

Monitorización inmunológica postrasplante renal: ¿tiene impacto clínico?

M.^a José Pérez Sáez¹, Ángel Alonso Melgar², Frederic Cofan Pujol³, Pedro Errasti Goenaga⁴, Álvaro Molina Ordás⁵, María O. López-Oliva⁶, David Ramos Escorihuela⁷, Cristina Canal Girol⁸, Julia Fijo López-Viota⁹, Álex Gutiérrez Dalmau¹⁰, Luisa Jimeno García¹¹, Rafael Romero Burgos¹², Elena Román Ortiz¹³, Natalia Polanco¹⁴, Edoardo Melilli¹⁵, Rosa Sánchez Hernández¹⁶

¹ Servicio de Nefrología, Hospital del Mar, Barcelona

² Servicio de Nefrología Pediátrica, Hospital Universitario La Paz, Madrid

³ Servicio de Nefrología y Trasplante Renal, Hospital Clínic, Barcelona

⁴ Servicio de Nefrología, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona

⁵ Servicio de Nefrología, Hospital General de Segovia, Segovia

⁶ Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz, Madrid

⁷ Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Fe, Valencia

⁸ Unidad de Trasplante Renal, Servicio de Nefrología, Fundació Puigvert, Barcelona

⁹ Área de Pediatría, Unidad de Nefrología Pediátrica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

¹⁰ Unidad de Trasplante Renal, Servicio de Nefrología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza

¹¹ Servicio de Nefrología, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia

¹² Servicio de Nefrología, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña

¹³ Servicio de Nefrología Pediátrica, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia

¹⁴ Servicio de Nefrología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

¹⁵ Servicio de Nefrología, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona

¹⁶ Servicio de Nefrología, Hospital General de Villalba, Madrid

Nefrología Sup Ext 2016;7(2):38-50

INTRODUCCIÓN

En trasplante renal (TR), la importancia de los anticuerpos antiantígenos leucocitarios humanos (anti-HLA por sus siglas en inglés, *anti-human leukocyte antigen*) dirigidos frente al donante quedó patente hace casi 50 años, cuando Patel y Terasaki mostraron las consecuencias de trasplantarse con una prueba cruzada positiva¹. El impacto de los anticuerpos donante específicos (ADE) pretrasplante en la supervivencia del injerto ha sido bien descrito en la literatura y caracterizar a los pacientes en función de su riesgo inmunológico, cuyo mayor peso recae en la presencia de

anticuerpos anti-HLA circulantes, ha sido la práctica habitual de las unidades de trasplante.

Sin embargo, a pesar de que desde los años ochenta se sugiere la importancia de los anticuerpos formados postrasplante² y desde los noventa varios estudios demuestran una sólida relación entre la detección precoz de ADE y la existencia de una forma de rechazo agudo especialmente severa³⁻⁵, su monitorización a medio y largo plazo no está extendida ni protocolizada. Esto puede deberse a tres razones fundamentalmente: el peso del rechazo agudo celular en las primeras épocas, la falta de técnicas sensibles, específicas y coste-efectivas para su determinación, y la ausencia de tratamientos específicos contra el daño humoral crónico clínico, patología con la que se asocian con frecuencia estos anticuerpos circulantes.

Correspondencia: M.^a José Pérez Sáez

Servicio de Nefrología.

Hospital del Mar, Barcelona.

mperezsaez@parcdesalutmar.cat

Con el desarrollo de las técnicas de fase sólida para la determinación de anticuerpos en suero, en los últimos años hemos asistido a una importante expansión de la investigación en este campo: desde la descripción de la simple existencia de estos anticuerpos *de novo* y su potencial impacto en el injerto renal, hasta las tendencias más actuales que intentan determinar cuáles de estos anticuerpos son realmente determinantes en la disfunción renal.

Otras técnicas para monitorizar la respuesta inmunológica postrasplante han sido investigadas o están en desarrollo, aunque su uso está incluso menos extendido.

El objetivo de este documento de consenso es dilucidar si la monitorización inmunológica postrasplante renal tiene impacto clínico, cuestión difícil de resolver teniendo en cuenta que se desconocen las medidas terapéuticas eficaces que pueden aplicarse como consecuencia de esta monitorización.

MONITORIZACIÓN DE ANTICUERPOS HLA Y NO HLA

Definición, frecuencia, momento de aparición e impacto en la supervivencia del injerto de los anticuerpos anti-HLA

Los ADE dirigidos frente a antígenos del donante más estudiados son los anticuerpos anti-HLA, que pueden estar presentes pretrasplante o aparecer *de novo* en cualquier momento tras el TR. Para que estos ADE puedan considerarse *de novo* es importante un estudio pretrasplante adecuado, con técnicas suficientemente sensibles. En la era de la detección de anticuerpos mediante técnicas basadas en la citotoxicidad, probablemente pasaban desapercibidos ADE presentes en el momento del trasplante. Desde la generalización del uso de técnicas de fase sólida para la detección de los anticuerpos anti-HLA, varios trabajos han documentado la incidencia de aparición de estos anticuerpos *de novo* postrasplante⁶⁻¹⁷ (tabla 1). La variabilidad en la incidencia de los ADE *de novo* (del 2% hasta casi el 20% en el primer año postrasplante) depende de diversos factores, como el riesgo inmunológico del paciente, el tipo de inmunosupresión re-

cibida, la frecuencia de monitorización pretrasplante, la técnica de detección (análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas [ELISA por sus siglas en inglés, *enzyme linked immunosorbent assay*], prácticamente abandonada, o Luminex), las variaciones de la técnica (diversos kits comerciales, procedimientos diferentes entre laboratorios), el punto de corte en la intensidad media de fluorescencia (MFI por sus siglas en inglés, *median fluorescence intensity*) escogido para definirlo como ADE, el tipo de valor empleado para su valoración (MFI cruda o normalizada) o los antígenos conocidos del donante (tipajes C, DQ-B, DQ-A y DP incluidos) (*nivel de evidencia alto*). Si se define como ADE pretrasplante el que se presenta en estudio de antígeno aislado con un título de MFI superior a 1.000, por ejemplo, la aparición del ADE *de novo* puede ser muy precoz debido a una respuesta de células B de memoria ante un antígeno conocido al haber infravalorado anticuerpos con MFI bajos^{9,10,12,14}. Sin embargo, si se definen los ADE pretrasplante con MFI bajos, como 500, la aparición de ADE *de novo* será menos frecuente y más tardía¹¹. En pacientes de bajo riesgo inmunológico y con terapia inmunosupresora consistente en tacrolimus, ácido micofenólico y esteroides, la incidencia de aparición de ADE *de novo* es del 2-10% al año. Aunque la cinética de aparición es variable, pueden detectarse desde el primer año postrasplante y los más frecuentes son de clase II, particularmente anti-DQ¹⁰.

En cuanto a factores asociados a la aparición de ADE *de novo*, tres estudios encontraron relación directa entre el número de disidentidades HLA entre donante y receptor (especialmente en clase II) y la aparición de anticuerpos tras el TR^{11,12,18}. Otros factores, como los episodios de rechazo agudo^{19,20}, los eventos inflamatorios^{21,22}, el retrasplante¹³, la no adherencia al tratamiento¹¹, la edad joven y el sexo femenino^{11,12,18,20}, se asocian también al desarrollo de ADE *de novo* (*nivel de evidencia alto*). Episodios inflamatorios como un rechazo agudo celular (clínico o subclínico) modifican la expresión de antígenos HLA por parte de las células endoteliales (barrera de protección del injerto; de hecho, un endotelio quiescente no expresa antígenos HLA de clase II) y potencialmente la consecuente activación T-dependiente de las células B para la producción de anticuerpos. Sin embargo, también es posible que la secuencia temporal sea la inversa, y con la aparición de los

Tabla 1. Principales estudios publicados sobre la determinación de anticuerpos donante específicos postrasplante renal

Autor/año (Diseño)	n	Inmunosupresión	Punto de corte MFI	Momento de aparición	Incidencia/ Prevalencia	Impacto en la supervivencia del injerto
Lachmann 2009 ⁶ (Transversal)	1014	CsA, 43%; TAC, 35%; AZA, 16%; MMF, 34%	MFI > 500	No aplicable	30% (mediana tiempo pos-TR 5 años)	49 frente a 83% a 5,5 años Impacto de HLA no DE No diferencia según clase ADE
Cooper 2011 ⁷ (Prospectivo)	244	TAC + MMF + EST, 79%	MFI > 500	90% primeros 6 meses	27% a 19 meses	Misma supervivencia si se excluyen los pacientes con ADE <i>de novo</i> sin RA
Ginevri 2012 ⁸ (Prospectivo)	82	CsA, 32%; TAC, 68% + MMF + EST (100% inducción)	MFI > 1.000	24 meses	23% a 4,3 años	
Willicombe 2012 ⁹ (Prospectivo)	505	Alemtuzumab + TAC	MFI > 300	10 meses	18% a 30 meses	Anti-DQ y anti-B se asocian a pérdida del injerto y RA 24-42% reducción supervivencia a 30-36 meses
De Vos 2012 ¹⁰ (Prospectivo, monitorización sistemática)	347	TAC + MMF + EST (100% inducción)	MFI > 2.000	6,1 meses	18% a 26 meses	Misma supervivencia si se excluyen los pacientes con ADE <i>de novo</i> sin RA
Wiebe 2012 ¹¹ (Prospectivo, monitorización sistemática)	315	CsA, 21%; TAC, 79% + MMF + EST (32% inducción)	MFI > 300	51 meses	1. ^{er} año -> 2% (no < 6 ^o mes) 10 años -> 28%	OR, 6,4 para pérdida del injerto (29% a 3 años) Clase I+II > pérdida que clase II aislada
Everly 2013 ¹² (Prospectivo, monitorización sistemática)	189	CsA, 69%; TAC, 30% + MMF + EST (100% inducción)	MFI > 1.000	17 meses	1. ^{er} año -> 11,2% 20 años -> 25%	20-39% pérdida a 3 años No diferencia según clase ADE
Loupy 2013 ¹³ (Prospectivo, monitorización sistemática)	1016	TAC + MMF + EST, 100% (100% inducción)	MFI > 500	12 meses	31%	HR, 4,78 (2,69-8,49) HR, 4 si C1q positivo -> positivo HR, 11 si C1q negativo -> positivo
De Kort 2013 ¹⁴ (Prospectivo)	559	Alemtuzumab + TAC, 79% Daclizumab + TAC + MMF, 21%	MFI > 300-500	3,8 meses	12,4% a 34 meses	

Tabla 1. (cont.)

Autor/año (Diseño)	n	Inmunosupresión	Punto de corte MFI	Momento de aparición	Incidencia/ Prevalencia	Impacto en la supervivencia del injerto
Kim 2014 ¹⁵ (Prospectivo)	146	TAC + EST (basiliximab y MMF si re-TR)	NO punto de corte	4 meses	35% (47% de ellos desaparecen)	Sin diferencias
De Vos 2014 ¹⁶ (Prospectivo, monitorización sistemática)	503	TAC/CsA + MMF + EST (100% inducción)	MFI > 2.000	6,1 meses	24% a 31 meses	Misma supervivencia si se excluyen los pacientes con ADE <i>de novo</i> sin RA
Heilman 2014 ¹⁷ (Prospectivo, monitorización sistemática)	245	TAC + MMF (100% inducción; si policlonal, STOP EST día 5)	MFI > 999	Primeros 12 meses	18% a 12 meses	Sin diferencias a 30 meses

ADE: anticuerpo donante específico; AZA: azatioprina; CsA: ciclosporina A; DE: donante específico; EST: esteroides; HLA: antígenos leucocitarios humanos; HR: *hazard ratio*; MFI: intensidad de fluorescencia media; MMF: micofenolato de mofetilo; OR: *odds ratio*; RA: rechazo agudo; TAC: tacrolimus; TR: trasplante renal.

ADE *de novo* se produzca el daño histológico (fundamentalmente inflamación microvascular) y la alteración de la función renal¹⁴ (*nivel de evidencia bajo*).

Las consecuencias de la aparición de ADE *de novo* no están claramente establecidas. Se ha descrito una mayor incidencia de rechazo agudo (anterior y posterior a la aparición de los anticuerpos) y peor supervivencia del injerto renal en pacientes que desarrollan anticuerpos tras el trasplante^{9-13,23} (*nivel de evidencia alto*), siendo este fenómeno más frecuente con anticuerpos frente a antígenos HLA de clase II y en concreto con anti-DQ donante específicos de aparición tardía⁹⁻¹¹ (*nivel de evidencia moderado*). El impacto en la supervivencia del injerto es controvertido y mientras que diversos estudios sugieren que es independiente del rechazo agudo¹¹⁻¹³, otros no han podido desvincular el impacto de la presencia del anticuerpo en el suero del propio rechazo, de manera que la influencia de los anticuerpos desaparece en aquellos pacientes que no habían tenido un rechazo^{7,10}. Asimismo, una MFI inicial elevada, el aumento de esta durante los primeros 24 meses postrasplante y la persistencia frente a la desaparición de los ADE *de novo* también se han asociado a peor función renal^{15,17,24} (tabla 1) (*nivel de evidencia moderado*).

Aunque los anticuerpos anti-HLA no donante específicos podrían tener un papel específico en la supervivencia del injerto⁶, trabajos recientes no confirman estos datos¹³.

Tipos de anticuerpos anti-HLA

El gran avance que ha supuesto el desarrollo de las técnicas de fase sólida para mejorar la determinación y la caracterización de los anticuerpos anti-HLA tanto pre como postrasplante, está dando paso a estudios cuyo objetivo es determinar cuáles son los anticuerpos con capacidad patogénica.

Diversos estudios han analizado la capacidad de los anticuerpos anti-HLA de fijar complemento en la plataforma Luminex®, tanto pre como postrasplante, para relacionarla con los resultados del TR (rechazo, supervivencia, etc.). Se han utilizado para ello diversas técnicas: el test de fijación del componente C4d en muestras pretrasplante²⁵, el test del componente C1q¹³ y el test del componente C3d²⁶. En líneas generales, la capacidad de fijar complemento de los anticuerpos anti-HLA *de novo* postrasplante se asocia a mayor capacidad patogénica de los mismos (*nivel de evidencia moderado*). El estudio

más importante describe una cohorte de más de 1.000 pacientes con TR; los que desarrollaron ADE al año del trasplante presentaron una supervivencia del injerto inferior en comparación con aquellos que no lo hicieron (el 54 frente al 93% a 5 años)¹³. Sin embargo, este hecho solo se confirmaba si los ADE eran capaces de fijar complemento (C1q), con un riesgo casi cinco veces superior de pérdida del injerto en el análisis multivariante. Es decir, la afinidad por C1q de los anticuerpos se asocia a una peor supervivencia del injerto (*nivel de evidencia moderado*). Dos hechos relevantes más se extraen de este estudio. Por un lado, los pacientes que presentaban peor supervivencia del injerto son aquellos con ADE C1q negativos en el pretrasplante que se convierten en C1q positivos en el postrasplante y, además, los anticuerpos con las MFI más elevadas son los que presentaban mayor capacidad de fijar complemento (*nivel de evidencia moderado*). Además de asociarse a peor supervivencia del injerto, la presencia de ADE C1q positivos se relacionó con una mayor incidencia de rechazo agudo, inflamación microvascular y depósito de C4d¹³. Otros trabajos han reproducido estos hallazgos en cohortes de pacientes más limitadas²⁷⁻²⁹.

Otro test que mide la capacidad de fijar complemento de los ADE es el test de C3d. La afinidad por C3d de los anticuerpos parece asociarse a peor pronóstico en la supervivencia del injerto, bien en pacientes con rechazo mediado por anticuerpos²⁶, bien en receptores pediátricos no sensibilizados previamente³⁰ (*nivel de evidencia bajo*).

Finalmente, otra característica asociada a la capacidad de fijar complemento y, por tanto, determinante de la patogenicidad de los anticuerpos es el subtipo de inmunoglobulina. Existen cuatro subclases de inmunoglobulina G (IgG), con distintas capacidades de activar complemento: la IgG1 y la IgG3 son más potentes que la IgG2 y la IgG4. Los ADE *de novo* IgG1 y 3 se han asociado a una peor supervivencia del injerto renal^{28,31,32} (*nivel de evidencia bajo*), aunque también existen otros trabajos que han relacionado los ADE isotipo IgM³¹ o subclase IgG4³³ con rechazo mediado por anticuerpos y fracaso del injerto. En el mejor de estos estudios, el tipo de ADE IgG3, el nivel de la MFI y la capacidad de fijar C1q se asociaron en un modelo multivariante a pérdida del injerto³².

Inmunosupresión y anticuerpos

Los estudios que analizan la incidencia de aparición de ADE *de novo* tras el TR presentan una variabilidad importante en cuanto a la inmunosupresión utilizada, tanto de inducción como de mantenimiento. Por consiguiente, establecer qué pauta de inmunosupresión se asocia con la menor incidencia de ADE *de novo* es difícil, al menos desde un punto de vista empírico.

Los inhibidores de la calcineurina (ICN) redujeron de forma muy significativa la incidencia de rechazo agudo y mejoraron la supervivencia del injerto a corto plazo, superior al 90% en el primer año. Sin embargo, los beneficios a más largo plazo de los ICN se han cuestionado clásicamente debido a su toxicidad. El debate actual se centra en la dicotomía entre la necesidad de una potente inmunosupresión basada en los ICN como la mejor forma potencial de evitar el desarrollo de ADE postrasplante y el rechazo humoral, y el hecho cierto de que la primera causa de pérdida del injerto renal es el fallecimiento del paciente con injerto funcional, con la necesidad ineludible de reducir el riesgo cardiovascular, las infecciones graves y las neoplasias malignas, favorecidas asimismo por los ICN.

Los inhibidores de la vía de la diana de la rapamicina en mamíferos (m-TOR por sus siglas en inglés, *mammalian target of rapamycin*), im-TOR, plantean una combinación diferente a la clásica ICN-ácido micofenólico-esteroides. Con estrategias de conversión de los ICN a los im-TOR o con combinaciones ICN + im-TOR, se pretende, por un lado, reducir la toxicidad de los ICN a largo plazo y mejorar el perfil de riesgo cardiovascular, de infecciones y de neoplasias, por otro. La tabla 2 muestra los principales resultados en cuanto al desarrollo de ADE de los estudios de conversión precoz y tardía de los ICN a los im-TOR^{18,34-38}. En cuanto a la conversión precoz a los im-TOR sin ICN (durante el primer año postrasplante, usualmente entre el tercer y cuarto mes), esta se asocia a una mayor aparición de ADE *de novo* en algunos estudios (*nivel de evidencia bajo*), siendo solo estadísticamente significativa en el trabajo de Liefeldt et al¹⁸. Este estudio presenta sesgos considerables, el más importante de los cuales es que la mayoría de los pacientes

Tabla 2. Principales estudios publicados relacionando im-TOR con la aparición de anticuerpos donante específicos

Autor/año	Diseño de estudio	n	Tiempo hasta la conversión	Seguimiento	Inmunosupresión de mantenimiento	Análisis univariante o multivariante*	
						ADE de novo	p
Conversión precoz (< 1 año) de los ICN a los im-TOR							
Lebranchu 2010 ³⁴	Prospectivo; randomizado	77	3 meses	48 meses	CsA o CsA convertida a SRL (MPA y EST)	12,3% SRL	ns
Liefeldt 2012 ¹⁸	Subanálisis de los pacientes incluidos en un único centro en dos ensayos controlados aleatorizados	127	3-4 meses	3,5 años (mediana)	CsA o CsA convertidos a EVR (MPA y EST –con 60% de suspensión de esteroides a 12 meses–)	HR = 2,67 EVR frente a CsA	0,035*
De Sandes-Freitas 2015 ³⁵	Prospectivo; randomizado	90	3 meses	24 meses	TAC convertidos a SRL (MMF y EST)	18 frente a 7,3%	0,201
Conversión tardía (> 1 año) de los ICN a los im-TOR							
Kamar 2013 ³⁶	Retrospectivo; caso-control	61	22 meses (mediana)	35 meses	CsA/TAC convertidos a EVR (MMF y EST)	9,8 frente a 5%	ns
Croze 2014 ³⁷	Retrospectivo; cohortes	270	1,3 años (media)	3,8 años (media)	TAC convertidos a SRL ± EST hasta mes 3	HR = 2,4 SRL frente a TAC	0,036*
Ruiz 2014 ³⁸	Retrospectivo; cohortes	35	69 meses [3-375] (mediana)	2 años	ICN convertidos a im-TOR ± MMF/AZA ± EST	8,6 frente a 0% controles (n = 10)	ns

ADE: anticuerpos donante específicos; AZA: azatioprina; CsA: ciclosporina A; EST: esteroides; EVR: everolimus; HR: *hazard ratio*; ICN: inhibidores de la calcineurina; im-TOR: inhibidores de diana de la rapamicina en mamíferos (m-TOR); MMF: micofenolato de mofetilo; MPA: ácido micofenólico; ns: no significativo; SRL: sirolimus; TAC: tacrolimus.

convertidos también suspendieron el tratamiento con corticoides³⁹. En cuanto a los estudios de conversión tardía, la aparición de ADE también es más frecuente en los pacientes que se convierten de ICN a im-TOR, nuevamente con tan solo un estudio con significación estadística y todos ellos de diseño retrospectivo. Los ADE pueden no ser *de novo*, presentándose especialmente en aquellos pacientes con anticuerpos preconversión³⁸ (*ni-*

vel de evidencia bajo). Por tanto, la conversión a una pauta libre de ICN debería realizarse en pacientes de bajo riesgo inmunológico, sin anticuerpos pretrasplante y con monitorización estrecha de los mismos tras la conversión (*nivel de evidencia bajo*).

Por otro lado, y aunque con un solo ensayo clínico publicado y prematuramente interrumpido por la tasa de recha-

zo agudo y desarrollo de ADE *de novo* en el brazo sin ICN, parece claro que la retirada precoz de ICN (dentro de los 6 primeros meses pos-TR) sin introducción de im-TOR (quedando en régimen ácido micofenólico-esteroides) se asocia a mayor aparición de ADE *de novo*⁴⁰ (*nivel de evidencia moderado-alto*).

Anticuerpos no anti-HLA

El impacto de los anticuerpos dirigidos frente a antígenos no HLA en la función y supervivencia del injerto renal no está bien establecido. El hecho de que los gemelos univitelinos HLA idénticos requieran inmunosupresión y la existencia de rechazos agudos de histología compatible con daño mediado por anticuerpos, sin hallazgo en suero de ADE anti-HLA, apoyan la existencia de antígenos no HLA que podrían activar la inmunidad celular y, en consecuencia, la producción de anticuerpos no anti-HLA en el receptor dirigidos contra ellos. No obstante, la falta de técnicas de detección validadas, el posible factor de confusión de la presencia factible de anticuerpos anti-HLA no detectados y la falta de especificidad documentada contra el donante han limitado el avance en esta área.

Los anticuerpos no HLA son llamados en términos generales «anticuerpos anticélulas endoteliales» (AECA por sus siglas en inglés, *antiendothelial cell antibodies*), ya que el endotelio es la barrera primaria de defensa del trasplante. Estos antígenos pueden ser polimórficos y capaces de provocar alorrespuesta, como las proteínas A y B relacionadas con el complejo mayor de histocompatibilidad I (MICA y MICB) o con limitado polimorfismo (autoanticuerpos) como el receptor 1 de la angiotensina II y muchos otros.

Existen trabajos que relacionan la presencia de anticuerpos anti no HLA con resultados del trasplante como el rechazo agudo y la supervivencia del injerto⁴¹⁻⁴⁴, mientras que otros no han encontrado asociación independiente^{45,46}. Parece que los pacientes que presentan anticuerpos anti-HLA y no HLA (ambos) muestran peor supervivencia del injerto⁴⁷ (*nivel de evidencia bajo*). Identificar qué antígenos de las células endoteliales inducen la producción de anticuerpos clínicamente significativos⁴⁸ o determinar es-

pecificidades contra el donante de anticuerpos anti-MIC (complejo mayor de histocompatibilidad I) en pacientes de riesgo⁴⁹ constituyen objetivos recientes de investigación.

Sin embargo, no existe evidencia suficiente que apoye la monitorización sistemática de anticuerpos anti no HLA postrasplante. Ante el hallazgo histológico de un rechazo mediado por anticuerpos en ausencia de anticuerpos anti-HLA detectables en suero, se debería considerar la búsqueda de anticuerpos no HLA (*nivel de evidencia bajo*).

Recomendaciones

¿Cómo tener que monitorizar a los pacientes? (figura 1)

Se recomienda realizar el cribado de los anticuerpos anti-HLA postrasplante mediante una técnica de fase sólida en la plataforma Luminex (*nivel de evidencia alto*) y si este cribado resulta positivo, se realizará la determinación de antígeno aislado.

En cuanto al punto de corte considerado para la positividad del anticuerpo, cualquier valor de la MFI puede ser positivo respecto al control negativo interno de cada laboratorio, aunque este sea de 450, 600 o 13.000. El punto de corte con impacto clínico no está definido, por lo que es necesario consensuarlo con el Servicio de Inmunología de cada hospital. De modo general, se considerará positivo un anticuerpo si la MFI es mayor a 1.000-1.500, siendo el significado dudoso si la MFI se encuentra entre 500 y 1.000 (*nivel de evidencia bajo*).

Ante el hallazgo de un ADE postrasplante, se sugiere realizar una técnica complementaria de fijación de complemento (mediante el test de C1q o de C3d) si está disponible en el hospital, ya que podría ayudar a la toma de decisiones clínicas (*nivel de evidencia bajo*).

Ante el hallazgo de un ADE *de novo*, se valorará la realización de una biopsia renal, aunque este no se acompañe de deterioro de la función renal o proteinuria (*nivel de evidencia bajo*).

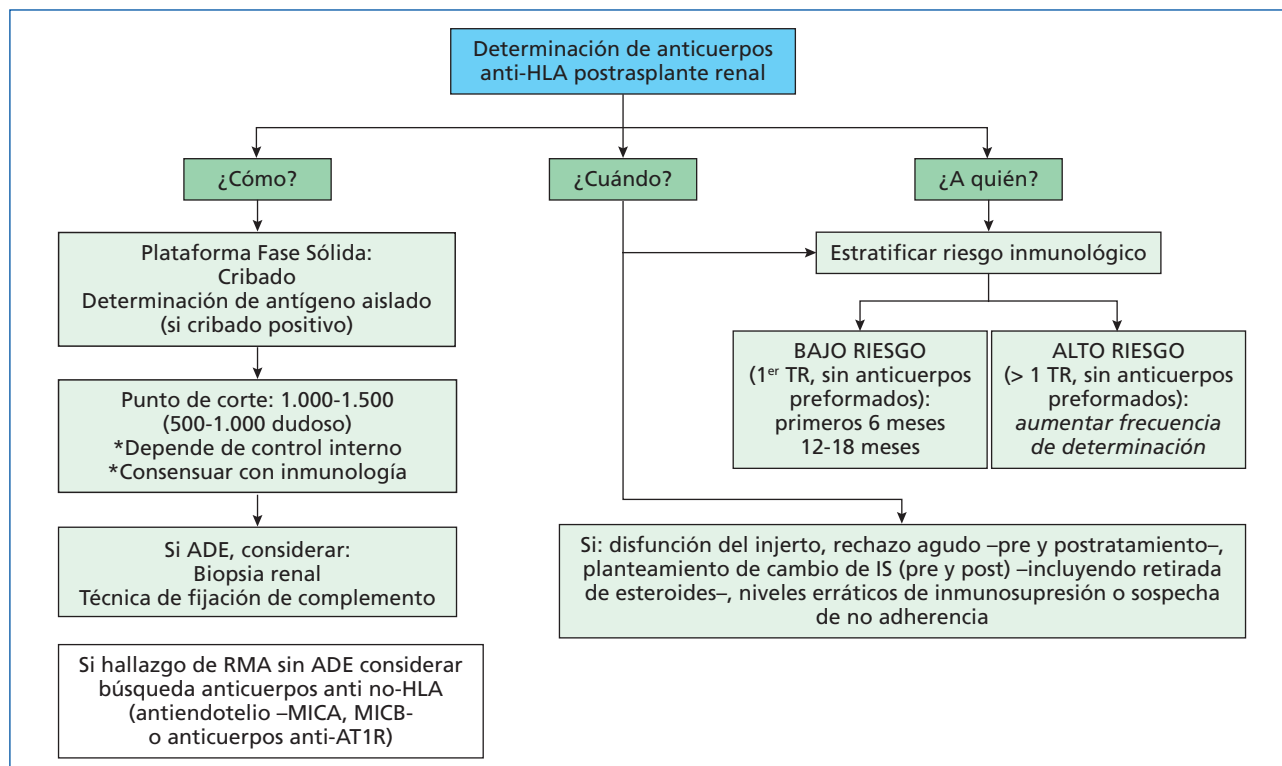


Figura 1. ADE: anticuerpo donante específico; HLA: antígenos leucocitarios humanos; IS: inmunosupresión. RMA: rechazo mediado por anticuerpos.

Ante la presencia de lesiones histológicas sugestivas en gran medida de ser mediadas por anticuerpos, pero con anticuerpos anti-HLA circulantes no detectables por técnicas de fase sólida, se valorará la búsqueda de anticuerpos no HLA como anticuerpos antiendotelio (MICA, MICB, anticuerpos anti-AT1R) (*nivel de evidencia bajo*).

¿Cuándo y a quién debo monitorizar? (figura 1)

Durante el estudio pretrasplante debe estratificarse el riesgo inmunológico de los pacientes en lista de espera y realizarse monitorización de los anticuerpos anti-HLA postrasplante de acuerdo con este riesgo:

- En pacientes de bajo riesgo inmunológico (primer TR sin anticuerpos anti-HLA pretrasplante) se recomiendan dos evaluaciones, durante los primeros 6 meses y a los 12-18 meses postrasplante.
- En pacientes de alto riesgo inmunológico (retrasplante o presencia de anticuerpos anti-HLA pretrasplante) se re-

comienda aumentar la frecuencia de determinación de los ADE.

Asimismo, se recomienda la determinación de anticuerpos anti-HLA o el aumento en la frecuencia de determinación de los mismos ante las siguientes situaciones:

- Complicaciones inmunológicas del injerto: disfunción del injerto, rechazo agudo –antes y después del tratamiento–.
- Cambios o inestabilidad en la inmunosupresión: planteamiento de cambio de inmunosupresión –incluyendo retirada de esteroides, determinando anticuerpos antes y después–, niveles erráticos de inmunosupresión o sospecha de no adherencia.
- Realización de una biopsia del injerto de «protocolo».

La necesidad de una monitorización estrecha del desarrollo de anti-HLA *de novo* debe relativizarse teniendo en cuenta la ausencia de una actitud terapéutica eficaz que pueda revertir o controlar su impacto *a posteriori*.

MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA T

Con la introducción de los ICN, y más aún combinados con potentes antiproliferativos, el rechazo agudo mediado por células T ha experimentado un descenso del 40% al 10-15% durante el primer año postrasplante⁵⁰. Las pérdidas inmunológicas de los injertos se deben fundamentalmente a un daño crónico mediado por anticuerpos, bien preformados o bien desarrollados postrasplante, en el que el peso de la célula T parece, al menos hasta ahora, menor⁵¹.

Sin embargo, siendo la célula T el principal mediador del rechazo agudo y considerando la baja incidencia actual del mismo, la monitorización de su alorreactividad postrasplante podría abrir la puerta del control sobre un exceso o un defecto de la inmunosupresión que aplicamos a nuestros pacientes y conducirnos hasta la deseada inmunosupresión «a la carta». Entre las técnicas disponibles para determinar esta alorreactividad, las más ampliamente utilizadas son la caracterización fenotípica de las subpoblaciones linfocitarias T mediante la citometría de flujo y la determinación de la liberación de trifosfato de adenosina (ATP por sus siglas en inglés, *adenosine triphosphate*), con el método Immuknow, o la secreción de citocinas (con un inmunospot ligado a enzimas [ELISpot por su denominación en inglés, *enzyme-linked immunospot*]) por parte del linfocito T⁵².

Immuknow

El Immuknow[®] (Cylex Ltd., Estados Unidos) es un test aprobado en 2002 por la United States Food and Drug Administration (FDA) que fue desarrollado como biomarcador de dosis de inmunosupresión. Se trata de un test que mide la liberación de ATP por parte del linfocito T cuando este se expone a un estímulo no específico⁵³. En teoría, los valores de ATP medido serán más altos si el linfocito T está poco inhibido por la inmunosupresión y serán más bajos en el contexto de sobreinmunosupresión. Numerosos estudios, la mayoría de naturaleza retrospectiva, han asociado valores altos de ATP con rechazo agudo y valores bajos con infecciones oportunistas en el paciente trasplantado⁵⁴⁻⁵⁷ (*nivel de evidencia bajo*). No obstante, el estudio con mayor número de pacientes publicado hasta la fecha⁵⁸

y un metaanálisis sobre todos los estudios publicados⁵⁹ no encontraron asociación entre el Immuknow y la capacidad predictiva de rechazo agudo (infrainmunosupresión) o infecciones (sobreinmunosupresión), por lo que no se recomienda la monitorización sistemática de la respuesta de la célula T postrasplante mediante este test.

ELISpot T

El ELISpot de interferón gamma (IFN- γ) o ELISpot T es una técnica validada, con un valor predictivo negativo alto, que permite identificar frecuencias de células T circulantes de memoria reactivas frente a antígenos del donante⁶⁰⁻⁶⁵ (*nivel de evidencia alto*). Los linfocitos presentes en la sangre periférica del receptor son incubados y enfrentados durante 18-24 horas a antígenos de células del donante, de modo que se permite que se produzca el alorreconocimiento y la consecuente liberación de citocinas, que es lo que finalmente mide el test⁶³. En el postrasplante, existen varios estudios que han correlacionado el ELISpot T con el rechazo agudo y la función del injerto^{62,64,65}.

No obstante, a falta de estudios prospectivos aleatorizados, no existe suficiente evidencia para recomendar realizar sistemáticamente un ELISpot T a los pacientes trasplantados para monitorizar la respuesta alogénica celular.

MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA B

Si la monitorización de la respuesta celular T se encuentra en una fase preliminar que dificulta tomar decisiones diagnóstico-terapéuticas basadas en ella, aún más experimental es el estudio de la respuesta celular B⁶⁶. Existen diferentes técnicas que permiten tanto la identificación de subpoblaciones linfocitarias B (citometría de flujo), como la evaluación de la funcionalidad de las células B (ELISpot B), que han mostrado interesantes asociaciones con un mayor riesgo de rechazo⁶⁷ (*nivel de evidencia bajo*).

No obstante, estas técnicas se encuentran en fase de experimentación o validación, por lo que no existe evidencia suficiente que apoye su utilización actualmente en la práctica clínica.

MICROARRAYS

Se ha relacionado la determinación de la expresión de distintos genes en sangre periférica con la posibilidad de predecir la aparición de rechazo agudo o tolerancia inmunológica y, aunque los resultados preliminares de un conjunto de transcritos concretos (test de respuesta de órganos sólidos [kSORT por sus siglas en inglés, *kidney solid organ response test*]) utilizados mediante un algoritmo estadístico específico (kSAS, por sus siglas en inglés *kSORT analysis suite*) tienen una buena correlación con rechazo agudo, son necesarios estudios prospectivos aleatorizados⁶⁸⁻⁷¹ (*nivel de evidencia bajo-moderado*).

OTROS

Se han descrito otros biomarcadores serológicos^{72,73} y en orina⁷⁴⁻⁷⁶ con capacidad predictiva de rechazo agudo. No obstante, no disponemos de evidencia suficiente que apoye la determinación de ninguno de ellos para la monitorización inmunológica postrasplante (*nivel de evidencia bajo*).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses potenciales relacionados con los contenidos de este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969;280:735-9.
- Martin S, Dyer PA, Mallick NP, Gokal R, Harris R, Johnson RW. Posttransplant antidonor lymphocytotoxic antibody production in relation to graft outcome. *Transplantation*. 1987;44:50-3.
- Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation*. 1990;49:85-91.
- Crespo M, Pascual M, Tolckoff-Rubin N, Mauyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation*. 2001;71:652-8.
- 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;3:708-14.
- Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation*. 2009;87:1505-13.
- Cooper JE, Gralla J, Cagle L, Goldberg R, Chan L, Wiseman AC. Inferior kidney allograft outcomes in patients with de novo donor-specific antibodies are due to acute rejection episodes. *Transplantation*. 2011;91:1103-9.
- Ginevri F, Nocera A, Comoli P, Innocente A, Cioni M, Parodi A, et al. Posttransplant de novo donor-specific HLA antibodies identify pediatric kidney recipients at risk for late antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2012;12:3356-62.
- Willicombe M, Brookes P, Sergeant R, Santos-Nunez E, Steggar C, Galliford J, et al. De novo DQ donor-specific antibodies are associated with significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Transplantation*. 2012;94:172-7.
- DeVos JM, Gaber AO, Knight RJ, Land GA, Suki WN, Gaber LW, et al. Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int*. 2012;82:598-694.
- 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;12:1157-67.
- Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation*. 2013;95:410-7.
- Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med*. 2013;369:1215-26.
- De Kort H, Willicombe M, Brookes P, Dominy KM, Santos-Nunez E, Galliford JW, et al. Microcirculation inflammation associates with outcome in renal transplant patients with de novo donor-specific antibodies. *Am J Transplant*. 2013;13:485-92.
- Kim JJ, Balasubramanian R, Michaelides G, Wittenhagen P, Sebiro NJ, Mamode N, et al. The clinical spectrum of de novo donor-specific antibodies in pediatric renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2014;14:2350-8.
- Devos JM, Gaber AO, Teeter LD, Graviss EA, Patel SJ, Land GA, et al. Intermediate-term graft loss after renal transplantation is associated with both donor-specific antibody and acute rejection. *Transplantation*. 2014;97:534-40.

17. 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;98:1310-5.
18. 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;12(5):1192-8.
19. Loupy A, Vernerey D, Tinel C, Aubert O, Duong van Huyen JP, Rabant M, et al. Subclinical rejection phenotypes at 1 year post-transplant and outcome of kidney allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:1721-31.
20. Crespo M, Yélamos J, Redondo D, Muntasell A, Pérez-Sáez MJ, López-Montañés M, et al. Circulating NK-cell subsets in renal allograft recipients with anti-HLA donor-specific antibodies. *Am J Transplant* 2015;15:806-14.
21. Locke JE, Zachary AA, Warren DS, Segev DL, Houp JA, Montgomery RA, et al. Proinflammatory events are associated with significant increases in breadth and strength of HLA-specific antibody. *Am J Transplant*. 2009;9:2136-9.
22. Katerinis I, Hadaya K, Duquesnoy R, Ferrari-Lacraz S, Meier S, van Delden C, et al. De novo anti-HLA antibody after pandemic H1N1 and seasonal influenza immunization in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2011;11:1727-33.
23. Yamamoto T, Watarai Y, Takeda A, Tsujita M, Hiramitsu T, Goto N, et al. De novo anti-HLA DSA characteristics and subclinical antibody-mediated kidney allograft injury. *Transplantation*. 2015. [Epub ahead of print].
24. Dieplinger G, Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Briley KP, Bolin P, et al. Changes in successive measures of de novo donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies intensity and the development of allograft dysfunction. *Transplantation*. 2014;98:1097-104.
25. Hönger G, Wahrman M, Amico P, Hopfer H, Böhmig GA, Schaub S. C4d-fixing capability of low-level donor-specific HLA antibodies is not predictive for early antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 2010;89:1471-5.
26. Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M, Couzi L, McGregor B, Badet L, et al. Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:457-67.
27. Yell M, Muth BL, Kaufman DB, Djmalali A, Ellis TM. C1q binding activity of de novo donor-specific HLA antibodies in renal transplant recipients with and without antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 2015;99:1151-5.
28. Freitas MCS, Rebellato LM, Ozawa M, Nguyen A, Sasaki N, Everly M, et al. The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes. *Transplantation*. 2013;95:1113-9.
29. Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, Savchik C, Masiakos P, Colovai A, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. *Kidney Int*. 2016;89:209-16.
30. Comoli P, Cioni M, Tagliamacco A, Quartuccio G, Innocente A, Fontana I, et al. Acquisition of C3d-binding activity by de novo donor-specific HLA antibodies correlates with graft loss in nonsensitized pediatric kidney recipients. *Am J Transplant*. 2016;16:2106-16.
31. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Briley KP, Bolin P, Kendrick WT, et al. Impact of IgM and IgG3 anti-HLA alloantibodies in primary renal allograft recipients. *Transplantation*. 2014;97:494-501.
32. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen JP, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG donor-specific anti-human HLA antibody subclasses and kidney allograft antibody-mediated injury. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:293-304.
33. Khovanova N, Daga S, Shaikhina T, Krishnan N, Jones J, Zehnder D, et al. Subclass analysis of donor HLA-specific IgG in antibody-incompatible renal transplantation reveals a significant association of IgG4 with rejection and graft failure. *Transpl Int*. 2015;28:1405-15.
34. Lebranchu Y, Toupance O, Touchard G, Thervet E, Etienne I, Westeel P, et al. Impact of early conversion at 3 months from cyclosporine (CsA) to sirolimus (SRL) in association with mycophenolate mofetil (MMF) on renal function – «Results at 48 months of follow up of a multicenter randomized controlled trial: the concept study». *Am J Transplant*. 2010;10(4 Supl):1-607.
35. De Sandes-Freitas TV, Felipe CR, Campos EF, 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;99:2372-81.
36. Kamar N, Del Bello A, Congy-Jolivet N, Guilbeau-Frugier C, Cardeau-Desangles I, Fort M, et al. Incidence of donor-specific antibodies in kidney transplant patients following conversion to an everolimus-based calcineurin inhibitor-free regimen. *Clin Transplant*. 2013;27:455-62.
37. Croze LE, Tetaz R, Roustit M, Malvezzi P, Janbon B, Jouve T, et al. Conversion to mammalian target of rapamycin inhibitors increases risk of de novo donor-specific antibodies. *Transpl Int*. 2014;27:775-83.
38. Ruiz San Millán JC, López-Hoyos M, San Segundo D, Quintela E, Rodrigo E, Gómez-Alamillo C, et al. Predictive factors of allosen-

- sitization in renal transplant patients switched from calcineurin to mTOR inhibitors. *Transpl Int.* 2014;27:847-56.
39. Pascual J, Arns W. Does everolimus increase donor-specific HLA antibodies in kidney transplant recipients? *Am J Transplant.* 2012;12:2561-2.
 40. Hricik DE, Formica RN, Nickerson P, Rush D, Fairchild RL, Poggio ED, et al. Adverse outcomes of tacrolimus withdrawal in immune-quiet kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:3114-22.
 41. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med.* 2007;357:1293-1300.
 42. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant.* 2007;7:408-15.
 43. Sánchez Zapardiel E, Castro Panete MJ, Castillo Rama M, Morales P, Lora-Pablos D, Valero-Hervás D, et al. Harmful effect of preformed anti-MICA antibodies on renal allograft evolution in early posttransplantation period. *Transplantation.* 2013;96:70-8.
 44. Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelhä M, Dechend R, et al. Angiotensin II type-1 receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med.* 2005;352:558-569.
 45. Lemy A, Andrien M, Wissing KM, Ryhahi K, Vandersarren A, Racapé J, et al. Major histocompatibility complex class 1 chain-related antigen A antibodies: sensitizing events and impact on renal graft outcomes. *Transplantation.* 2010;90:168-74.
 46. Lemy A, Andrien M, Lionet A, Labalette M, Noel C, Hiesse C, et al. Posttransplant major histocompatibility complex class I chain-related gene A antibodies and long-term graft outcomes in a multicenter cohort of 779 kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2012;93:1258-64.
 47. Taniguchi M, Rebellato LM, Cai J, Hopfield J, Briley KP, Haisch CE, et al. Higher risk of kidney graft failure in the presence of anti-angiotensin II type-1 receptor antibodies. *Am J Transplant.* 2013;13:2577-89.
 48. Jackson AM, Sigdel TK, Delville M, Hsieh SC, Dai H, Bagnasco S, et al. Endothelial cell antibodies associated with novel targets and increased rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:1161-75.
 49. Ming Y, Hu J, Luo Q, Ding X, Luo W, Zhuang Q, et al. Acute antibody-mediated rejection in presence of MICA-DSA and successful renal re-transplant with negative-MICA virtual crossmatch. *Plos One.* 2015;10:e0127861.
 50. Disponible en: http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual_reports/2012/pdf/01_kidney_13.pdf
 51. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant.* 2012;12:388-99.
 52. Mehrotra A, Leventhal J, Purroy C, Cravedi P. Monitoring T cell alloreactivity. *Transplant Rev.* 2015;29:53-9.
 53. Kowalski R, Post D, Schneider MC, Britz J, Thomas J, Deierhoi M, et al. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin Transplant.* 2003;17:77-88.
 54. He J, Li Y, Zhang H, Wei X, Zheng H, Xu C, et al. Immune function assay (ImmuKnow) as a predictor of allograft rejection and infection in kidney transplantation. *Clin Transplant.* 2013;27:E351-8.
 55. Gralla J, Huskey J, Wiseman AC. Trends in immune function assay (ImmuKnow; Cylex™) results in the first year post-transplant and relationship to BK virus infection. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:2565-70.
 56. Myslik F, House AA, Yanko D, Warren J, Caumartin Y, Rehman F, et al. Preoperative Cylex assay predicts rejection risk in patients with kidney transplant. *Clin Transplant.* 2014;28:606-10.
 57. Wang XZ, Jin ZK, Tian XH, Xue WJ, Tian PX, Ding XM, et al. Increased intracellular adenosine triphosphate level as an index to predict acute rejection in kidney transplant recipients. *Transplant Immunology.* 2014;30:18-23.
 58. Huskey J, Gralla J, Wiseman AC. Single time point immune function assay (ImmuKnow) testing does not aid in the prediction of future opportunistic infections or acute rejection. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6:423-9.
 59. Ling X, Xiong J, Liang W, Schroder PM, Wu L, Ju W, et al. Can immune cell function assay identify patients at risk of infection or rejection? A meta-analysis. *Transplantation.* 2012;93:737-43.
 60. Näther BJ, Nickel P, Bold G, Presber F, Schönemann C, Pratschke J, et al. Modified ELISPOT technique - Highly significant inverse correlation of post-Tx donor-reactive IFN γ -producing cell frequencies with 6 and 12 months graft function in kidney transplant recipients. *Transplant Immunology.* 2006;16:232-7.
 61. Bestard O, Crespo E, Stein M, Lúcia M, Roelen DL, de Vaal YJ, et al. Cross-validation of IFN γ Elispot assay for measuring alloreactive memory/effector T cell responses in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2013;13:1880-90.
 62. Bestard O, Cruzado JM, Lucia M, Crespo E, Casis L, Sawitzki B, et al. Prospective assessment of antidonor cellular alloreactivity is a tool for guidance of immunosuppression in kidney transplantation. *Kidney Int.* 2013;84:1226-36.

63. Mashishi T, Gray CM. The ELISPOT assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40:903-10.
64. Hricik DE, Rodriguez V, Riley J, Bryan K, Tary-Lehmann M, Greenspan N, et al. Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2003;3:878-84.
65. Bestard O, Nickel P, Cruzado JM, Schoenemann C, Boenisch O, Sefrin A, et al. Circulating alloreactive T cells correlate with graft function in longstanding renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:1419-29.
66. Crespo M, Heidt S, Redondo D, Pascual J. Monitoring B cell subsets and alloreactivity in kidney transplantation. *Transplant Rev*. 2015;29:45-52.
67. Lúcia M, Luque S, Crespo E, Melilli E, Cruzado JM, Martorell J, et al. Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney Int*. 2015;8:874-87.
68. Li L, Khatri P, Sidgel T, Tran T, Ying L, Vitalone MJ, et al. A peripheral blood diagnostic test for acute rejection in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2012;12:2710-8.
69. 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;11:e1001759.
70. Roedder S, Li L, Alonso MN, Hsieh SC, Vu MT, Dai H, et al. A three-gene assay for monitoring immune quiescence in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:2042-53.
71. Dorr C, Wu B, Guan W, Muthusamy A, Sanghavi K, Schladt DP, et al. Differentially expressed gene transcripts using RNA sequencing from the blood of immunosuppressed kidney allograft recipients. *Plos One*. 2015;10:e0125045.
72. Vaidya S, Partlow D, Barnes T, Thomas P, Gugliuzza K. Soluble CD30 concentrations in ESRD patients with and without panel reactive HLA antibodies. *Clin Transplant*. 2006;20:461-4.
73. Domingues EM, Matuck T, Graciano ML, Souza E, Rioja S, Falci MC, et al. Panel reactive HLA antibodies, soluble CD30 levels, and acute rejection six months following renal transplant. *Clin Transplant*. 2010;24:821-9.
74. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, Abecassis M, Dadhania D, Samstein B, et al. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *New Engl J Med*. 2013;369:20-31.
75. Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, Poggio ED, Rush D, Newell KA, et al. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant*. 2013;13:2634-44.
76. Rabant M, Amrouche L, Lebreton X, Aulagnon F, Benon A, Sauvaget V, et al. Urinary C-X-C motif chemokine 10 independently improves the noninvasive diagnosis of antibody-mediated kidney allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:2840-51.