

Anticorpi anti-endotelio nel trapianto di rene e di pancreas: aspetti metodologici e clinici

INTRODUZIONE

Alcuni studi recenti hanno suggerito un ruolo importante dell'autoimmunità nella patogenesi del rigetto d'organo. Casi eclatanti e ben noti sono rappresentati dalla recidiva del diabete mellito di tipo 1 dopo trapianto di pancreas e delle nefropatie immunomediate (quali la nefropatia da IgA e la glomerulosclerosi focale segmentale) dopo trapianto di rene. Al di là di questi ultimi, altri scenari si aprono quando si considerano pazienti che prima del trapianto non avevano patologie autoimmuni, o che comunque non hanno una patologia autoimmune come causa dell'insufficienza terminale d'organo che ha condotto al trapianto. A questo proposito un buon esempio è costituito da studi condotti in riceventi di trapianto di polmone, che hanno mostrato una forte correlazione tra lo sviluppo di anticorpi verso una proteina *self*, la tubulina K- α 1 (KAT) e lo sviluppo della sindrome da bronchiolite obliterante (BOS, *bronchiolitis obliterans syndrome*) (Goers et al., 2008). Lavori di Wilkes e Burlingham (Burlingham et al., 2007) hanno allo stesso modo fornito prove convincenti del ruolo che l'autoimmunità diretta verso il collagene di tipo V (ColV), una proteina *self* sequestrata ma ugualmente immunogenica nel tessuto polmonare, riveste nello sviluppo del rigetto cronico dopo trapianto di polmone (Sumpter e Wilkes, 2004). Il rimodellamento tissutale che segue il trapianto è in grado di esporre antigeni *self* o determinanti antigenici criptici che possono innescare risposte immunitarie tramite cellule T *helper*. Sebbene la risposta alloimmune abbia un ruolo inconfutabile nella patogenesi dei rigetti, una parte dei riceventi di trapianto d'organo che vanno incontro a rigetto cronico non presenta alcun anticorpo anti-HLA (*human leucocyte antigen*) specifico per il donatore (*donor-specific antigen*, DSA) rilevabile. In molti di questi casi, anticorpi diretti verso antigeni non-HLA sono stati implicati nello sviluppo del rigetto cronico. Esperimenti condotti su trapianti di cuore singenici hanno fornito la prova iniziale che il rigetto cronico poteva essere indotto anche in assenza di risposta alloimmune. E' stato mostrato, ad esempio, che l'autoreattività mediata da linfociti T verso la miosina cardiaca, un antigene *self*, si sviluppa e persiste in assenza di qualunque risposta alloimmune, associandosi all'insorgenza della vasculopatia cronica dell'allograft (*chronic allograft vasculopathy*, CAV). In aggiunta, la sensibilizzazione pre-trapianto verso la miosina cardiaca può risultare nel rigetto accelerato sia di trapianti di cuore allogenici che singenici (Smith et al., 2009). Gli studi hanno anche indicato che gli anticorpi contro la vimentina, una proteina del citoscheletro, sono un fattore di rischio indipendente per aterosclerosi a seguito di trapianto di cuore e possono contribuire

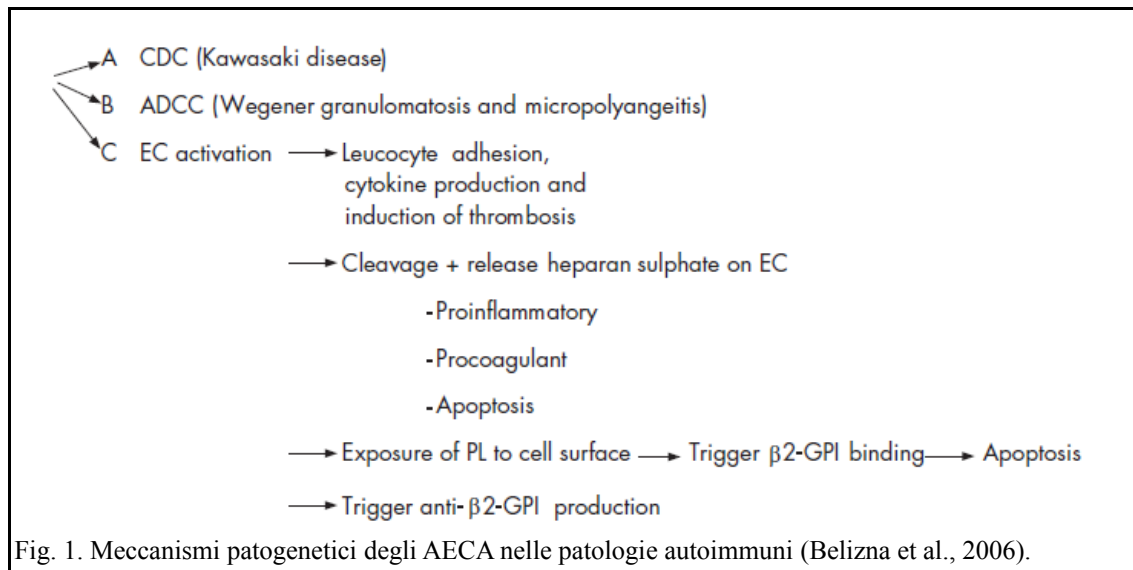
all'esordio accelerato della CAV e che i pazienti con CAV possono sviluppare anticorpi verso antigeni *self*, inclusi miosina, vimentina, ColIV e KAT (Nath et al., 2010). Per quanto riguarda i trapianti di rene un recente studio multicentrico, che riguardava rigetti vascolari refrattari in assenza di anticorpi anti-HLA, ha dimostrato che la presenza di anticorpi diretti verso due epitopi della seconda ansa extracellulare del recettore per l'angiotensina 1 (AT1R) potrebbero essere utili nell'identificare quei pazienti a rischio di tale complicanza (Reinsmoen et al., 2010). Nell'ambito della nefropatia cronica dell'allotrapiantato (*chronic allograft nephropathy*, CAN) sono stati inoltre identificati nuovi bersagli anticorpali quali proteine *self* specifiche della cellula mesangiale e della membrana glomerulare basale (decorina, agrina, collagene tipo IV e vimentina). (Paul et al., 2009) (Joosten et al., 2005). Questa messe di dati supporta fortemente l'idea che le risposte alloimmuni e autoimmuni siano intimamente interconnesse e possano determinare un *milieu* immunologico favorevole ad ogni tipo di rigetto.

Le cellule endoteliali che rivestono i vasi degli organi trapiantati rappresentano un bersaglio chiave per la risposta immunitaria diretta contro il trapianto. Esprimendo contemporaneamente antigeni HLA di classe I in condizioni basali e di classe II quando attivate da *triggers* infiammatori di qualunque tipo compresi i processi di ischemia-riperfusione, esse possono diventare il bersaglio di anticorpi anti-HLA sia preformati che di nuova sintesi (Pober et al., 1996). Sebbene sia chiarito che gli antigeni HLA espressi sulle cellule endoteliali siano implicati, elicitando lo sviluppo di alloanticorpi, nella genesi del rigetto d'organo acuto e cronico e nella perdita del *graft* (Lefauscher et al., 2010), il ruolo di altri antigeni endoteliali, noti come non-HLA, rimane meno chiaro. La presenza di anticorpi rivolti contro antigeni non-HLA, la maggior parte dei quali identificabili sulle cellule endoteliali e sui monociti, ma non su linfociti B e T, è stata riscontrata per la prima volta nell'ambito di trapianti di rene HLA identici, indicando che anche gli antigeni non-HLA possono determinare l'insorgenza di rigetti acuti (Cerilli et al., 1985). Studi su trapianti da donatore vivente consanguineo hanno dimostrato che la presenza di IgM reattive nei confronti dell'endotelio e dei monociti correlava con rigetti acuti e perdita del *graft*. Sebbene sembri che fino all'80% dei rigetti non trattabili in questo gruppo di pazienti sia ascrivibile a questa risposta anticorpale (Paul et al., 1985), non è ancora ben chiara l'esatta natura di questi particolari antigeni non-HLA correlati. Effettivamente, in considerazione del fatto che la sola risposta umorale HLA correlata non è in grado di spiegare tutti i rigetti acuti anticorpo-mediati l'attenzione della ricerca è sempre più rivolta anche verso lo studio

degli antigeni non-HLA correlati in grado di stimolare risposte anticorpali nel ricevente, come la vimentina, l'actina, la tubulina, il recettore tipo 1 dell'angiotensina II e gli antigeni eterogenei contro cui è rivolta la risposta degli anticorpi contro le cellule endoteliali (AECA, *anti-endothelial cell antibodies*) (Dragun, 2008), oggetto di questa trattazione.

Gli anticorpi anti-cellule endoteliali, noti da più di 30 anni (Linquist e Osterland, 1971) sono stati inizialmente identificati come autoanticorpi coinvolti in una grande varietà di patologie immunomediate e connettiviti sistemiche quali la malattia di Kawasaki, le vasculiti dei piccoli vasi (Del Papa et al., 1996), la vasculite reumatoide (Heurkens et al., 1989), la sclerosi sistemica (Lunardi et al., 2000) ed il lupus eritematoso sistemico (Bordron et al., 1998), ma anche in malattie renali primitive come la nefropatia da IgA (Yap et al., 1988). Effettivamente essi non rappresentano un'entità univoca, bensì un gruppo eterogeneo di anticorpi diretti contro una varietà di determinanti antigenici situati sulla superficie delle cellule endoteliali. La maggior parte delle considerazioni patogenetiche sugli AECA si riferiscono al loro ruolo, peraltro molto discusso, nelle malattie immunomediate. Una loro citotossicità diretta è stata provata solo in alcune patologie, come per esempio la malattia di Kawasaki, mentre in altre, come la granulomatosi di Wegener, sembrano prevalere meccanismi indiretti quali la citotossicità anticorpo-dipendente cellulo-mediata (ADCC, *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) (Del Papa et al., 1996). E' stato osservato che l'incubazione *in vitro* di cellule endoteliali con AECA ottenuti dai sieri di pazienti con connettiviti sistemiche determina un profondo cambiamento nel fenotipo cellulare con espressione di molecole di adesione come l'E-selectina e la molecola di adesione intercellulare-1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*) nonché la secrezione di citochine pro-infiammatorie quali l'interleuchina-1 (IL-1) e il TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*) (Del Papa et al., 1999). La stessa interazione anticorpo-endotelio sembra in grado, sempre *in vitro*, di determinare almeno in parte la perdita della capacità anticoagulante della cellula endoteliale tramite l'alterazione del metabolismo dell'eparan-solfato e la liberazione di fattore tissutale, e di innescare processi pro-trombotici profondamente interconnessi con quelli pro-infiammatori. Ancora più recente è l'acquisizione che gli AECA possano, almeno *in vitro* innescare l'apoptosi delle cellule endoteliali sia direttamente, tramite il recettore Fas, che indirettamente tramite l'esposizione di fosfolipidi di membrana normalmente nascosti che fungono da *trigger* per lo sviluppo di anticorpi anti-fosfolipidi (fig. 1). Un altro meccanismo implicato nel processo di morte

cellulare programmata sarebbe il legame degli AECA con una peptide di 60 kDa, l'Hsp 60 (*heat shock protein*) espressa sulla membrana endoteliale.



Molti studi sono stati condotti nel tentativo di identificare con precisione i bersagli degli AECA, si tratta infatti di antigeni eterogenei non ancora completamente chiariti tra i quali figurano proteine citoscheletriche con domini extracellulari (in genere molecole di interazione con la matrice extracellulare) che possono essere espresse in tutto l'endotelio oppure solo nel microcircolo piuttosto che nei vasi di piccolo calibro (Belizna et al., 2006). Uno studio di Hernandez del 2011 si è soffermato sulla prevalenza e il possibile ruolo degli AECA nei pazienti con insufficienza renale cronica terminale (ESRD, *end stage terminal disease*) utilizzando un particolare gruppo di cellule endoteliali renali (HKEC, *human kidney endothelial cell*) ed indagando quindi le relazioni organo-specifiche degli anticorpi. Innanzitutto fu rilevato che una quota molto maggiore e significativa dei pazienti con ESRD era sierologicamente positiva per IgG AECA e che inoltre questi ultimi presentavano una forte affinità per le cellule HKEC e molto scarsa per cellule endoteliali provenienti da altri organi. L'incubazione delle HKEC con gli AECA prelevati dai pazienti con ESRD determinava un sostanziale decremento nella sintesi delle proteine implicate nelle giunzioni strette intercellulari, un aumento del calcio citoplasmatico con riduzione di caderina e claudina ed in definitiva un profondo rimaneggiamento citoscheletrico che conduceva ad un aumento della permeabilità di un singolo strato di HKEC anche a molecole di peso relativamente alto. Dal punto di vista clinico i pazienti nefropatici con ESRD positivi per AECA

presentavano valori pressori più alti senza alcuna differenza nei valori dei comuni indici di flogosi e neanche di interleuchina-6 plasmatica (Hernandez et al., 2012).

A rendere il quadro ancora più complesso vi è la certezza che gli AECA siano talvolta presenti in soggetti apparentemente sani e presentino una forte affinità sia per antigeni di membrana implicati nella struttura citoscheletrica (actina, vimentina, tubulina) che per proteine strettamente legate ad attività metaboliche come l'alfa-enolasi e la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi. Nei soggetti sani questi anticorpi "naturali" potrebbero addirittura ricoprire un ruolo anti-infiammatorio ed anti-trombotico regolando l'attivazione delle cellule endoteliali (Servettaz et al., 2008).

Nell'ambito del trapianto renale valgono i concetti fin qui espressi esaltati dalla particolare fisiologia renale che vede ancora una volta le cellule endoteliali situate in una localizzazione critica all'interno di organi così riccamente perfusi e quindi potenziali *triggers* per la risposta umorale (Sis et al., 2009). E' stato prospettato che anticorpi rivolti contro gli antigeni endoteliali abbiano un importante ruolo nella patogenesi sia dei rigetti iperacuti (Jordan et al., 1988; Grandteranova et al., 2008; Jackson et al., 2012) che in quelli acuti e cronici (Sun et al., 2008), tanto che dalla classificazione Banff del 2001 essi sono stati proposti come causa di rigetto umorale in aggiunta alla presenza dei più conosciuti anticorpi rivolti contro l'HLA del donatore (DSA, *donor specific antibodies*) (Racusen et al., 2003).

A dispetto delle crescenti evidenze circa un loro ruolo nella genesi del rigetto contro il *graft* l'esatto meccanismo patogenetico degli AECA non è stato ancora spiegato (Rose et al., 2001) ed inoltre l'eterogeneità degli antigeni coinvolti, verosimilmente correlata allo sviluppo di AECA differenti e con vari meccanismi d'azione, ha implicato anche una difficoltà nello sviluppo di test adeguati alla loro misurazione (Glotz et al., 2006). Permane al momento anche la difficoltà di comprenderne la genesi sebbene alcune considerazioni parziali derivino da studi effettuati in ambito infettivologico. Lo sviluppo di AECA nel post-trapianto di rene è stato infatti correlato a fattori infettivi immunomodulanti come le infezioni da CMV. Costa nel 2010 (Costa et al., 2010) dimostrò ad esempio come vi potesse essere un'associazione significativa tra comparsa *de novo* di AECA e l'occorrenza di infezioni da CMV in 96 trapiantati di rene, nonché un legame tra rigetti acuti vascolari, infezione da CMV e AECA, suggerendo un ruolo patogenetico del CMV nell'indurre danno endoteliale sia direttamente che stimolando la produzione autoanticorpale. Precedentemente Toyoda nel 1997 aveva evidenziato come, in pazienti trapiantati di cuore o rene da cadavere, gli AECA misurati tramite ELISA

(*enzyme-linked immunoabsorbent assay*) e il livello di IL-2 aumentassero significativamente nell'arco di tre settimane a partire dal riscontro di viremia da CMV e persistessero anche per alcuni mesi (Toyoda et al, 1997). Lo stesso Toyoda nel 1999, tramite tecniche di elettroforesi e Western blot, caratterizzò meglio la struttura degli anticorpi AECA sviluppati in seguito a infezioni da CMV. Lo studio concluse che gli autoanticorpi indotti dalla viremia da CMV non fossero specifici per le cellule endoteliali, ma presentassero un'affinità verso le piastrine, i monociti e i fibroblasti ed inoltre facessero parte di un'attivazione immunitaria policlonale di dubbio significato clinico (Toyoda et al., 1999). Infine bisogna sottolineare che anche nel trapianto di altri organi, quali il fegato, il numero di infezioni da CMV sembra correlare con lo sviluppo di un'ampia risposta autoanticorpale, verosimilmente attivando l'endotelio con successiva esposizione di determinanti antigenici "nascosti"(Varani et al., 2002).

Dal punto di vista prettamente clinico gli studi in quest'ambito si sono susseguiti negli ultimi 10 anni spesso con risultati contraddittori. Un solo studio del 2001 (Shin et al., 2001) valutò la prevalenza degli AECA nella popolazione sana, rappresentata da 68 soggetti, oltre che in 111 pazienti in dialisi e in 58 trapiantati di rene da vivente. Il titolo degli AECA nella popolazione in dialisi risultò più alto che nella popolazione sana di riferimento in maniera significativa e senza differenze tra emodialisi e dialisi peritoneale. Nella popolazione trapiantata il titolo AECA pre-trapianto sembrava associato positivamente ad un maggior rischio di rigetto ed inoltre si assisteva ad una riduzione significativa del titolo AECA dopo il trapianto stesso.

Nel 2002 Nakagawa studiò i sieri di 22 pazienti trapiantati di rene con metodica ELISA immediatamente nel pre-trapianto e poi una volta a settimana per i successivi 13 mesi riscontrando una correlazione significativa tra AECA e il numero di rigetti multipli, specie nei pazienti con alto titolo anticorpale nel pre-trapianto (Nakagawa et al., 2002).

Nel 2003 il gruppo di Le Bas-Bernardet studiò i sieri pre-trapianto di 57 pazienti riceventi un rene da donatore cadavere utilizzando la citofluorimetria per identificare la presenza di AECA su cellule endoteliali umane coltivate e attivate o meno con IFN- γ o TNF- α . Gli AECA risultarono associati significativamente a pazienti HLA-sensibilizzati riscontrati con PRA (*panel reactive antibodies*) maggiori del 10%, ma la valutazione retrospettiva non evidenziò alcuna associazione tra rigetti acuti, *outcome* del *graft* e AECA, mentre *in vitro* fu possibile dimostrare da una parte l'affinità di questi ultimi con molecole di superficie esposte sulle cellule endoteliali attivate e dall'altra la maggiore mortalità per apoptosi delle cellule legate agli AECA (Le Bas-Bernardet et al., 2003).

Nel 2005 Sun descrisse 3 casi di grave rigetto vascolare associato ad incremento del titolo anticorpale degli AECA. Esso tendeva a rimanere elevato nei pazienti con *outcome* peggiore e a ridursi nell'unico paziente che aveva ottenuto un recupero della funzione renale dopo il trattamento. Da questa osservazione effettuata su pochi casi l'autore sviluppò una serie di studi successivi atti a valutare l'impatto degli stessi anticorpi sull'*outcome* del *graft* renale (Sun et al., 2005). Nel 2008, infatti, lo stesso Sun pubblicò uno studio retrospettivo effettuato su 635 riceventi di rene da cadavere i cui sieri erano stati prelevati nel pre-trapianto e conservati. Il confronto tra il numero, il tipo, la gravità istologica e clinica dei rigetti nei pazienti AECA+ e quelli AECA- permise di affermare che nei pazienti AECA+ i rigetti, prevalentemente vascolari, fossero associati a un maggiore impegno sia dal punto visto istopatologico che clinico, con una maggiore associazione a infiltrato intersistiziale plasmacellulare, un maggior tasso di rigetti steroideo-resistenti, con un maggior numero di rigetti multipli e un peggior *outcome* della funzionalità del *graft* a un anno suggerendo quindi un controllo di routine di questa classe anticorpale prima e dopo il trapianto di rene (Sun et al., 2008).

Nel 2009 uno studio retrospettivo di Han effettuato su 392 pazienti i cui sieri erano stati studiati per AECA con metodica ELISA e successivo *follow-up* di 6 mesi riscontrò una positività anticorpale del 16 % ed ancora un'associazione significativa tra numero di rigetti acuti ed AECA proponendo la presenza di questi ultimi, già nel pre-trapianto, come un fattore di rischio per l'insorgenza di rigetti acuti gravi (cellulo-mediati dal II grado in su nella classificazione di Banff) (Han et al., 2009).

La stessa conclusione fu raggiunta dal gruppo di Ismail nel 2009. Nello studio venivano presi in considerazione 60 pazienti con trapianto di rene da donatore vivente studiati per la presenza di AECA nel pre-trapianto. Secondo gli autori la presenza degli AECA condizionava negativamente e in maniera significativa la durata del trapianto a 5 anni, la creatininemia a 1 mese e a 1 anno dal trapianto e il numero di rigetti acuti (Ismail et al., 2009).

Più recentemente, alla fine del 2010, ancora Sun ha pubblicato uno degli studi più interessanti sull'argomento prendendo in considerazione 226 pazienti trapiantati di rene da cadavere i cui sieri venivano raccolti nell'immediato pre-trapianto e successivamente a intervalli regolari per un *follow-up* mediano di 3 anni. Gli AECA erano ricercati con una metodica più semplice e meno costosa della citofluorimetria, l'immunofluorescenza indiretta, e permettevano di distinguere i pazienti in tre gruppi: persistentemente negativi per

AECA, un gruppo che si positivizzava successivamente (22 pazienti) ed uno persistentemente positivo già nel pre-trapianto. Gli autori concludevano che non vi era alcuna differenza significativa nell'*outcome* del *graft* tra i pazienti persistentemente negativi e quelli persistentemente positivi, mentre nel gruppo che sviluppava AECA *de novo* era possibile ravvisare un numero significativamente maggiore di rigetti acuti precoci (al di sotto di due settimane dal trapianto), steroido-resistenti, multipli e con un maggior impegno vascolare alla biopsia renale (Sun et al., 2010).

Alla luce di questi risultati contraddittori abbiamo valutato la prevalenza, l'incidenza e l'impatto degli AECA su una popolazione di trapiantati più eterogenea rispetto a quella degli studi precedenti e comprendente per la prima volta anche i trapianti di pancreas.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Lo studio include 168 pazienti trapiantati consecutivamente a Pisa dal 1/10/2009 al 30/06/2012 e così distribuiti: 40 esclusi per follow-up inferiore a 6 mesi (mancanza sieri per AECA, decesso, espianto del graft o perchè seguiti presso altro Centro) o per esecuzione di plasmateresi o immunoadsorbimento di desensibilizzazione o terapeutica peri- e/o post-trapianto, 45 (35,2 %) trapianti di rene da donatore cadavere singoli o doppi, 52 (40,6 %) trapianti di rene da donatore vivente, 1 (0,8 %) trapianto simultaneo di pancreas da cadavere e di rene da vivente, 21 (16,4 %) trapianti simultanei di rene e pancreas, 4 (3,1 %) trapianti di pancreas isolato, 5 (3,9 %) trapianti di pancreas susseguenti a trapianto di rene per un totale di 128 pazienti eleggibili allo studio (fig.2). Di questi, 14 (10,9 %) sono stati sottoposti ad almeno un trapianto precedente a quello considerato nello studio, 96 (75 %) eseguivano dialisi cronica e 29 (22,3 %) hanno eseguito trapianto *pre-emptive*.

Il *follow-up* medio è stato di $14,9 \pm 4,1$ mesi.

Determinazione AECA, ANA e HLA

AECA e ANA (*anti-nucleus antibodies*) sono stati rilevati tramite un test di immunofluorescenza indiretta usando la tecnica Titerplane sviluppata da Euroimmun (Medizinische Labordiagnostika AG, Lubecca, Germania). In breve, un singolo lotto di cellule HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*) tipizzate per HLA A/B/C/DB1/DQ1 sono state incubate per 30' all'interno di una specifica piastra di reazione con il siero di ogni singolo paziente diluito 1:100 (5 mcl di siero e 495 di soluzione tamponata di fosfato-tween), successivamente per ulteriori 30' con IgG anti-immunoglobuline umane marcate con fluoresceina (25 mcl di coniugato) quindi osservate al microscopio a fluorescenza.

La positività per AECA era indicata da granulazioni fluorescenti sulla superficie cellulare o nel citoplasma immediatamente adiacente, mentre per gli ANA essa era localizzata nel nucleo in forma diffusa o granulare (fig. 2 e 3).

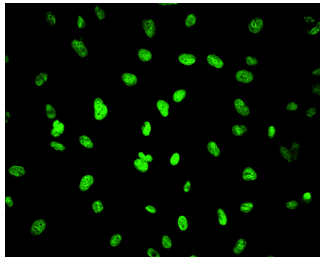


Fig. 2. ANA positività con tecnica Titerplane

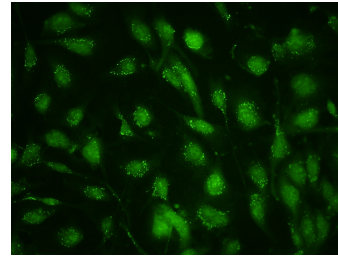


Fig. 3. AECA positività con tecnica Titerplane

I prelievi per gli AECA sono stati eseguiti immediatamente prima del trapianto e successivamente a 1, 3, 6, 12 e 24 mesi da esso.

I sieri dei pazienti sono stati valutati per la presenza di anticorpi anti-HLA con tecnica Luminex in contemporanea con le valutazioni per AECA (fig. 4)

Substrate	Solid-phase assays		Cell-based assays			
	Immobilized proteins/peptides		Lymphocytes		Endothelial cells	
	Beads FlowPAA, Luminex	ELISA	CDC PRAs, cross-match	Flow cytometry	IF	Flow cytometry
Defined antigen specificity Detection of non-HLA Abs Screening for non-HLA Abs HLA Abs Donor specificity Validated assays Cost per assay						
	Excellent Limited Not yet	Yes Yes [†] Yes	Moderate Limited No	Yes Yes Yes	Yes Yes Yes	Yes Yes Yes
	High	High	Low	Low	Low	Low

H H H H HLA antigens	Complement-dependent Ab detection
A B C Non-HLA antigens	IF-based Ab detection

Fig. 4. Tecniche di dosaggio anticorpale. Ab, anticorpo; CDC, citotossicità complemento mediato (complement-dependent cytotoxicity); IF, immunofluorescenza. *In combinazione con saggi che utilizzino anticorpi anti-HLA † Può essere ricavato da test con un singolo antigene ‡ Richiede cellule endoteliali da donatore (Regele, 2011).

Immunosoppressione di induzione e di mantenimento e terapia del rigetto

Il trattamento immunosoppressivo di induzione è stato rappresentato dalla globulina antitimocitaria (*AntiThymocyte Globulin, ATG*) alle dosi di 0,8-1 mg/kg di peso corporeo per la durata massima di 10 dosi dalla data del trapianto o il Basiliximab 20 mg somministrato il giorno del trapianto e nella quarta giornata da esso.

La terapia di mantenimento della grande maggioranza dei pazienti è stata l'associazione tra tacrolimus (Tac), micofenolato mofetile o sodico (MMF/MYF) e prednisone (Ster), molto meno utilizzata è stata la ciclosporina (CsA) o l'everolimus in luogo del tacrolimus. I dosaggi del Tac sono stati variati in base alla tacrolinemia per mantenere valori compresi tra 7 e 10 ng/ml. Il dosaggio massimo di MMF o di MYF è stato rispettivamente di 2g/die e 1440 mg/die. In base alle esigenze cliniche il prednisone è stato ridotto lentamente fino a valori di mantenimento di 5 mg/die.

I rigetti acuti sono stati trattati in base al referto istologico con 3 boli di metilprednisolone 500 mg e.v. al giorno eventualmente associati ad ATG 0,5-1 mg/kg per un massimo di 14 giorni. I pazienti che hanno necessitato di plasmateresi nel trattamento del rigetto sono stati esclusi dallo studio per limitare il *bias* legato alla rimozione degli eventuali AECA.

Analisi statistica

Il confronto tra medie è stato eseguito con test "t" di Student, quello tra proporzioni con il test di Fisher esatto. Sono state considerati significativi valori di $p < 0,05$.

RISULTATI

Dei 128 pazienti in osservazione clinica 17 sono risultati AECA positivi già prima del trapianto (AECA pre+) e 111 AECA negativi (AECA pre-). Dopo il trapianto nel primo gruppo si è osservata una negativizzazione degli AECA in 8 pazienti (AECA pre+/post-), nel secondo una positivizzazione in 4 pazienti (AECA pre-/post+). Il significato clinico di queste variazioni è stato valutato per ognuno dei quattro gruppi finali (fig. 5).

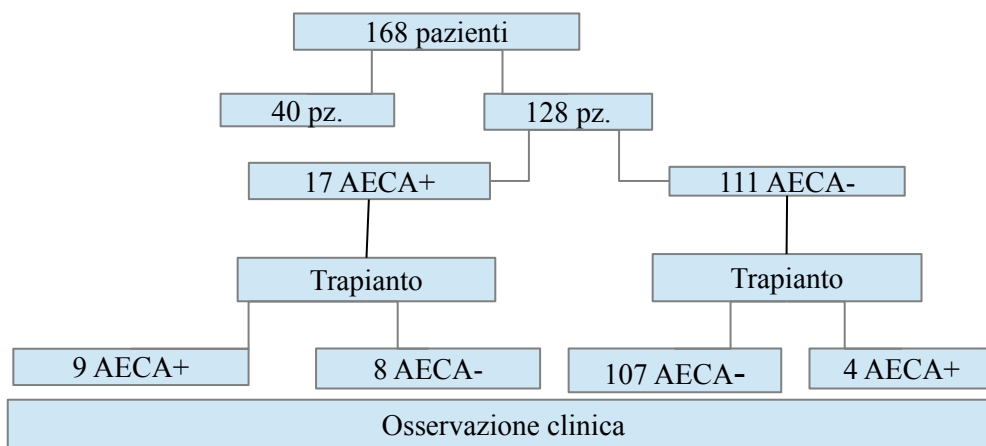


Fig.5. Assegnazione pazienti

Il gruppo di pazienti AECA pre- non differisce dal gruppo pre+ per dati anagrafici, età del donatore, età dialitica, tipo di dialisi, precedenti trapianti, prevalenza di ANA, anti-TPO/anti TG e sieropositività per le IgG del CMV. Spicca la netta prevalenza di patologie immunomediate, che qui comprendono anche quelle renali primitive, nel gruppo AECA pre+ rispetto ad AECA pre- (70,5 % vs 44,1 %, p 0,07) e soprattutto la differenza significativa nella pre-sensibilizzazione HLA a favore del primo gruppo (47,1% vs 19,5%, p 0,027). A causa di quest'ultima, pur non differendo per la terapia di mantenimento, al gruppo AECA pre+ è stato somministrato significativamente più ATG che Basiliximab durante la terapia di induzione (52,9 % vs 19,6 %) (Tabella 1)

Fermo restando tempi d'ischemia fredda simili l'*outcome* clinico dei pazienti con AECA preformati di fatto non differisce significativamente da quello dei pazienti AECA pre- rispetto alla sensibilizzazione HLA post-trapianto e l'evoluzione del *graft* renale. Interessante è invece la significativa differenza (50% vs 4%, p 0,02) nel numero dei rigetti pancreatici, tutti cellulo-mediati (Tabella 2).

Dal confronto tra pazienti AECA pre-/post+ e persistentemente negativi per AECA non è risultata alcuna differenza significativa in termini di rigetti (sia renali che pancreatici) provati da biopsia, sensibilizzazione HLA post-trapianto (ivi compresi i DSA), perdita del *graft*, andamento della creatininemia e mortalità (tabella 3). Tali risultati sono sovrapponibili nel confronto tra AECA pre-/post- e AECA pre+/post- (tabella 4), mentre nel gruppo persistentemente positivo per AECA risulta ancora una volta significativamente più alto il numero di rigetti cellulo-mediati di pancreas (tabella 5).

TABELLA 1: DATI PAZIENTI PRE-TX

	AECA + (n= 17)	AECA - (n= 111)	P
Età (anni)	43,5 ± 11,4	46,4 ± 12,4	0,366
Sesso (M/F)	9 / 8	78 / 33	0,171
Malattie immunomediate	12 (70,5 %)	49 (44,1 %)	0,07
anti- HLA Ab against class I and/or II (any PRA)	8 (47,1 %)	22 (19,5 %)	0,027
Età donatore (anni)	46,4 ± 13,5	50,3 ± 17,7	0,386
Tx- precedenti	3 (17,6 %)	11 (9,7 %)	0,398
Tempo ischemia fredda (ore)	6,8 ± 5,6	9,3 ± 7,6	0,196
Preemptive	4 (23,5 %)	25 (22,3 %)	1
Dialisi	13 (76,5 %)	83 (80,2 %)	1
DP	0	14 (16,9 %)	0,204
HD	13 (100 %)	71 (85,5 %)	0,36
Tempo in dialisi (mesi)	36,4 ± 33,7	27,9 ± 23,2	0,253
Ac anti- tiroide	4 (23,5 %)	11 (9,7 %)	0,115
ANA	1 (5,9 %)	22 (20,5 %)	0,306
Donatore vivente	8 (47 %)	44 (38,9 %)	0,603
CMV IgG+	15 (88,2 %)	86 (76,8 %)	0,523
Trapianto isogruppo	16 (94,1 %)	81 (72,9 %)	0,07
Mantenimento			
tac + MMF/MYF + ster	16 (94,1 %)	106 (95,5 %)	0,583
Csa + MMF/MYF + ster	0	2 (1,8 %)	1
altri...	1 (5,9 %) (tac+ster)	3 (2,7 %) (2 eve+MYF+ster, 1 tac+ster)	0,456
Induzione			
Basiliximab	8 (47,1 %)	89 (80,4 %)	0,006
ATG	9 (52,9 %)	22 (19,6 %)	

TABELLA 2: Outcome AECA pre- \ AECA pre+

	AECA pre - (n= 111)	AECA pre + (n=17)	P
de novo anti-HLA class I and/or II post-tx (DSA e non)	34 (30,6 %)	8 (47,1 %)	0,27
Biopsy-proven rigetti acuti renali (Banff07)	11 (10,2 %) su 108 KT	1 (6,3 %) su 16 KT	1
C4d focale	3 (27,3 %)	0	1
C4d diffuso	1 (9,1 %)	0	1
Sospetto	4 (36,4 %)	0	1
CMR I	3 (27,3 %)	1 (100 %)	0,416
CMR II	3 (27,3 %)	0	1
CMR III	1 (9,1 %)	0	1
AMR I	2 (18,2 %)	0	1
AMR II	1 (9,1 %)	0	1
AMR III	0	0	
Biopsy-proven rigetti acuti pancreas (Drachenberg'07)	1 (4 %) su 25 PT	3 (50 %) su 6 PT	0,02
Indeterminato	0	0	
CMR I	0	1 (33,3 %)	1
CMR II	1 (100 %)	2 (66,7 %)	1
CMR III	0	0	
AMR I	0	0	
AMR II	0	0	
AMR III	0	0	
Rigetti acuti precoci (<2 sett.) KT	1 (9,1 %)	0	1
Rigetti acuti precoci (<2 sett.) PT	0	0	n.d.
Rigetti acuti multipli KT	4 (36,4 %)	0	1
Rigetti acuti multipli PT	0	1 (33,3 %)	1
Perdita del graft KT	1 (0,9 %)	0	1
Perdita del graft PT	1 (4 %)	0	1
Morte	0	0	n.d.
CMV riattivazioni	26 (23,4 %)	3 (17,6 %)	0,761
EBV riattivazioni	3 (2,7 %)	1 (5,9 %)	0,439
Andamento creatinemia	-0,03 ± 0,24	-0,13 ± 0,37	0,14

Tabella 3: Outcome AECA pre- post- \ AECA pre- post+

	AECA pre - post - (n= 107)	AECA pre - post + (n=4)	P
de novo anti-HLA class I and/or II post-tx (DSA e non)	33 (30,8 %)	1 (25 %)	1
Biopsy-proven rigetti acuti renali (Banff07)	11 (10,6 %) su 104 KT	0 su 4	1
C4d focale	3 (27,3 %)		
C4d diffuso	1 (9,1 %)		
Sospetto	4 (36,4 %)		
CMR I	3 (27,3 %)		
CMR II	3 (27,3 %)		
CMR III	1 (9,1 %)		
AMR I	2 (18,2 %)		
AMR II	1 (9,1 %)		
AMR III	0		
Biopsy-proven rigetti acuti pancreas (Drachenberg'07)	1 (4,2 %) su 24 PT	0 su 1	1
Indeterminato	0		
CMR I	0		
CMR II	1 (100 %)		
CMR III	0		
AMR I	0		
AMR II	0		
AMR III	0		
Rigetti acuti precoci (<2 sett.) KT	1 (9,1 %)	0	1
Rigetti acuti precoci (<2 sett.) PT	0	0	n.d.
Rigetti acuti multipli KT	4 (36,4 %)	0	0,275
Rigetti acuti multipli PT	0	0	n.d.
Perdita del graft KT	1 (0,9 %)	0	1
Perdita del graft PT	1 (4,2 %)	0	1
Morte	0	0	n.d.
CMV riattivazioni	26 (24,3 %)	0	0,571
EBV riattivazioni	3 (2,8 %)	0	1
Andamento creatinemia	-0,03 ± 0,24	0,01 ± 0,06	0,74

TABELLA 4: Outcome AECA pre-post-\AECA pre+post-	AECA pre - post - (n= 107)	AECA pre + post - (n=8)	P
de novo anti-HLA class I and/or II post-tx (DSA e non)	33 (30,8 %)	3 (37,5 %)	0,704
Biopsy-proven rigetti acuti renali (Banff07)	11 (10,6 %) su 104 KT	1 (12,5 %) su 8	1
C4d focale	3 (27,3 %)	0	1
C4d diffuso	1 (9,1 %)	0	1
Sospetto	4 (36,4 %)	0	1
CMR I	3 (27,3 %)	1 (100 %)	0,333
CMR II	3 (27,3 %)	0	1
CMR III	1 (9,1 %)	0	1
AMR I	2 (18,2 %)	0	1
AMR II	1 (9,1 %)	0	1
AMR III	0	0	
Biopsy-proven rigetti acuti pancreas (Drachenberg'07)	1 (4,2 %) su 24 PT	1 (25%) su 4	0,269
Indeterminato 0			
CMR I0			
CMR II 1 (100 %)		1 (100 %)	n.d.
CMR III 0			
AMR I 0			
AMR II 0			
AMR III 0			
Rigetti acuti precoci (<2 sett.) KT	1 (9,1 %)	0	1
Rigetti acuti precoci (<2 sett.) PT	0	0	n.d.
Rigetti acuti multipli KT	4 (36,4 %)	0	1
Rigetti acuti multipli PT	0	0	n.d.
Perdita del graft KT	1 (0,9 %)	0	1

TABELLA 5: Outcome AECA pre-post-\AECA pre+post+	AECA pre - post - (n= 107)	AECA pre + post + (n=9)	P
de novo anti-HLA class I and/or II post-tx (DSA e non)	33 (30,8 %)	5 (55,6 %)	0,113
Biopsy-proven rigetti acuti renali (Banff07)	11 (10,6 %) su 104 KT	0 su 8	1
C4d focale	3 (27,3 %)		
C4d diffuso	1 (9,1 %)		
Sospetto	4 (36,4 %)		
CMR I	3 (27,3 %)		
CMR II	3 (27,3 %)		
CMR III	1 (9,1 %)		
AMR I	2 (18,2 %)		
AMR II	1 (9,1 %)		
AMR III	0		
Biopsy-proven rigetti acuti pancreas (Drachenberg'07)	1 (4,2 %) su 24 PT	2 (100%) su 2	0,009
Indeterminato 0			
CMR I0		1 (50%)	1
CMR II 1 (100 %)		1 (50 %)	1
CMR III 0			
AMR I 0			
AMR II 0			
AMR III 0			
Rigetti acuti precoci (<2 sett.) KT	1 (9,1 %)	0	1
Rigetti acuti precoci (<2 sett.) PT	0	0	n.d.
Rigetti acuti multipli KT	4 (36,4 %)	0	
Rigetti acuti multipli PT	0	1 (100%)	1
Perdita del graft KT	1 (0,9 %)	0	1
Perdita del graft PT	1 (4,2 %)	0	1
Morte	0	0	n.d.
CMV riattivazioni	26 (24,3 %)	0	0,205
EBV riattivazioni	3 (2,8 %)	0	1
Andamento creatininemia	-0,03 ± 0,24	-0,02 ± 0,15	0,9

DISCUSSIONE

- Associazione significativa tra AECA e patologie immunomediate sia sistemiche che renali primitive.
 - Associazione significativa tra AECA e pre-sensibilizzazione HLA (considerando qualunque PRA). Già osservata da Sun basandosi solo su PRA, ma da lui definita come non significativa. Non associazione significativa degli AECA con anticorpi aspecifici quali gli ANA nè tessuto-specifici come gli anti-TPO/anti-TG. Verosimile legame tra autoimmunità ed alloimmunizzazione?
 - Non differenza significativa tra AECA pre+ e pre- per precedenti trapianti, tipo e durata della dialisi e trapianti pre-emptive.
 - ATG più frequentemente utilizzato negli AECA pre+ piuttosto che negli AECA pre- in considerazione della maggiore sensibilizzazione HLA. Cmq non vi è differenza significativa tra la terapia d'induzione e di mantenimento dei pazienti persistentemente positivi agli AECA e quelli AECA pre+\post- indicando che la terapia influisce relativamente, pur in considerazione dei numeri limitati dello studio.
 - Associazione significativa degli AECA con i rigetti di pancreas, peraltro mai descritta in letteratura, che richiederà ulteriori approfondimenti. Dai dati sembra legata essenzialmente agli AECA preformati, ma il gruppo AECA pre-/post+, già piccolo, contempla un solo trapianto di pancreas, troppo poco per esprimersi in questo senso.
 - Non vi è differenza significativa AECA pre+ /pre - nelle IgG+ per CMV. Il contatto col virus non sembra condizionare, nel nostro studio, lo sviluppo di AECA. Nel post-trapianto non sembra esservi alcuna influenza delle infezioni da CMV nè da EBV sullo sviluppo o negativizzazione degli AECA
 - Nel nostro studio non vi è stata associazione tra la presenza degli AECA, sia preformati che de novo, sulla perdita dei *graft* nè sull'andamento della funzione renale.
 - Lo studio più simile al nostro, quello di Sun del 2010, comprendeva una percentuale significativamente più alta sia di pazienti AECA pre+ che di positivizzazioni de novo. E' possibile che ciò sia stato legato da una parte a tempi d'ischemia significativamente più lunghi dei nostri (17 ore vs 9 ore), dall'altra ad un bias di laboratorio assolutamente non secondario. Egli non ha tipizzato le cellule HUVEC, ergo è possibile che ciò che è stato considerato AECA+ all'IF indiretta fosse un falso positivo legato alla presenza di anticorpi del ricevente contro gli HLA della cellula endoteliale.
- D'altro canto lo studio di Sun presenta un numero significativamente più basso di negativizzazioni, ma non contemplava l'uso dell'induzione con ATG, ma solo con

Basiliximab, in questo senso è possibile che il primo abbia avuto un qualche influenza

- Limiti legati al tempo molto limitato del follow-up e al piccolo numero dei pazienti osservati, non AMR rilevanti perchè trattati con plasmaferesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Goers TA, Ramachandran S., Aloush A., Trulock E., Patterson GA., Mohnakumar T.. *De novo production of K-alpha tubulin-specific antibodies: role in chronic lung allograft rejection.* J Immunol, 2008 **180**(7): p. 4487-94.
2. Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E, Haynes LD, Xu Q, Bobadilla JL, Meyer KC, Hayney MS, Braun RK, Greenspan DS, Gopalakrishnan B, Cai J, Brand DD, Yoshida S, Cummings OW, Wilkes DS. *IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants.* J Clin Invest, 2007 **117**(11): p. 3498-506.
3. Sumpter T. and Wilkes D. *Role of autoimmunity in organ allograft rejection: a focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection* American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 2004. **286**: p. L1129.
4. Smith JD, Hamour IM, Burke MM, Mahesh B, Stanford RE, Haj-Yahia S, Robinson DR, Kaul P, Yacoub MH, Banner NR, Rose ML. *A reevaluation of the role of IgM Non-HLA antibodies in cardiac transplantation.* Transplantation. 2009 ;**87**(6):864-71.
5. Nath, D, Ilias Basha H, Tiriveedhi V, Alur C, Phelan D, Ewald GA, Moazami N, Mohanakumar T. *Characterization of immune responses to cardiac self-antigens myosin and vimentin in human cardiac allograft recipients with antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy.* J Heart Lung Transplant. 2010 ;**29**(11):1277-85
6. Reinsmoen NL, Lai CH, Heidecke H, Haas M, Cao K, Ong G, Naim M, Wang Q, Mirocha J, Kahwaji J, Vo AA, Jordan SC, Dragun D. *Anti-angiotensin type I receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients.* Transplantation, 2010. **90** (12): 1473-1477.
7. Paul LC, Muralidharan J, Muzaffar SA, Manting EH, Valentin JF, de Heer E, Kashgarian M. *Antibodies against mesangial cells and their secretory products in chronic renal allograft rejection in the rat.* Am J Pathol. 1998 ;**152**(5):1209-23.
8. Joosten SA, Sijpkens YW, van Ham V, Trouw LA, van der Vlag J, van den Heuvel B, van Kooten C, Paul LC. *Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy.* Am J Transplant, 2005 **5**(2): p. 383-93.
9. Pober J, Orosz CG, Roese ML, Savage CO. *Can graft endothelial cells initiate a host-graft immune response?* Transplantation 1996; **61**: 343-349.
10. Lefaucher C, Loupy A, Hill GS. *Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation.* J Am Soc Nephrol 2010; **21** (8): 1398-1406.
11. Cerilli J, Brasile L, Galouzis T, Lempert N, Clarke J. *The vascular endothelial cell antigen system.* Transplantation 1985 ; **39** : 286-289.
12. Paul LC, Baldwin WM, Van Es LA. *Vascular endothelial alloantigens in renal transplantation.* Transplantation 1985 ; **40** : 117-123.
13. Dragun D. *Humoral responses direct against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplation.* Transplantation. 2008 ; **86** (8) : 1019-1025.

14. Linquist KJ, Osterland CK. *Human antibodies to vascular endothelium*. Clin Exp Immunol. 1971 ; 9:753-760
15. Del Papa N, Guidali L, Sironi M. *Anti-endothelial cell antibodies from patients with Wegener's granulomatosis bind to human endothelial cells in vitro and induce adhesion molecule expression and cytokine secretion*. Arthritis Rheum 1996 ; 39 : 758-766.
16. Heurkens AH, Daha MR, Breeveld FC. *Anti-endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid vasculitis*. Arthritis Rheum 1989;32:1191-1192.
17. Lunardi C, Bason C, Navone R. *Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells*. Nat Med 2000 ; 6:1183-1186
18. Bordron A, Dueymes M, Levy Y. *The binding of some human anti-endothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis*. J Clin Invest 1998 ; 101 : 2029-2035.
19. Yap HK, Sakai RS, Banh L, Rappaport V, Woo KT, Ananthurman V, Lim CH, Chiang GSC, Jordan SC. *Anti-endothelial cell antibodies in patients with IgA-Nephropathy; frequency and clinical significance*. Clin Immunol Immunopathol 1988 ; 29:450-462
20. Del Papa ND, Raschi E, Moroni G, Panzeri P, Borghi MO, Ponticelli C. *Anti-endothelial IgG fractions from systemic lupus erythematosus patients bind to human endothelial cells and induce a pro-adhesive and a pro-inflammatory phenotype in vitro*. Lupus 1999 ; 8 : 423-9.
21. Belizna C, Duijvestijn A, Hamidou M, Cohen Tervaert JW. *Anti-endothelial cell antibodies in vasculitis and connective tissue disease*. Ann Rheum Dis 2006 ; 65 : 1545-1550.
22. Hernandez NM, Casselbrant A, Joshi M, Johansson BR, Sumitran-Holgersson S. *Antibodies to kidney endothelial cells contribute to a leaky glomerular barrier in patients with chronic kidney diseases*. Am J Physiol Renal Physiol 2012 ; 302 : 884-894.
23. Servettaz A, Guilpain P, Tamas N, Kaveri SV, Camoin L, Mouthon L. *Natural anti-endothelial cell antibodies*. Autoimmun Rev 2008 ; 7 (6) : 426-430
24. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S. *Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining*. Am J Transplant 2009 ; 9:2312- 2323.
25. Jordan SC, Yap HK, Sakai RS. *Hyperacute allograft rejection mediated by anti-vascular endothelial cell antibodies with a negative monocyte cross-match*. Transplantation 1988 ; 46:585-587.
26. Grandteranova B, Mackova N, Horovica B. *Hyperacute rejection of living related kidney grafts caused by endothelial cell-specific antibodies : case reports*. Transplant Proc 2008 ; 40 :2422-2424
27. Jackson AM, Kuperman MB, Montgomery RA. *Multiple hyperacute rejections in the absence of detectable complement activation in a patient with endothelial cell reactive antibody*. Am J

Transplant, 2012; 12 (6): 1643-1649.

28. Sun Q, Liu Z, Chen J. *Circulating anti-endothelial cell antibodies are associated with poor outcome in renal allograft recipients with acute rejection*. Clin J Am Soc Nephrol 2008 ; 3:1479-1486.
29. Racusen LC, Colvin RB, Solez K. *Antibody mediated rejection criteria- an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection*. Am J Transplant 2003 ; 3:708-714.
30. Rose ML, Smith JD, Lawson C. *Antibody formation and its impact on long-term graft outcome*. Transplant Proc 2001 ; 33:2411-2413.
31. Glotz D, Lucchiari N, Pegaz-Fiornet B, Suberbielle-Boissel C. *Endothelial cells as targets of allograft rejection*. Transplantation 2006 ; 82 : 19-21.
32. Costa C, Touscoz GA, Bergallo M, Terlizzi ME, Astegiano S, Sidoti F, Sinesi F, Segoloni GP, Cavallo R. *Non-organ-specific and anti-endothelial antibodies in relation to CMV infection and acute rejection in renal transplant recipients*. Clin Transplantation 2010 ; 24:488-492.
33. Toyoda M, Galfayan K, Galera OA, Petrosian A, Czer LS, Jordan SC. *Cytomegalovirus infection induces anti-endothelial cell antibodies in cardiac and renal allograft recipients*. Transpl Immunol 1997 ; 5 (2) : 104-111.
34. Toyoda M, Petrosian A, Jordan SC. *Immunological characterization of anti-endothelial cell antibodies induced by cytomegalovirus infection*. Transplantation 1999 ; 68 (9) 1311-1318.
35. Varani S, Muratori L, De Ruvo N, Vivarelli M, Lazzarotto T, Gabrielli L, Bianchi FB, Bellusci R, Landini MP. *Antibody appearance in cytomegalovirus-infected liver transplant recipients : correlation with antigenemia*. J Med Virol 2002;66 (1) : 56-62.
36. Shin YS, Yang CW, Ahn HJ, Park CW, Jin DC, Kim YS, Chang YS, Bang BK. *Clinical significance of anti-endothelial cell antibody in renal transplant recipients*. Korean J of Int Med 2001; 16 (1) : 21-29.
37. Nakagawa Y, Saito K, Morioka T, Tomita Y, Takahaschi K, Oite T. *The clinical significance of antibody to vascular endothelial cells after renal transplantation*. Clin Transplant 2002; 16 (8): 51-57.
38. Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Coupel S, Bignon JD, Souillou JP, Charreau B. *Non-HLA type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis*. Am J Transplant 2003 ; 3:167-177.
39. Sun Q, Liu Z, Yin G, Chen H, Chen J, Li L. *Detectable circulating antiendothelial cell antibodies in renal allograft recipients with C4d-positive acute rejection : a report of three cases*. Transplantation 2005 ; 79 (12) : 1759-1762.
40. Han F, Lv R, Jin J, Wu J, Chen Y, Wang H, Chen J. *Pre-transplant serum concentrations of anti endothelial cell antibody in panel reactive antibody negative renal recipients and its impact on acute rejection*. Clin Chem Lab Med 2009 ; 47 (10):1265-1269.
41. Ismail AM, Badawi RM, El-Agroudy AE, Mansour MA. *Pretransplant detection of anti endothelial cell antibodies could predict renal allograft outcome*. Exp Clin Transplant, 2009 ; 7

(2) : 104-109.

42. Sun Q, Cheng Z, Cheng D, Chen J, Ji S, Wen J, Zheng C, Liu Z. *De novo development of circulating anti-endothelial cell antibodies rather than pre-existing antibodies is associated with post-transplant allograft rejection.* Kidney International 2011 ; 79:655-662.
43. Regele. *Non-HLA antibodies in kidney allograft rejection: convincing concept in need of further evidence.* Kidney International, 2011: 79, 583 – 586