr.13196>

7. RESULTADOS GLOBALES Y DISCUSIÓN

El trabajo de investigación de esta tesis proviene de una observación derivada de la práctica clínica habitual. En las últimas décadas, los resultados globales del trasplante renal han mejorado de manera prácticamente exponencial. Se ha conseguido evitar la pérdida temprana del injerto, siendo en la actualidad casi anecdótica, y limitar en gran medida las complicaciones infecciosas derivadas de los regímenes de inmunosupresión antiguos. Este hecho acontece de manera global y los resultados generales del trasplante renal en diferentes estados del actual primer mundo, con programas de trasplante diferentes, son superponibles.

Sin embargo, pese a los grandes avances mencionados, la supervivencia del injerto a medio-largo plazo no ha aumentado de manera llamativa en los últimos años. A los 10 años del trasplante, el 25-40% de los pacientes han perdido el injerto, requiriendo tratamiento dialítico. De la misma manera que las mejoras globales, la supervivencia del injerto a largo plazo también es similar entre diferentes territorios europeos. En los registros catalán y noruego, tomados como referencia por llevarse a cabo el estudio de esta tesis en Noruega y presentarse en Barcelona, apenas hay diferencias según el Registre de Malalts Renals de Catalunya 2015 (26) y The Norwegian Renal Registry 2016 (24).

Existe otro dato que es muy similar entre las diferentes poblaciones trasplantadas y sobre el cual no se ha logrado actuar de manera decisiva: la causa de muerte de los pacientes portadores de un injerto renal. Tanto en la población catalana trasplantada como en la población noruega, la principal causa de muerte es la cardiovascular (35-40%). La carga cardiovascular de los pacientes trasplantados es bien conocida, tanto derivada de la propia causa de la insuficiencia renal en ocasiones (hipertensión arterial, diabetes mellitus...) como del largo tiempo de evolución de la propia insuficiencia renal de esta población. Aún así, resulta llamativo que los datos sean tan similares entre zonas con programas de trasplante tan distintos.

La estabilidad en cuanto a la supervivencia del injerto a medio-largo plazo y la similitud entre las causas de muerte en la población trasplantada en zonas geográficas diferentes, con programas de trasplante renal diferentes y diversos

protocolos de inmunosupresión, lleva a pensar que probablemente existan factores inherentes al propio trasplante que se relacionen con estos hechos.

La inflamación túbulo-intersticial subclínica temprana en el injerto renal es un parámetro histológico al que se le ha otorgado diferente repercusión clínica según las series estudiadas a lo largo del tiempo. En algunos casos se ha relacionado con mayor progresión de la fibrosis en el órgano a medio plazo y disminución de la supervivencia del injerto (63) y en otros casos se ha considerado una lesión anodina siempre que no esté asociada a la presencia de fibrosis (62,101). De la misma manera, se sabe que la inflamación aislada se relaciona con un aumento en el riesgo de desarrollar *de novo* DSA (88,89), pero se desconoce si la presencia de fibrosis temprana modifica este riesgo.

Por otra parte, se sabe que los pacientes portadores de un injerto renal presentan una mayor inflamación sistémica (96,102) y que la inflamación sistémica medida mediante diferentes proteínas séricas (IL-6, proteína C reactiva...) se relaciona con una mayor mortalidad cardiovascular y con deterioro de función renal en la población general (103,104) y en la población trasplantada renal (97,98). De la misma manera, los pacientes con un episodio de rechazo agudo presentan un incremento en sus niveles de inflamación periférica medida mediante la activación de genes proinflamatorios en las células mononucleares en sangre periférica (105).

Sabiendo, por tanto, que las dos principales causas de pérdida del injerto a largo plazo son la CAN (la presencia de IFTA, cambios crónicos inespecíficos) y el rechazo humoral (28), para cuya aparición es necesario el desarrollo de DSA (80), y que la mortalidad de los pacientes trasplantados es eminentemente de causa cardiovascular y en probable relación a un incremento en inflamación sistémica, se buscó analizar la relación existente entre la presencia de inflamación subclínica en el injerto durante el primer año post-trasplante y la progresión de la fibrosis, la aparición de DSA *de novo* y el incremento en la inflamación sistémica medida mediante la PCR en sangre.

Para ello, se diseñó un estudio retrospectivo, unicéntrico y con un seguimiento de un año para la evaluación de la repercusión de la inflamación subclínica del injerto renal a nivel local, a nivel inmunológico y a nivel sistémico. Se tomó

como grupo de estudio los pacientes trasplantados renales entre 2009 y 2012 en el Oslo University Hospital - Rikshospitalet de riesgo inmunológico estándar que cumplieron los criterios de inclusión/exclusión detallados en la sección “Métodos”. De este estudio, surgieron dos artículos científicos recientemente publicados sobre los que a continuación se discute.

Inflammation in early kidney allograft surveillance biopsies with and without associated tubulo-interstitial chronic damage as a predictor of fibrosis progression and development of de novo donor specific antibodies

El primero de los artículos tiene como objetivo evaluar si la presencia de inflamación en presencia de fibrosis a las seis semanas del trasplante implica un riesgo diferente para la progresión de la fibrosis y para el desarrollo de DSA *de novo* que la inflamación sin fibrosis.

El principal hallazgo de este estudio de biopsias de protocolo fue que la presencia de inflamación túbulo-intersticial a las seis semanas, tanto aislada como en presencia de IFTA, se asociaba a una mayor prevalencia de DSA *de novo* al año del trasplante, con una OR similar en ambos grupos. Este hecho contrasta con la ausencia de asociación entre el daño en la microcirculación a las seis semanas del trasplante y la aparición de DSA al año del trasplante.

Actualmente, se entiende el rechazo humoral como un proceso evolutivo en pacientes con DSA preformados y DSA *de novo* que se puede manifestar mediante diferentes fenotipos (75): desde el rechazo humoral agudo, que puede aparecer clínicamente o de forma subclínica, a formas crónicas, de más lenta evolución, pero con el mismo sustrato fisiopatológico. En este trabajo, se confirma que existe una asociación temporal entre la inflamación subclínica precoz y un incremento en el riesgo de desarrollo de DSA (88–90,106). Esta idea sugiere que la inflamación túbulo-intersticial temprana supone un trigger para el complejo proceso que conlleva a la síntesis *de novo* de DSA.

Además, cabe destacar que el riesgo para el desarrollo de DSA al año del trasplante fue similar entre pacientes con inflamación aislada y pacientes con

inflamación asociada a IFTA en la biopsia de las seis semanas. En trabajos previos se había descrito una menor supervivencia del injerto en pacientes que presentaban en biopsias tempranas inflamación asociada a fibrosis (68) pero este trabajo es el primero que describe que el riesgo de desarrollar DSA al año del trasplante no es diferente entre los pacientes con inflamación aislada y los pacientes con inflamación superpuesta a IFTA. Este hallazgo sigue la línea de investigación de otros grupos, que enuncian que incluso grados bajos inflamación subclínica, asociada o no a fibrosis, no pueden ser considerados anodinos o insignificantes (73).

El grupo de la Universidad de Alabama (107) compara pacientes pediátricos con biopsia de protocolo antes de los seis meses del trasplante con diagnóstico de rechazo borderline, inflamación subclínica y sin alteraciones relevantes: el grupo con rechazo borderline es el que presenta peor evolución a los 5 años del trasplante, seguido por el grupo con inflamación subclínica y por los pacientes con biopsia normal, que únicamente presentan en un 20% episodios de rechazo agudo o pérdida del injerto a los 5 años. El dato quizá más relevante de este trabajo es la diferencia en la evolución entre los dos subgrupos de pacientes con cambios borderline: los que reciben tratamiento, a criterio de su médico tratante, y los que no. Los pacientes que reciben tratamiento presentan una evolución a 5 años mucho mejor que los pacientes no tratados: el 40% presentan pérdida del injerto o rechazo agudo durante la evolución vs prácticamente el 70% de los no tratados. Este trabajo refuerza la idea de que la actuación sobre la inflamación subclínica precoz mejora el pronóstico del injerto a medio-largo plazo.

Mehta et al presentan resultados similares (72), observando que pacientes con inflamación subclínica en biopsias de protocolo a los tres meses del trasplante presentan peor función renal a los 24 meses del trasplante que los pacientes con una biopsia normal (creatinina 1.6 ± 0.7 vs 1.38 ± 0.45 ; $P = .02$), mayor cronicidad en la biopsia de seguimiento a los 12 meses y mayor tasa de desarrollo de DSA a los 12 meses (12/129 vs 1/71, $P = .03$). Concluyen que la inflamación subclínica no ha de ser tratada como una lesión benigna por la importante implicación en la evolución del trasplante. Este dato lo corrobora el estudio realizado de manera conjunta por el grupo del hospital de Bellvitge y

Helsinki (73), con casi 1000 pacientes analizados y un seguimiento a 15 años, en el que se observa que la inflamación mínima y aislada en la biopsia temprana compromete la supervivencia del injerto a 15 años. Nuevamente, más datos en contra de la inocuidad de la inflamación temprana, por leve que sea.

En los últimos años se han publicado diferentes trabajos en los que se postula que las células B juegan un papel en la inflamación temprana y su depleción podría tener beneficios en la reducción de esta en modelos animales (108). Asimismo, esta relación de las células B con la inflamación temprana se cree que puede tener relación también con el desarrollo de rechazo mediado por anticuerpos (109) y se han propuesto estrategias para analizar el papel de las células B de memoria en pacientes estables y en aquellos que desarrollan DSA (110). Esta relación propuesta en estos trabajos va en la misma línea que nuestro hallazgo de la relación existente entre la inflamación temprana y el desarrollo de DSA.

Con los datos analizados, en nuestro trabajo se observó que los factores de riesgo asociados a la aparición de inflamación en ausencia de IFTA a las seis semanas fueron el número de mismatches en el HLA DR y el uso de ciclosporina (vs tacrolimus), siendo ambas variables subrogadas de la respuesta inmune. Parámetros subrogados de la calidad del órgano como la edad y el sexo masculino del donante se asociaron con la presencia de IFTA, así como el número de mismatches en el HLA B. La presencia de inflamación e IFTA de manera conjunta se asoció tanto a las variables subrogadas de la respuesta inmune como a las subrogadas de la calidad del órgano: uso de ciclosporina vs tacrolimus, mismatches en el HLA DR y en el HLA B, edad y sexo del donante. Cabe destacar la asociación de mismatches en el HLA B y la presencia de IFTA aislada, lo que sugiere que la respuesta aloinmune puede contribuir al desarrollo de fibrosis en ausencia de inflamación relevante. Este hecho está en consonancia con la idea de que genes relacionados con la inflamación están sobrerregulados en pacientes con daño crónico, sin que necesariamente se objetive inflamación en la biopsia, tal y como propone el grupo de la clínica Mayo (111,112).

La prevalencia e intensidad de la inflamación en este estudio es menor en los pacientes tratados con tacrolimus que en los pacientes tratados con ciclosporina. Este dato ya se había descrito en trabajos previos (67,113–115). Además, un trabajo realizado por nuestro grupo (116) que analiza dos cohortes de pacientes, una del hospital Vall d'Hebron de Barcelona y la otra del hospital de Oslo, concluye que la aparición de inflamación subclínica en biopsias de protocolo en los primeros tres meses post-trasplante y al año del trasplante se relacionaba con niveles bajos de tacrolimus en el momento de la biopsia en pacientes tratados con niveles reducidos de MMF. Sin embargo, no se ha estudiado si el uso de regímenes de inmunosupresión asociados a una baja prevalencia de inflamación se asocian también a un menor riesgo de desarrollo de DSA *de novo*. Existen algunos estudios que relacionan el desarrollo de DSA con el esquema de inmunosupresión (117,118), pero se requieren más trabajos en este campo.

En este trabajo se analiza también cuáles son los predictores de la presencia de una fibrosis intersticial moderada-severa en la biopsia de protocolo al año del trasplante ($ci \geq 2$). Se observó que, mientras que las lesiones agudas (i y t) no cambiaban significativamente entre las dos biopsias, sí se observaba un incremento en los scores de cronicidad (ci y ct). 72 (12.04%) pacientes presentaron fibrosis moderada-severa al año del trasplante y casi el 35% de estos pacientes presentaban un a las seis semanas una biopsia etiquetada como IFTA + i . La presencia de inflamación con IFTA a las seis semanas resultó un predictor independiente de la presencia de $ci \geq 2$ al año del trasplante, pero no la presencia de inflamación subclínica aislada. Resultaron también predictores de fibrosis moderada-severa al año del trasplante la edad del donante y el haber presentado algún episodio de rechazo agudo clínico, tanto antes de la primera biopsia como entre las seis semanas y el año. Estos resultados sugieren que no sólo los episodios de rechazo agudo suponen un motor para la progresión de la fibrosis, si no que, en pacientes con fibrosis ya presente, la presencia de cierto grado de inflamación acompañante acelera la progresión de los cambios crónicos durante el primer año post-trasplante.

Finalmente, y como se ha mencionado anteriormente, el daño temprano en la microcirculación no se asoció con un aumento del riesgo de desarrollo de DSA,

mientras que sí se observó mayor daño en la microcirculación al año del trasplante en los pacientes que habían desarrollado DSA en esta fecha. Este hecho sugiere que el daño en la microcirculación no es una causa si no una consecuencia de la presencia de DSA.

Este trabajo presenta limitaciones, la principal quizá la falta de seguimiento de los pacientes más allá del primer año, lo que no permite analizar la relación entre inflamación, progresión de la fibrosis, aparición de DSA y supervivencia del injerto. De la misma manera, la relación entre tipo de tratamiento inmunosupresor e inflamación y desarrollo de DSA no puede ser analizada en tanto en cuanto ciclosporina fue administrada únicamente a los pacientes con gran riesgo de desarrollo de diabetes mellitus en el post-trasplante.

Kidney allograft subclinical rejection modulates systemic inflammation measured by C-reactive protein at 1 year after transplantation

El principal objetivo de este trabajo fue analizar la relación entre la inflamación subclínica en el injerto renal al año del trasplante y su repercusión en el grado de inflamación sistémica medida mediante la PCR sérica en el momento de la biopsia. En el estudio se observó que la inflamación en la biopsia de protocolo al año del trasplante resulta un predictor independiente de niveles elevados de PCR en sangre en el momento de la biopsia.

Los otros predictores independientes de presentar unos niveles de PCR elevados en el momento de la biopsia de protocolo al año del trasplante fueron la presencia de una infección urinaria los días previos a la realización de la prueba y el IMC del paciente. Ambas variables suponían hallazgos esperables, ya que la relación entre los procesos infecciosos y la obesidad y la elevación de la PCR es bien conocida y fue estudiada en diferentes trabajos (119–122). Tanto la presencia de una infección bacteriana como la obesidad son condiciones que predisponen a la liberación de citocinas que conllevan a un aumento en la producción hepática de PCR.

Llama la atención que la PCR se encontraba elevada únicamente en pacientes con SCR pero no en los pacientes con cambios borderline, en los que los niveles de PCR eran similares a los de los pacientes sin inflamación. Este hecho sugiere que la relación entre la severidad de la inflamación renal y los niveles de PCR no sigue un patrón lineal.

En este trabajo pone de manifiesto por primera vez que una condición inherente al propio injerto renal, como la inflamación subclínica, actúa como modulador del nivel de inflamación sistémica, con independencia del grado de insuficiencia renal o de los factores de riesgo cardiovasculares clásicos (98,123). En este estudio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la función renal (creatinina sérica, filtrado glomerular estimado, proteinuria), en los antecedentes de tabaquismo, en las cifras de presión arterial ni en la presencia de diabetes en el grupo de pacientes con PCR baja y en el grupo con PCR alta.

La idea de que el injerto renal modificaba el grado de inflamación sistémica ya se había desarrollado previamente. Es conocido que los pacientes que regresan a diálisis tras la disfunción del injerto renal presentan niveles de PCR más elevados que los pacientes que inician hemodiálisis sin haber sido trasplantados (102) y que estos niveles se reducen tras la trasplantectomía (96), lo que hace pensar que efectivamente el injerto inflamado contribuye de manera inequívoca a la inflamación sistémica.

En injertos funcionantes, la inflamación renal local modula la producción de citocinas proinflamatorias y la expresión de genes proinflamatorios en las células mononucleares periféricas, hecho que contribuye a la producción hepática de PCR (94,105). Sin embargo, la producción de esta proteína no es únicamente hepática. En determinadas ocasiones puede ser sintetizada en el riñón, sin que se haya logrado comprender bien hasta el momento actual la relación entre los niveles de PCR séricos y su producción renal. En un medio adecuado y tras estimulación con IL-6, las células tubulares renales expresan y PCR en pacientes con rechazo agudo, pero no en el caso de necrosis tubular aguda (124,125).

La PCR reconoce fosfolipina y glicanos en la superficie de determinados microorganismos y ligandos autólogos como lipoproteínas de la membrana celular en células necróticas y apoptóticas (126). De esta manera, se activa la vía clásica del complemento, contribuyendo frente a la defensa contra la infección y a la reparación tisular. Sin embargo, también se ha demostrado que la PCR puede reconocer el LDL oxidado y depositado en las placas ateroscleróticas, contribuyendo a la inflamación e inestabilidad de las mismas (127). De esta manera, los resultados de este trabajo sugieren que la presencia de SCR puede contribuir al aumento de riesgo cardiovascular que se ha observado en la población portadora de un trasplante renal.

En este trabajo se evaluó también la potencial utilidad de los niveles séricos de PCR para diagnosticar la presencia de SCR. Sin embargo, el análisis mostró una sensibilidad del 50% y una especificidad del 76%, demasiado bajas para considerar la PCR como una herramienta diagnóstica del rechazo subclínico.

La principal limitación de este trabajo es que es un estudio unicéntrico y que la determinación de PCR se llevó a cabo únicamente en el momento de la biopsia. No se disponía de datos de PCR en los episodios de rechazo clínico. Algunas variables que podrían modificar los niveles de PCR, como el uso de estatinas, no estaban recogidas para realizar el análisis y el tiempo de seguimiento resulta corto, no permitiendo analizar las consecuencias a largo plazo de los niveles elevados de PCR.

En resumen, la inflamación subclínica del injerto durante el primer año post-trasplante no supone una lesión insignificante y se han de buscar estrategias de cara a limitar su aparición y a su tratamiento en caso de que aparezca. Por una parte, la presencia de inflamación subclínica temprana, aislada o asociada a lesiones túbulo-intersticiales crónicas, junto a los mismatches en el HLA DR, supone un factor de riesgo para el desarrollo de DSA *de novo*, condición indispensable para la aparición de rechazo humoral, que es uno de los grandes responsables de la disfunción del injerto a largo plazo. Además, esta

inflamación subclínica temprana, cuando se asocia a cambios crónicos, se relaciona con un incremento en el riesgo de progresión de la fibrosis al año del trasplante. Estos cambios fibróticos, a largo plazo, son también una de las principales causas de disfunción crónica y pérdida del injerto. Además, la presencia de inflamación subclínica en estadios más avanzados, al año del trasplante, se relaciona con un incremento en la PCR en sangre, reactante de fase aguda relacionado repetidamente con la morbi-mortalidad cardiovascular en la población general y en el trasplante renal.

Estos resultados hacen pensar en la búsqueda de estrategias para limitar la aparición de inflamación en el injerto renal aparentemente estable. Sabiendo que los factores predisponentes para su aparición tienen que ver con la discordancia inmunológica, quizá sería recomendable evitar al máximo los mismatches en el HLA en pacientes jóvenes a los que se les prediga un largo recorrido vital, con el fin de minimizar la aparición de DSA, retrasar la disfunción del injerto y evitar la hipersensibilización de cara a futuros trasplantes. La discordancia HLA quizá puede ser más flexible en pacientes añosos, con menos expectativa de vida y que probablemente no sean candidatos a un retrasplante. Además, se sabe que la inflamación subclínica se relaciona con la inmunosupresión: mayor riesgo de aparición en pacientes tratados con ciclosporina que con tacrolimus y relación con niveles bajos de tacrolimus al año del trasplante (116). También, niveles bajos de tacrolimus se relacionan con mayor riesgo de rechazo y de aparición de DSA (128). Por este motivo, valdría la pena analizar en profundidad si regímenes de inmunosupresión asociados a baja prevalencia de inflamación subclínica se asocian también a cierta prevención en el desarrollo de DSA y, a largo plazo, a mayor supervivencia del injerto y menor riesgo de aparición de eventos cardiovasculares.

Por otra parte, en esta tesis se pone de manifiesto la importancia y repercusión de la biopsia de protocolo del injerto renal como una herramienta diagnóstica a mayores, que permite al nefrólogo adelantarse a la aparición de manifestaciones clínicas y actuar de una manera precoz.

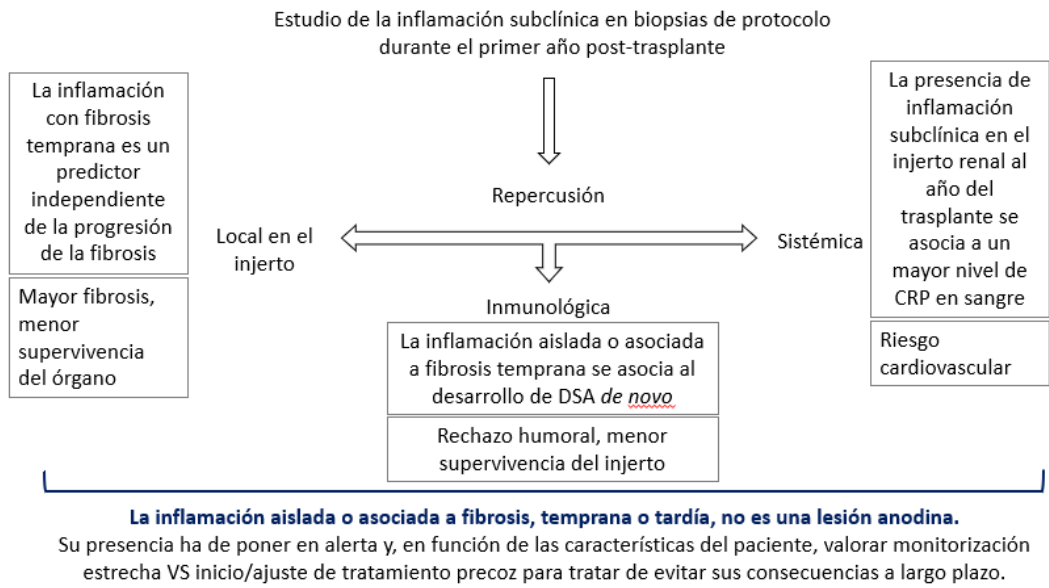


Figura 9. Repercusión de la inflamación subclínica a nivel histológico, inmunológico y sistémico en el primer año post-trasplante renal

8. CONCLUSIONES

1. La presencia de inflamación túbulo-intersticial subclínica temprana a las 6 semanas del trasplante, aislada o asociada a cambios crónicos (IFTA), se relaciona con un aumento del riesgo de desarrollar DSA *de novo* al año del trasplante.
2. La presencia de inflamación túbulo-intersticial subclínica a las 6 semanas del trasplante asociada a IFTA, además de los episodios de rechazo agudo durante el primer año post-trasplante, son predictores de la progresión de la fibrosis a moderada-severa al año del trasplante, pero no lo es la presencia de inflamación subclínica aislada a las 6 semanas.
3. El daño microvascular no es una causa si no una consecuencia de la presencia de DSA.
4. El rechazo subclínico objetivado en biopsias de seguimiento al año del trasplante es un predictor independiente de la elevación de la PCR sérica en el momento de la biopsia, al igual que la presencia de infección de orina los días previos y el IMC, independientemente de la función renal.
5. La PCR sérica al año del trasplante carece de utilidad como herramienta diagnóstica de la presencia de rechazo subclínico en este momento. La asociación entre rechazo histológico y PCR sérica no es suficientemente consistente como para utilizarla en el diagnóstico del rechazo subclínico.

9. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN DE FUTURO

A la luz de los resultados obtenidos en este proyecto de tesis doctoral, el grupo de Nefrología del hospital Vall d'Hebron ha iniciado nuevas líneas de investigación para profundizar en la repercusión de la inflamación subclínica del injerto renal.

Por una parte, está actualmente en marcha un proyecto cuyo objetivo es caracterizar la contribución de la inflamación del aloinjerto renal a la inflamación sistémica y a la disfunción/activación endotelial. Se trata de un estudio observacional de seguimiento prospectivo a 5 años en el que se incluirán pacientes trasplantados con biopsia de seguimiento a los tres meses del trasplante y en los que se disponga de un diagnóstico histológico claro, se realizarán estudios especiales. Estos consisten en la evaluación histológica con inmunofenotipo del infiltrado inflamatorio, estudio de monocitos circulantes y citocinas proinflamatorias en sangre y orina, así como número de placas carotídeas, velocidad de onda de pulso y presión arterial. También se evaluará la capacidad de activación del suero del paciente sobre células endoteliales in vitro y se estudiará la relación entre inflamación tisular y sistémica mediante micromatrices de ARN. El impacto de este proyecto reside en su capacidad para describir dianas terapéuticas de cara a modular vías que intervienen en la relación entre la inflamación del aloinjerto renal y la inflamación sistémica y, consecuentemente, el riesgo cardiovascular.

Otro de los proyectos que se están llevando a cabo actualmente es el estudio de los genes asociados al rechazo y/o progresión de la fibrosis en los pacientes trasplantados renales. En el documento de consenso de Banff 2018 se describe un listado de genes cuya activación se ha asociado al diagnóstico y pronóstico histológico y se propone su validación en distintos contextos clínicos. Se cree que estos genes asociados al rechazo y a la progresión de la fibrosis podrían estar modulados por el tratamiento inmunosupresor. Por lo tanto, su estudio permitiría conocer si un paciente se encuentra adecuadamente inmunosuprimido. Con este objetivo, se estudiará una cohorte exploratoria y una cohorte de validación de pacientes trasplantados renales que dispongan de biopsias de protocolo durante el primer año post-trasplante y se

realizará la determinación de la expresión génica mediante micromatrices nanofluídicas en sangre y tejido renal, correlacionándolo con los niveles de inmunosupresión.

A título personal, Clara García Carro continuará estudiando el papel de la inflamación renal y sus correlaciones no solo en el ámbito del trasplante renal si no también en el riñón nativo, y su estudio en diferentes enfermedades renales. Se están explorando opciones de colaboración futura con el Oslo University Hospital – Rikshospitalet. Actualmente, se encuentra involucrada en un proyecto de investigación acerca de la huella proteómica de la nefropatía diabética. También lidera el primer estudio nacional sobre la repercusión renal del cáncer y los nuevos tratamientos oncológicos, en el que se evaluarán las biopsias renales de los pacientes con enfermedad oncológica y su evolución en los últimos 10 años. Asimismo, continúa su labor asistencial como especialista en Nefrología en el hospital Vall d'Hebron y actualmente es también responsable del proyecto de almacenamiento en el Biobanco de Nefrología de este servicio.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Hogan JJ, Mocanu M, Berns JS. The Native Kidney Biopsy: Update and Evidence for Best Practice. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 Feb 5;11(2):354–62.
2. Dhaun N, Bellamy CO, Cattran DC, Kluth DC. Utility of renal biopsy in the clinical management of renal disease. *Kidney Int*. 2014 May;85(5):1039–48.
3. García Nieto V, Luis Yanes MI, Ruiz Pons M. [Celebrating fifty years of percutaneous renal biopsies in Spain]. *Nefrología*. 2009;29(1):71–6.
4. Iversen P, Brun C. Aspiration biopsy of the kidney. 1951. *J Am Soc Nephrol*. 1997 Nov;8(11):1778–87; discussion 1778-1786.
5. Kark RM, Muehrcke RC. Biopsy of kidney in prone position. *Lancet*. 1954 May 22;266(6821):1047–9.
6. Visconti L, Cernaro V, Ricciardi CA, Lacava V, Pellicanò V, Lacquaniti A, et al. Renal biopsy: Still a landmark for the nephrologist. *World J Nephrol*. 2016 Jul 6;5(4):321–7.
7. Toledo K, Pérez MJ, Espinosa M, Gómez J, López M, Redondo D, et al. Complicaciones asociadas a la biopsia renal percutánea. Experiencia en España 50 años después. *Nefrología*. 2010 Sep 1;30(5):539–43.
8. Rivera Gorrin M. Biopsia renal ecodirigida. *Nefrología*. 2010 Sep 1;30(5):490–2.
9. Rivera Hernández F. Biopsia renal. *Nefrología*. 2009 Feb 1;2(1):1–8.
10. Briganti EM, Dowling J, Finlay M, Hill PA, Jones CL, Kincaid-Smith PS, et al. The incidence of biopsy-proven glomerulonephritis in Australia. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Jul;16(7):1364–7.
11. Fuiano G, Mazza G, Comi N, Caglioti A, De Nicola L, Iodice C, et al. Current indications for renal biopsy: a questionnaire-based survey. *Am J Kidney Dis*. 2000 Mar;35(3):448–57.
12. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013 Jul 20;382(9888):260–72.
13. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, et al. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant*. 2011 Oct;11(10):2093–109.
14. 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 Dec 2;341(23):1725–30.

15. Ferguson TW, Tangri N, Rigatto C, Komenda P. Cost-effective treatment modalities for reducing morbidity associated with chronic kidney disease. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2015 Apr;15(2):243–52.
16. Jensen CE, Sørensen P, Petersen KD. In Denmark kidney transplantation is more cost-effective than dialysis. *Dan Med J.* 2014 Mar;61(3):A4796.
17. Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F. Xenotransplantation: a view to the past and an unrealized promise to the future. *Exp Clin Transplant.* 2003 Jun;1(1):1–7.
18. Stefoni S, Campieri C, Donati G, Orlandi V. The history of clinical renal transplant. *J Nephrol.* 2004 Jun;17(3):475–8.
19. Sá H, Leal R, Rosa MS. Renal transplant immunology in the last 20 years: A revolution towards graft and patient survival improvement. *Int Rev Immunol.* 2017 04;36(3):182–203.
20. Opelz G, Döhler B, Middleton D, Süsal C, A Collaborative Transplant Study Report. HLA Matching in Pediatric Kidney Transplantation: HLA Poorly Matched Living Donor Transplants Versus HLA Well-Matched Deceased Donor Transplants. *Transplantation.* 2017;101(11):2789–92.
21. Williams RC, Opelz G, McGarvey CJ, Weil EJ, Chakkera HA. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors. *Transplantation.* 2016;100(5):1094–102.
22. Akgul SU, Ciftci HS, Temurhan S, Caliskan Y, Bayraktar A, Tefik T, et al. Association Between HLA Antibodies and Different Sensitization Events in Renal Transplant Candidates. *Transplant Proc.* 2017 Apr;49(3):425–9.
23. ERA-EDTA Registry :: annual reports [Internet]. [cited 2019 May 3]. Available from: <https://www.era-edta-reg.org/index.jsp?p=14>
24. Norsk Nyremedisinsk Forening, Norsk Nefrologiregister. Norwegian Renal Registry. ESRD. Annual report [Internet]. [cited 2019 May 3]. Available from: <http://nephro.no/nnr.html>
25. Bienvenida | Sociedad Española de Nefrología [Internet]. [cited 2019 May 3]. Available from: <https://www.senefro.org/modules.php?name=webstructure&idwebstructure=29>
26. Trasplantaments OC de. Registre de malalts renals de Catalunya: informe estadístic 2015. Registro de enfermos renales de Cataluña: informe estadístico 2015 [Internet]. 2017 May [cited 2019 May 3]; Available from: <http://scientiasalut.gencat.cat/handle/11351/3685>
27. Griva K, Davenport A, Newman SP. Health-related quality of life and long-term survival and graft failure in kidney transplantation: a 12-year follow-up study. *Transplantation.* 2013 Mar 15;95(5):740–9.

28. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012 Feb;12(2):388–99.
29. Kaplan B, Meier-Kriesche H-U. Death after graft loss: an important late study endpoint in kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2002 Nov;2(10):970–4.
30. First MR, Neylan JF, Rocher LL, Tejani A. Hypertension after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 1994 Feb;4(8 Suppl):S30-36.
31. Ibernón M, Moreso F, Sarrias X, Sarrias M, Grinyó JM, Fernández-Real JM, et al. Reverse dipper pattern of blood pressure at 3 months is associated with inflammation and outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 May;27(5):2089–95.
32. Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int*. 1998 Jan;53(1):217–22.
33. Mehta R, Cherikh W, Sood P, Hariharan S. Kidney allograft surveillance biopsy practices across US transplant centers: A UNOS survey. *Clin Transplant*. 2017;31(5).
34. Li CH, Traube LE, Lu DS, Raman SS, Danovitch GM, Gritsch HA, et al. Implementation and Results of a Percutaneous Renal Allograft Biopsy Protocol to Reduce Complication Rate. *J Am Coll Radiol*. 2016 May;13(5):549–53.
35. 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]. *Nefrologia*. 2014;34(1):115–9.
36. Torres-Rodríguez IB, Castella-Fierro E, Serres-Creixans X, Salcedo-Allende M, Azancot-Rivero MA, Perelló-Carrascosa M, et al. Safety and efficacy of outpatient biopsy in renal transplantation. *Nefrologia*. 2014 Nov 17;34(6):749–55.
37. History of the Banff Foundation for Allograft Pathology [Internet]. BANFF. [cited 2019 May 3]. Available from: <https://banfffoundation.org/history/>
38. 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 Feb;55(2):713–23.
39. 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*. 2003 Jun;3(6):708–14.

40. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant*. 2018 Feb;18(2):293–307.
41. 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*. 2003 Sep 27;76(6):969–73.
42. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation*. 1995 Feb 27;59(4):511–4.
43. Cosio FG, Grande JP, Wadei H, Larson TS, Griffin MD, Stegall MD. Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am J Transplant*. 2005 Oct;5(10):2464–72.
44. Rush D. Protocol biopsies for renal transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2010 Jan;21(1):1–9.
45. Vanhove T, Goldschmeding R, Kuypers D. Kidney Fibrosis: Origins and Interventions. *Transplantation*. 2017 Apr;101(4):713–26.
46. Boor P, Floege J. Renal allograft fibrosis: biology and therapeutic targets. *Am J Transplant*. 2015 Apr;15(4):863–86.
47. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vадnagara K, Carstens JL, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med*. 2015 Sep;21(9):998–1009.
48. Oberbauer R. Progression of Interstitial Fibrosis in Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 07;11(12):2110–2.
49. Nankivell BJ, Shingde M, Keung KL, Fung CL-S, Borrows RJ, O’Connell PJ, et al. The causes, significance and consequences of inflammatory fibrosis in kidney transplantation: The Banff i-IFTA lesion. *Am J Transplant*. 2018;18(2):364–76.
50. 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.
51. Isoniemi HM, Krogerus L, von Willebrand E, Taskinen E, Ahonen J, Häyry P. Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts. *Kidney Int*. 1992 Jan;41(1):155–60.
52. Isoniemi H, Ahonen J, Eklund B, Häyry P, Höckerstedt K, Krogerus L, et al. Relationship between renal histology and later graft outcome. *Transpl Int*. 1994;7 Suppl 1:S318-319.

53. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation*. 1994 Jan;57(2):208–11.
54. Serón D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int*. 1997 Jan;51(1):310–6.
55. 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*. 2003 Dec 11;349(24):2326–33.
56. Becker LE, Weritz B, Yi X, Gross-Weissmann M-L, Waldherr R, Zeier M, et al. Evolution of allograft fibrosis and function in kidney transplant recipients: a retrospective analysis of stable patients under CNI and mTORi. *Transpl Int*. 2015 May;28(5):553–64.
57. Wang Y-Y, Jiang H, Pan J, Huang X-R, Wang Y-C, Huang H-F, et al. Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Jul;28(7):2053–67.
58. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gürkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2007 Dec 20;357(25):2562–75.
59. Pascual J, Diekmann F, Fernández-Rivera C, Gómez-Marqués G, Gutiérrez-Dalmau A, Pérez-Sáez MJ, et al. Recommendations for the use of everolimus in de novo kidney transplantation: False beliefs, myths and realities. *Nefrologia*. 2017 Jun;37(3):253–66.
60. Heilman RL, Devarapalli Y, Chakkera 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*. 2010 Mar;10(3):563–70.
61. 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*. 2007 Nov;7(11):2538–45.
62. Shishido S, Asanuma H, Nakai H, Mori Y, Satoh H, Kamimaki I, et al. The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Apr;14(4):1046–52.
63. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation*. 2004 Jul 27;78(2):242–9.

64. Roberts ISD, Stratopoulos C, Zilvetti M, Reddy S, Friend PJ. Impact of immunosuppression on the incidence of early subclinical renal allograft rejection: implications for protocol biopsy policy. *Transpl Int*. 2009 Aug;22(8):831–6.
65. 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*. 2013 Nov;24(11):1913–23.
66. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*. 2009 Mar;9(3):527–35.
67. 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*. 2004 Oct 15;78(7):1064–8.
68. Moreso F, Ibernón M, Gomà M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant*. 2006 Apr;6(4):747–52.
69. Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, Kim YS, Choi YJ, Kim Y-S, et al. Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: ten-year experience at a single center. *Am J Transplant*. 2005 Jun;5(6):1354–60.
70. Moes DJAR, Press RR, Ackaert O, Ploeger BA, Bemelman FJ, Diack C, et al. Exploring genetic and non-genetic risk factors for delayed graft function, acute and subclinical rejection in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*. 2016;82(1):227–37.
71. 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*. 2015 Jul;26(7):1721–31.
72. Mehta R, Bhusal S, Randhawa P, Sood P, Cherukuri A, Wu C, et al. Short-term adverse effects of early subclinical allograft inflammation in kidney transplant recipients with a rapid steroid withdrawal protocol. *Am J Transplant*. 2018 Jul;18(7):1710–7.
73. Ortiz F, Gelpi R, Helanterä I, Melilli E, Honkanen E, Bestard O, et al. Decreased Kidney Graft Survival in Low Immunological Risk Patients Showing Inflammation in Normal Protocol Biopsies. *PLoS ONE*. 2016;11(8):e0159717.
74. Halloran PF, Chang J, Famulski K, Hidalgo LG, Salazar IDR, Merino Lopez M, et al. Disappearance of T Cell-Mediated Rejection Despite Continued Antibody-Mediated Rejection in Late Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Jul;26(7):1711–20.

75. Mengel M, Husain S, Hidalgo L, Sis B. Phenotypes of antibody-mediated rejection in organ transplants. *Transpl Int.* 2012 Jun;25(6):611–22.
76. Bouquegneau A, Loheac C, Aubert O, Bouatou Y, Viglietti D, Empana J-P, et al. Complement-activating donor-specific anti-HLA antibodies and solid organ transplant survival: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 2018;15(5):e1002572.
77. Viglietti D, Bouatou Y, Kheav VD, Aubert O, Suberbielle-Boissel C, Glotz D, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies are independent predictors of response to treatment in kidney recipients with antibody-mediated rejection. *Kidney Int.* 2018 Oct;94(4):773–87.
78. Lefaucheur C, Viglietti D, Hidalgo LG, Ratner LE, Bagnasco SM, Batal I, et al. Complement-Activating Anti-HLA Antibodies in Kidney Transplantation: Allograft Gene Expression Profiling and Response to Treatment. *J Am Soc Nephrol.* 2018 Feb;29(2):620–35.
79. 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.* 2007 Mar;7(3):518–26.
80. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014 Feb;14(2):272–83.
81. 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.* 2009 Nov;9(11):2520–31.
82. Einecke G, Mengel M, Hidalgo L, Allanach K, Famulski KS, Halloran PF. The early course of kidney allograft rejection: defining the time when rejection begins. *Am J Transplant.* 2009 Mar;9(3):483–93.
83. Ciancio G, Gaynor JJ, Guerra G, Sageshima J, Roth D, Chen L, et al. Antibody-mediated rejection implies a poor prognosis in kidney transplantation: Results from a single center. *Clin Transplant.* 2018 Aug 27;e13392.
84. Mao Q, Terasaki PI, Cai J, Briley K, Catrou P, Haisch C, et al. Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am J Transplant.* 2007 Apr;7(4):864–71.
85. Girerd S, Schikowski J, Girerd N, Duarte K, Busby H, Gambier N, et al. Impact of reduced exposure to calcineurin inhibitors on the development of de novo DSA: a cohort of non-immunized first kidney graft recipients between 2007 and 2014. *BMC Nephrol.* 2018 15;19(1):232.

86. Morozumi K, Takeda A, Otsuka Y, Horike K, Gotoh N, Narumi S, et al. Reviewing the pathogenesis of antibody-mediated rejection and renal graft pathology after kidney transplantation. *Nephrology (Carlton)*. 2016 Jul;21 Suppl 1:4–8.
87. Rush DN, Gibson IW. The perils of immunosuppression minimization: lessons from protocol biopsies of renal allografts. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015 Nov;24(6):582–6.
88. Moreso F, Carrera M, Goma M, Hueso M, Sellares J, Martorell J, et al. Early subclinical rejection as a risk factor for late chronic humoral rejection. *Transplantation*. 2012 Jan 15;93(1):41–6.
89. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant*. 2012 May;12(5):1157–67.
90. El Ters M, Grande JP, Keddiss MT, Rodrigo E, Chopra B, Dean PG, et al. Kidney allograft survival after acute rejection, the value of follow-up biopsies. *Am J Transplant*. 2013 Sep;13(9):2334–41.
91. de Vries LV, Minović I, Franssen CFM, van Faassen M, Sanders J-SF, Berger SP, et al. The tryptophan/kynurenine pathway, systemic inflammation, and long-term outcome after kidney transplantation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017 01;313(2):F475–86.
92. Vereyken EJF, Kraaij MD, Baan CC, Rezaee F, Weimar W, Wood KJ, et al. A shift towards pro-inflammatory CD16+ monocyte subsets with preserved cytokine production potential after kidney transplantation. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e70152.
93. De Serres SA, Vadivel N, Mfarrej BG, Grafals M, DeJoseph M, Dyer C, et al. Monocyte-secreted inflammatory cytokines are associated with transplant glomerulopathy in renal allograft recipients. *Transplantation*. 2011 Mar 15;91(5):552–9.
94. Batal I, De Serres SA, Mfarrej BG, Grafals M, Pinkus GS, Kalra A, et al. Glomerular inflammation correlates with endothelial injury and with IL-6 and IL-1 β secretion in the peripheral blood. *Transplantation*. 2014 May 27;97(10):1034–42.
95. Azancot MA, Ramos N, Torres IB, García-Carro C, Romero K, Espinel E, et al. Inflammation and Atherosclerosis Are Associated With Hypertension in Kidney Transplant Recipients. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2015 Dec;17(12):963–9.
96. López-Gómez JM, Pérez-Flores I, Jofré R, Carretero D, Rodríguez-Benitez P, Villaverde M, et al. Presence of a failed kidney transplant in patients who are on hemodialysis is associated with chronic inflammatory state and erythropoietin resistance. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Sep;15(9):2494–501.

97. Abedini S, Holme I, März W, Weihrauch G, Fellström B, Jardine A, et al. Inflammation in renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Jul;4(7):1246–54.
98. Dahle DO, Mjøen G, Oqvist B, Scharnagl H, Weihrauch G, Grammer T, et al. Inflammation-associated graft loss in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Nov;26(11):3756–61.
99. Proctor MJ, McMillan DC, Horgan PG, Fletcher CD, Talwar D, Morrison DS. Systemic inflammation predicts all-cause mortality: a glasgow inflammation outcome study. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0116206.
100. Bazeley J, Bieber B, Li Y, Morgenstern H, de Sequera P, Combe C, et al. C-reactive protein and prediction of 1-year mortality in prevalent hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Oct;6(10):2452–61.
101. Park WD, Griffin MD, Cornell LD, Cosio FG, Stegall MD. Fibrosis with inflammation at one year predicts transplant functional decline. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Nov;21(11):1987–97.
102. Gorgulu N, Yelken B, Caliskan Y, Elitok A, Cimen AO, Yazici H, et al. Endothelial dysfunction in hemodialysis patients with failed renal transplants. *Clin Transplant*. 2010 Oct;24(5):678–84.
103. Makita S, Nakamura M, Satoh K, Tanaka F, Onoda T, Kawamura K, et al. Serum C-reactive protein levels can be used to predict future ischemic stroke and mortality in Japanese men from the general population. *Atherosclerosis*. 2009 May;204(1):234–8.
104. Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein and all-cause mortality--the Copenhagen City Heart Study. *Eur Heart J*. 2010 Jul;31(13):1624–32.
105. Roedder S, Sigdel T, Salomonis N, Hsieh S, Dai H, Bestard O, et al. The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: results of the multicenter AART study. *PLoS Med*. 2014 Nov;11(11):e1001759.
106. 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*. 2014 Dec 27;98(12):1310–5.
107. Seifert ME, Yanik MV, Feig DI, Hauptfeld-Dolejssek V, Mroczek-Musulman EC, Kelly DR, et al. Subclinical inflammation phenotypes and long-term outcomes after pediatric kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2018 Sep;18(9):2189–99.
108. Panzer SE, Wilson NA, Verhoven BM, Xiang D, Rubinstein CD, Redfield RR, et al. Complete B Cell Deficiency Reduces Allograft Inflammation and Intra-graft Macrophages in a Rat Kidney Transplant Model. *Transplantation*. 2018;102(3):396–405.

109. Xu H, He X, Xu R. B Cell Activating Factor, Renal Allograft Antibody-Mediated Rejection, and Long-Term Outcome. *J Immunol Res*. 2018;2018:5251801.
110. Luque S, Lúcia M, Bestard O. Refinement of humoral immune monitoring in kidney transplantation: the role of “hidden” alloreactive memory B cells. *Transpl Int*. 2017 Oct;30(10):955–68.
111. Park W, Griffin M, Grande JP, Cosio F, Stegall MD. Molecular evidence of injury and inflammation in normal and fibrotic renal allografts one year posttransplant. *Transplantation*. 2007 Jun 15;83(11):1466–76.
112. Dean PG, Park WD, Cornell LD, Gloor JM, Stegall MD. Intragraft gene expression in positive crossmatch kidney allografts: ongoing inflammation mediates chronic antibody-mediated injury. *Am J Transplant*. 2012 Jun;12(6):1551–63.
113. 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*. 2008 Nov;20(1–2):32–42.
114. Kanzelmeyer NK, Ahlenstiel T, Kreuzer M, Becker JU, Pape L. Correlations with six-month protocol biopsy findings in pediatric transplant recipients on low- and regular-dose CNI regimens. *Clin Transplant*. 2013 Apr;27(2):319–23.
115. Serón D, O’Valle F, Moreso F, Gomà M, Hueso M, Grinyó JM, et al. Immunophenotype of infiltrating cells in protocol renal allograft biopsies from tacrolimus-versus cyclosporine-treated patients. *Transplantation*. 2007 Mar 15;83(5):649–52.
116. Torres IB, Reisaeter AV, Moreso F, Åsberg A, Vidal M, Garcia-Carro C, et al. Tacrolimus and mycophenolate regimen and subclinical tubulo-interstitial inflammation in low immunological risk renal transplants. *Transpl Int*. 2017 Nov;30(11):1119–31.
117. 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*. 2012 May;12(5):1192–8.
118. de Sandes-Freitas TV, Felipe CR, Campos ÉF, de Lima MG, Soares MF, de Franco MF, et al. Subclinical Lesions and Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients Receiving Tacrolimus-Based Immunosuppressive Regimen Followed by Early Conversion to Sirolimus. *Transplantation*. 2015 Apr 29;
119. de Oliveira VM, Moraes RB, Stein AT, Wendland EM. Accuracy of C - Reactive protein as a bacterial infection marker in critically

- immunosuppressed patients: A systematic review and meta-analysis. *J Crit Care*. 2017;42:129–37.
120. Takemura Y, Ishida H, Saitoh H, Kure H, Kakoi H, Ebisawa K, et al. Economic consequence of immediate testing for C-reactive protein and leukocyte count in new outpatients with acute infection. *Clin Chim Acta*. 2005 Oct;360(1–2):114–21.
 121. Aronson D, Bartha P, Zinder O, Kerner A, Markiewicz W, Avizohar O, et al. Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 May;28(5):674–9.
 122. Fedewa MV, Hathaway ED, Ward-Ritacco CL. Effect of exercise training on C reactive protein: a systematic review and meta-analysis of randomised and non-randomised controlled trials. *Br J Sports Med*. 2017 Apr;51(8):670–6.
 123. Cottone S, Palermo A, Vaccaro F, Mulè G, Guarneri M, Arsena R, et al. Inflammation and endothelial activation are linked to renal function in long-term kidney transplantation. *Transpl Int*. 2007 Jan;20(1):82–7.
 124. Jabs WJ, Lögering BA, Gerke P, Kreft B, Wolber E-M, Klinger MHF, et al. The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. *Eur J Immunol*. 2003 Jan;33(1):152–61.
 125. Jabs WJ, Meier M, Lamprecht P, Steinhoff J, Nitschke M. Local expression of C-reactive protein is associated with deteriorating graft function in acute and chronic failure of kidney transplants. *Nephron Clin Pract*. 2011;117(4):c390-397.
 126. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003 Jun;111(12):1805–12.
 127. de Beer FC, Soutar AK, Baltz ML, Trayner IM, Feinstein A, Pepys MB. Low density lipoprotein and very low density lipoprotein are selectively bound by aggregated C-reactive protein. *J Exp Med*. 1982 Jul 1;156(1):230–42.
 128. Gatault P, Kamar N, Büchler M, Colosio C, Bertrand D, Durrbach A, et al. Reduction of Extended-Release Tacrolimus Dose in Low-Immunological-Risk Kidney Transplant Recipients Increases Risk of Rejection and Appearance of Donor-Specific Antibodies: A Randomized Study. *Am J Transplant*. 2017 May;17(5):1370–9.

