



**UNIVERSITÀ DI PISA**

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea in Biologia Applicata alla Biomedicina

TESI DI LAUREA

**IMPATTO CLINICO DEGLI ANTICORPI  
ANTI-ENDOTELIO (AECA) NEL TRAPIANTO  
DI RENE E DI PANCREAS**

Relatori:

Prof. Aldo PAOLICCHI

Dott. Fabrizio SCATENA

Candidato:

Chiara BIAGINI

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

## **INDICE**

<b>I. IL SISTEMA IMMUNITARIO</b>	<b>1</b>
1.1 Immunità innata	3
1.2 Immunità adattativa	5
1.3 Immunologia dei trapianti	9
1.3.1 Rigetto	14
1.4 Metodiche per ridurre l'immunogenicità dell'allotrapianto	21
1.5 Letteratura sul ruolo dell'autoimmunità nella patogenesi del rigetto	25
<b>II. SCOPO DELLA TESI</b>	<b>43</b>
<b>III. MATERIALI E METODI</b>	<b>46</b>
3.1 Pazienti	46
3.2 Tecnica Titerplane	49
3.3 Preparazioni dei campioni	53
<b>IV. RISULTATI</b>	<b>56</b>
<b>V. DISCUSSIONE</b>	<b>74</b>
<b>VI. CONCLUSIONI</b>	<b>79</b>

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>80</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>86</b>

## **I. II SISTEMA IMMUNITARIO**

Oggi con il termine immunità ci si riferisce sia alla resistenza ai microrganismi estranei, sia alla capacità di discriminare le sostanze prodotte dal proprio corpo da quelle esterne.

Le cellule e le molecole responsabili dell'immunità costituiscono il sistema immunitario e la loro risposta collettiva e coordinata all'introduzione di sostanze estranee è detta risposta immunitaria.

Una caratteristica fondamentale del sistema immunitario è quindi la capacità di distinguere tra le strutture endogene o esogene che non costituiscono un pericolo e che dunque possono o devono essere preservate (self) e le strutture endogene o esogene che invece si dimostrano nocive per l'organismo e che devono quindi essere eliminate (non-self).

La discriminazione tra self e non self avviene a livello molecolare ed è mediata da particolari strutture cellulari (Toll-like receptor, recettori dei linfociti T, complessi MHC, anticorpi), che consentono la presentazione e il riconoscimento di componenti dell'agente lesivo, definite antigeni.

A seconda delle modalità di riconoscimento degli antigeni si possono distinguere due aree del sistema immunitario:

- immunità aspecifica o innata: comprende mediatori chimici, responsabili dell'infiammazione, e cellulari responsabili di una prima linea di difesa contro le aggressioni. È evolutivamente più antica e consente il riconoscimento di un repertorio limitato di antigeni. Riconosce una generica condizione di pericolo e pone il sistema immunitario in una condizione di "allarme", che favorisce lo sviluppo dell'immunità specifica
- immunità specifica o adattativa: comprende mediatori chimici e cellulari responsabili di una risposta difensiva più potente e mirata (virtualmente in grado di riconoscere qualunque forma di antigene), ma più lenta. È

evolutive più recente e poggia sulla risposta aspecifica per numerose funzioni di presentazione e distruzione degli antigeni. Si divide a sua volta in:

- immunità specifica umorale (cioè mediata da anticorpi).
- immunità specifica cellulo-mediata.

### 1.1 IMMUNITÀ INNATA

L'immunità innata<sup>1</sup> è il meccanismo filogeneticamente più antico di difesa dai microbi con i quali si è evoluta per difendere tutti i microorganismi pluricellulari. L'immunità innata assolve a due importanti funzioni:

1. Rappresenta la prima risposta dell'ospite ai microbi in grado di prevenire, controllare o eliminare le infezioni. Questo ruolo è fondamentale in quanto, se viene eliminata l'immunità innata e mantenuta la sola adattativa, l'organismo risulta comunque molto più suscettibile alle infezioni.

2. Stimola la risposta adattativa e può influenzarne la natura per renderla maggiormente efficace contro tipi diversi di microrganismi.

Pertanto l'immunità innata non svolge unicamente funzioni difensive nelle prime fasi dell'infezione, ma fornisce anche un "segnale" della presenza dell'infezione contro cui deve essere organizzata una successiva risposta specifica.

L'immunità innata consiste in meccanismi di difesa cellulare e biochimici preesistenti all'infezione e pronti a reagire con rapidità. Questi meccanismi reagiscono in modo identico a infezioni ripetute.

I principali componenti sono le barriere fornite dalle superfici epiteliali della cute (tratto gastrointestinale e respiratorio), le cellule fagocitiche (neutrofili e macrofagi), le cellule natural killer (NK) le proteine del sangue (i fattori del sistema del complemento) e numerose citochine.

## 1.2 IMMUNITÀ ADATTATIVA

L'immunità adattativa<sup>1</sup> è una forma di immunità che si sviluppa in risposta ad un'infezione, e la sua risposta aumenta in capacità e ampiezza difensiva ad ogni successiva esposizione ad un particolare agente infettivo. L'immunità acquisita è in grado di riconoscere un grande numero di sostanze microbiche e non, e la capacità di riconoscimento è talmente alta da giustificare il titolo di immunità specifica. I suoi principali agenti sono sia i linfociti che i loro prodotti di secrezione, come gli anticorpi. Le sostanze estranee in grado di indurre risposte immunitarie specifiche sono dette antigeni.

Esistono due tipi di risposta immunitaria adattativa: l'immunità umorale e l'immunità cellulare.

- L'immunità umorale è mediata da molecole presenti nel sangue e nelle secrezioni, dette anticorpi, prodotte dai linfociti B, ed è la principale difesa contro microbi extracellulari e le loro tossine, in quanto gli anticorpi secreti possono legare sia i microbi che le tossine agevolandone l'eliminazione. Gli anticorpi sono



caratterizzati da diversi gradi di specializzazione e possono attivare diversi meccanismi.

- L'immunità cellulo-mediata è mediata dai linfociti T ed elimina i serbatoi di infezione attraverso l'eliminazione dei microbi residenti nei fagociti o nelle cellule infette. Infatti i microbi intracellulari che sopravvivono e proliferano all'interno dei fagociti o altre cellule sono inaccessibili per gli anticorpi.

L'immunità protettiva nei confronti di un microbo può essere indotta dalla risposta dell'ospite o dal trasferimento di anticorpi/linfociti specifici. Quella indotta dall'esposizione diretta all'antigene è detta immunità attiva, in quanto l'individuo immunizzato gioca un ruolo attivo. L'inoculazione di anticorpi/linfociti specifici crea invece un tipo di immunità che non prevede l'esposizione dell'immunizzato all'antigene: si parla allora di immunità passiva (un esempio di immunità passiva naturale è il trasferimento di anticorpi materni al feto).

In ambito clinico l'immunità ad un microbo viene sempre misurata in maniera indiretta, cercandone la presenza

dei prodotti o somministrando derivati purificati del microbo e misurando la reazione indotta.

La risposta immunitaria umorale e cellulare hanno delle caratteristiche in comune:

- Specificità e diversità. Le risposte sono specifiche per i diversi antigeni. Le parti degli antigeni che vengono specificatamente riconosciute dai singoli linfociti sono dette determinanti o epitopi. I singoli linfociti esprimono sulle loro membrane recettori che sono in grado di riconoscere anche le sottili differenze tra gli antigeni. Il numero totale di epitopi riconoscibili, detto repertorio linfocitario, è enorme: si stima tra  $10^7$  e  $10^9$ .
- Memoria. L'esposizione ad un antigene migliora la capacità di risposta del sistema; le risposte alle infezioni successive sono solitamente più rapide, ampie e spesso qualitativamente diverse dalla risposta primaria. La memoria immunologica è in parte dovuta all'espansione dei cloni linfocitari specifici per quell'antigene e in parte alla produzione delle cellule della memoria.

- Espansione clonale. I linfociti proliferano molto dopo l'esposizione ad un antigene. L'espressione espansione clonale indica che la crescita è limitata alle cellule che esprimono recettori per l'antigene.
- Specializzazione. Immunità umorale e cellulo-mediata sono stimulate da classi microbiche diverse.
- Contrazione ed omeostasi. Tutte le risposte immunitarie devono svanire nel tempo, facendo ritornare il sistema immunitario allo stato basale, cioè alla sua condizione di omeostasi. La riduzione/contrazione della reazione è dovuta soprattutto al fatto che le risposte innescate dagli antigeni distruggono gli antigeni stessi, eliminando dunque lo stimolo.
- Non reattività al self. I linfociti non reagiscono a molecole self grazie alla proprietà della tolleranza, che viene mantenuta eliminando i linfociti autoreattivi: riduzioni di questa capacità sono alla base delle malattie autoimmuni.

### 1.3 IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI

Il trapianto<sup>1</sup> è un trattamento molto diffuso utilizzato per sostituire organi e tessuti danneggiati che hanno funzionalità compromessa.

I trapianti vengono classificati in:

- Trapianto autologo: trapianto da un individuo allo stesso individuo.
- Trapianto singenico: trapianto tra due individui geneticamente identici.
- Trapianto allogenico: trapianto tra due individui geneticamente diversi appartenenti alla stessa specie.
- Trapianto xenogenico: trapianto tra individui appartenenti a specie diverse.

Le molecole riconosciute come estranee nell'allogtrapianto sono chiamate alloantigeni mentre quelle degli xenotrapianti sono chiamate xenoantigeni. I linfociti e gli

anticorpi che reagiscono contro gli alloantigeni o xenoantigeni vengono definiti rispettivamente alloreattivi o xenoreattivi.

Il riconoscimento delle cellule trapiantate come self o estranee è determinato dai geni di istocompatibilità, che differiscono tra gli individui di una stessa specie.

Il principale responsabile delle reazioni violente e rapide di rigetto, causa della risposta dell'immunità adattativa, è il complesso maggiore di istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC). Le molecole MHC allogeniche di un trapianto possono essere presentate ai linfociti T del ricevente in due modi molto diversi: presentazione diretta e indiretta.

Nella presentazione diretta, una molecola MHC intatta, espressa dalle cellule che presentano l'antigene (APC) del donatore che si trovano nell'organo trapiantato, viene riconosciuta dai linfociti T del ricevente. La struttura di tutti i recettori dei linfociti T (T Cell Receptors TCR) è predisposta per riconoscere, con bassa affinità, qualunque molecola MHC, anche prima della selezione nel timo.

Durante lo sviluppo timico, la selezione positiva determina la sopravvivenza delle cellule T dotate di debole reattività nei confronti delle molecole MHC self, tra le quali possono esserci cellule anche dotate di elevata affinità per molecole allojeniche. Inoltre, la selezione negativa elimina efficientemente le cellule T con un'alta affinità per le molecole MHC self ma non elimina necessariamente le cellule T, che hanno elevata affinità per le molecole MHC allojeniche, semplicemente perché queste molecole non sono nel timo. Ne consegue che il repertorio dei linfociti T maturi è caratterizzato da un'intrinseca bassa affinità per le molecole MHC self e include molte cellule T che legano anche gli MHC allojenici con alta affinità.

La struttura di un MHC allojenico è abbastanza simile a quella di MHC self da poter essere riconosciuta come molecola MHC estranea da molte cellule T ristrette per l'MHC self. Quindi una molecola MHC allojenica associata ad un peptide può simulare il determinante formato da una molecola MHC self associata ad un peptide estraneo.

Il riconoscimento diretto di un alloantigene costituisce una cross-reazione in cui un linfocita T, selezionato per essere ristretto per MHC self, riconosce invece molecole MHC allogeniche strutturalmente simili. Il riconoscimento allogenico diretto può coinvolgere sia linfociti T CD4<sup>+</sup> sia i T CD8<sup>+</sup> che, riconoscendo gli antigeni del trapianto, contribuiscono al rigetto.

Nella presentazione indiretta, le molecole MHC allogeniche sono catturate e processate dalle APC del ricevente e i peptidi che ne derivano sono presentati in associazione a molecole MHC self. Così i peptidi derivati dalle molecole MHC allogeniche sono presentati dalle APC del ricevente e sono riconosciute dai linfociti T come qualsiasi antigene proteico non self.

La presentazione indiretta induce l'alloriconoscimento da parte dei linfociti T CD4<sup>+</sup>, perché l'alloantigene è catturato dalle APC dell'ospite attraverso la via vescicolare endosomiale (cioè come conseguenza della fagocitosi) ed è quindi presentato da molecole MHC di classe II. E' tuttavia possibile

che alcuni antigeni delle cellule del trapianto, una volta fagocitati, entrino nella via di presentazione di classe I e vengano riconosciuti dai linfociti T CD8<sup>+</sup>. Questo fenomeno è noto come cross-presentazione.

Le risposte delle cellule T nei confronti di un organo trapiantato iniziano nei linfonodi drenanti.

La maggior parte degli organi contiene APC residenti, come le cellule dendritiche, che, una volta nell'organo trapiantato, esprimono molecole MHC allogeniche del donatore nonché le molecole costimolatorie. Le APC del donatore migrano ai linfonodi regionali e qui presentano le loro molecole MHC allogeniche non processate dai linfociti T del ricevente (via diretta). Inoltre, le cellule dendritiche del ricevente possono migrare nel tessuto trapiantato, captare gli alloantigeni allogenici e trasportarli ai linfonodi drenanti dove vengono presentati (via indiretta).

I linfociti naïve che normalmente circolano nel linfonodo incontrano così questi alloantigeni e sono indotti a proliferare e a differenziarsi in cellule effettrici (processo di



sensibilizzazione). Molti linfociti T alloreattivi che rispondono al primo incontro con una molecola MHC allogenica sono linfociti T della memoria. Infatti le cellule della memoria non sono soltanto una popolazione di cellule specifiche per un antigene che si è già espansa ma sono cellule di più pronta attivazione e più potenti dei linfociti naïve, quindi determinano la violenza della risposta alloreattiva. Si pensa che le cellule della memoria siano più resistenti dei linfociti naïve alle terapie di immunosoppressione e che un loro elevato numero possa essere la causa dell'insuccesso del trapianto.

Oltre al riconoscimento degli alloantigeni, l'attivazione dei linfociti T alloreattivi richiede che le cellule T siano appropriatamente costimate da parte di molecole della famiglia B7 espresse dalle APC.

### 1.3.1 RIGETTO

I linfociti T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  attivati dagli alloantigeni causano il rigetto del trapianto attraverso due meccanismi distinti<sup>1</sup>.

- Le cellule T CD4<sup>+</sup> differenziate in cellule effettrici producono citochine che danneggiano il trapianto provocando un'inflammatione mediata dalle citochine.
- Le cellule CD8<sup>+</sup> si differenziano in linfociti T citotossici (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL) in grado di uccidere le cellule del trapianto che esprimono le molecole MHC di classe I allogeniche. I CTL secernono anche citochine che contribuiscono al danno.

Quindi solo i CTL generati dal riconoscimento diretto dell'MHC allogenico possono uccidere le cellule del trapianto, mentre i CTL o le cellule T helper, generate dal riconoscimento diretto o indiretto degli alloantigeni, causano danni al trapianto con il rilascio di citochine.

I CTL CD8<sup>+</sup> attivati dall'alloriconoscimento diretto riconoscono gli alloantigeni del trapianto e sono perciò in grado di uccidere le cellule, nel tessuto trapiantato, che esprimono gli stessi alloantigeni. Invece, i CTL CD8<sup>+</sup> generati attraverso la via indiretta sono ristretti per MHC self e non sono in grado di uccidere le cellule allogeniche, poiché queste

cellule non esprimono alleli MHC self che presentano peptidi allogenici. Quindi, quando i linfociti T alloreattivi sono stimolati per via indiretta, il meccanismo principale del rigetto è l'infiammazione provocata dalle citochine prodotte dalle cellule T effettrici CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>. Probabilmente queste cellule effettrici infiltrano il tessuto trapiantato e riconoscono gli alloantigeni del trapianto presentati dalle APC dell'ospite che pure sono penetrate nel trapianto. Il contributo relativo delle vie diretta e indiretta nel rigetto del trapianto non è stato ancora completamente definito.

Il rigetto da trapianto è classificato in base alle caratteristiche istopatologiche e cinetiche in iperacuto, acuto e cronico (Fig.1.1).

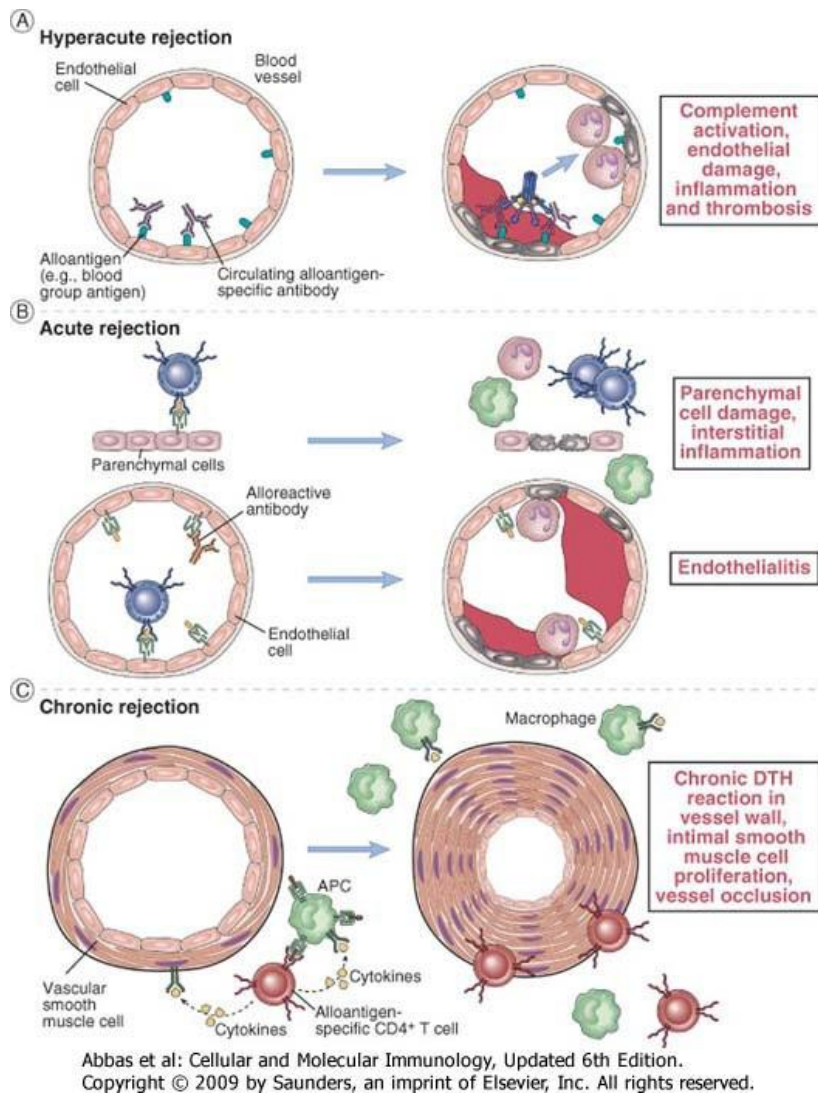


Figura 1.1: Tipi di rigetto

Il rigetto iperacuto è caratterizzato dall'occlusione trombotica dei vasi del trapianto, che inizia entro pochi minuti o poche ore dall'anastomosi dei vasi sanguigni del ricevente con i vasi del trapianto ed è mediata da anticorpi preesistenti nel circolo dell'ospite che riconoscono gli antigeni endoteliali

del donatore. Il legame degli anticorpi all'endotelio del trapianto attiva il complemento, che insieme agli anticorpi promuove la trombosi intravascolare. Infatti l'attivazione del complemento porta a danno endoteliale e all'esposizione di proteine della membrana subendoteliale che attivano le piastrine. Sia le cellule endoteliali sia le piastrine vanno incontro a vescicolazione della membrana con conseguente liberazione di particelle lipidiche che favoriscono la coagulazione.

Nel complesso questi processi contribuiscono alla trombosi e all'occlusione vascolare e l'organo trapiantato va incontro ad un danno ischemico irreversibile.

Nei primi giorni il rigetto è mediato da alloanticorpi IgM ("anticorpi naturali") diretti principalmente verso gli antigeni della famiglia ABO presenti sulla superficie dei globuli rossi e delle cellule endoteliali. Oggi il rigetto iperacuto da anticorpi anti-ABO non rappresenta più un problema clinico poiché tutti i donatori e i riceventi sono selezionati in modo che esprimano lo stesso gruppo sanguigno.

Attualmente il rigetto iperacuto è mediato da anticorpi IgG diretti contro alloantigeni proteici come le molecole MHC, oppure da contro alloantigeni non ben definiti espressi dalle cellule dell'endotelio vascolare. Questi anticorpi sono in genere il risultato di una precedente esposizione ad alloantigeni attraverso trasfusioni di sangue, un precedente trapianto o gravidanze multiple ovvero ogni contatto con cellule contenenti MHC diversi dai propri.

Il rigetto acuto è un processo di danno vascolare e parenchimale dovuto all'azione dei linfociti T alloreattivi e degli anticorpi. Esso si manifesta nei giorni e nelle settimane successive al trapianto: tempo necessario per l'attivazione dei linfociti T effettori e per la produzione di anticorpi.

Il principale meccanismo cellulare responsabile del rigetto acuto è l'uccisione delle cellule del trapianto da parte del CTL. Questo tipo di rigetto è caratterizzato dal punto di vista istologico da un infiltrato linfocitario, ricco di CTL CD8<sup>+</sup>, associato a danno tissutale.

Oltre alla distruzione diretta delle cellule, i CTL e i linfociti T helper CD4<sup>+</sup> attivati producono citochine che reclutano e attivano cellule infiammatorie che danneggiano ulteriormente il trapianto.

Gli alloanticorpi causano il rigetto acuto legandosi agli alloantigeni, soprattutto a molecole HLA, sulla superficie delle cellule dell'endotelio vascolare, provocando danno endoteliale e trombosi intravascolare che porta alla distruzione del trapianto.

Il caratteristico quadro istologico di questa forma di rigetto è la necrosi transmurale con infiammazione acuta della parete vascolare del trapianto; situazione ben diversa dall'occlusione trombotica, priva di necrosi della parete vascolare del rigetto iperacuto.

I trapianti che sopravvivono più di 6 mesi sviluppano una lenta occlusione arteriosa, risultato di una proliferazione delle cellule muscolari lisce, (vasculopatia del trapianto), dovuta a una serie di interazioni tra citochine e fattori di crescita, prodotti macrofagi e cellule endoteliali stimolati da

linfociti T alloreattivi. Con il progredire della ischemia il parenchima viene sostituito da tessuto fibroso. Questo processo fibrotico viene anche chiamato rigetto cronico.

#### 1.4 METODICHE PER RIDURRE L'IMMUNOGENICITÀ DELL'ALLOTRAPIANTO

Nell'uomo la strategia principale per ridurre l'immunogenicità del trapianto è ridurre al minimo le differenze antigeniche tra donatore e ricevente, selezionando il donatore.

I principali test clinici effettuati per ridurre il rischio di rigetto immunologico dell'allotrapianto sono: la tipizzazione del gruppo sanguigno AB0, la tipizzazione cellulare o tipizzazione HLA, la ricerca di anticorpi preformati che riconoscano l'HLA e altri antigeni rappresentativi della popolazione del donatore, e il test di agglutinazione crociata o crossmatching<sup>2</sup>. Vediamo in specifico questi test.

- Tipizzazione di gruppo sanguigno AB0. La tipizzazione ematica è eseguita mescolando i globuli rossi del



paziente con sieri standard contenenti anticorpi anti-A o anti-B. Se il paziente esprime uno degli antigeni, il siero specifico per quell'antigene farà agglutinare i globuli rossi.

- Tipizzazione HLA. Il tipo di HLA di un ricevente o del donatore può essere determinato con un dosaggio di micro linfotossicità. I linfociti T sono utilizzati per la tipizzazione di antigeni di classe I mentre i linfociti B per quelli di classe II. Il dosaggio prevede l'incubazione di sieri noti con linfociti isolati e in seguito l'aggiunta del complemento. La lisi dei linfociti mediata dal complemento avviene quando gli anticorpi nel siero si legano all'antigene HLA specifico. La sua estensione viene visualizzata al microscopio a fluorescenza, dopo aver esposto le cellule al bromuro di etidio. Il colorante colora il DNA nucleare delle cellule lisate ma non permea la membrana cellulare di quelle vitali. Oltre a questo metodo sierologico, oggi è ampiamente utilizzata la tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction): i

geni MHC possono essere amplificati tramite PCR usando primer che si legano a sequenze conservate comprese tra le estremità 5' e 3' degli esoni che codificano per le regioni polimorfiche delle molecole MHC di classe I e II. Il segmento di DNA amplificato può essere sequenziato fornendo una precisa caratterizzazione molecolare del tessuto.

- Screening di anticorpi anti-HLA. I pazienti in attesa di trapianto d'organo vengono studiati per la presenza di anticorpi preformati reattivi con molecole HLA allogeniche. Questi anticorpi, che possono essere prodotti come risultato di precedenti gravidanze, trasfusioni o trapianti, possono essere utili per identificare i soggetti a rischio di rigetto iperacuto o acuto vascolare. Lo screening può essere fatto con dosaggi in fase liquida o in fase solida. Nel dosaggio in fase liquida, il siero del paziente viene mescolato con diversi pannelli di cellule, in genere una banca di 40-60 diversi donatori. Se le cellule sono lisate (dosaggio di

citotossicità) o se l'anticorpo le lega (legame rilevato con una misura di citometria a flusso), è evidente che il siero del paziente contiene anticorpi HLA contro antigeni espressi dal pannello di cellule. Gli antigeni vengono purificati e legati ad un supporto solido come una piastra ELISA o biglie magnetiche rilevate utilizzando citometria a flusso o tecnologia Luminex. Il legame dell'anticorpo alle molecole nel pozzetto o alle biglie magnetiche viene rilevato utilizzando un enzima o un reagente anti-immunoglobulina fluorescente. Viene annotato il numero di cellule del pannello che presentino lisi o legame con l'anticorpo e i risultati vengono espressi come percentuale di anticorpi reattivi del pannello (PRA). Pazienti con elevato PRA sono definiti "sensibilizzati"; maggiore sarà il valore del PRA più sarà difficile trovare un donatore idoneo.

- Crossmatching. Il test viene eseguito in un modo simile ai test di screening anticorpale ma in questo caso il siero del ricevente viene mescolato con i linfociti del sangue

del donatore. Per determinare se gli anticorpi nel siero del ricevente si sono legati alle cellule del donatore, si possono usare test della citotossicità mediata da complemento o la citometria a flusso. Per esempio, se il complemento è aggiunto ad una miscela di cellule e siero e gli anticorpi contro le molecole MHC del donatore sono presenti nel siero del ricevente, le cellule del donatore verranno lisate. Questo risultato è un crossmatch positivo e indica che quel donatore non è adatto a quel ricevente.

## 1.5 LETTERATURA SUL RUOLO DELL' AUTOIMMUNITÀ NELLA PATOGENESI DEL RIGETTO D'ORGANO

Sebbene esistano efficaci terapie sostitutive per le insufficienze sia renali che pancreatiche endocrine, il trapianto di rene o pancreas, rispettivamente, rappresenta ad oggi il miglior trattamento in termini di mortalità e morbilità a lungo termine<sup>3,4</sup>. Nonostante ciò, la durata del trapianto a lungo

termine è ancora fortemente inficiata, anche con i più recenti approcci farmacologici, dalla complessa interazione del graft con il sistema immunitario del ricevente.

La risposta alloimmune dovuta alla presenza di anticorpi anti-HLA (human leucocyte antigen) ha un ruolo inconfutabile nella patogenesi del rigetto sia cellulo- che anticorpo-mediato.

Tuttavia negli ultimi anni numerosi studi hanno suggerito un ruolo sempre più rilevante sia delle risposte alloimmuni non-HLA che dell'immunità contro il self indotta dal trapianto.

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<sup>5</sup> e delle nefropatie immunomediate<sup>6</sup> (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- $\alpha$ 1 (KAT) e lo sviluppo della sindrome da bronchiolite obliterante (BOS, Bronchiolitis Obliterans Syndrome)<sup>7</sup>. Lavori di Wilkes e Burlingham<sup>8</sup> 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<sup>9</sup>. 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. 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<sup>10</sup> 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'allotrapianto (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<sup>10</sup>. 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. Infatti i pazienti con CAV possono sviluppare anticorpi verso antigeni self, inclusi miosina, vimentina, ColV e KAT<sup>11</sup>. 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<sup>12</sup>.

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)<sup>13</sup>. Questi dati supportano fortemente l'idea che le risposte alloimmuni e autoimmuni siano intimamente interconnesse e che determinino 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-riperfusion), esse possono diventare il bersaglio di anticorpi anti-HLA sia preformati che di nuova sintesi<sup>14</sup>. 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<sup>15</sup>, il ruolo di altri antigeni endoteliali, noti come non-HLA, rimane controverso. La presenza di anticorpi rivolti contro antigeni non-HLA, identificabili sulle cellule endoteliali e sui monociti, ma non su linfociti B e T, è stata riscontrata per la prima volta nell'ambito dei trapianti di rene HLA identici, indicando che anche gli antigeni non-HLA possono determinare l'insorgenza di rigetti acuti<sup>16</sup>. Studi su trapianti da donatore vivente consanguineo hanno dimostrato che la presenza di IgM reattive nei confronti dell'endotelio e dei monociti potrebbe giustificare fino all'80% dei rigetti acuti e delle perdite dei graft<sup>17</sup>, sebbene non sia ancora ben chiara l'esatta natura degli

antigeni non-HLA che la determinano. 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 si è maggiormente rivolta allo studio degli antigeni non-HLA. Tali antigeni, quali la vimentina, l'actina, la tubulina, il recettore tipo 1 dell'angiotensina II sono tutti in grado di stimolare risposte anticorpali, così come gli antigeni eterogenei, situati sulle cellule endoteliali, cui è rivolta la risposta umorale (AECA, Anti-Endothelial Cell Antibodies)<sup>18</sup>, oggetto di questa trattazione.

Gli anticorpi anti-cellule endoteliali, noti da più di 30 anni<sup>19</sup> 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<sup>20</sup>, la vasculite reumatoide<sup>21</sup>, la sclerosi sistemica<sup>22</sup> e il lupus eritematoso sistemico<sup>23</sup>, ma anche in malattie renali primitive come la nefropatia da IgA<sup>24</sup>. Gli AECA 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).<sup>20</sup>

È 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- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor)<sup>25</sup>.

Molti studi, citati in seguito, sono stati condotti nel tentativo di identificare con precisione i bersagli degli AECA che sono antigeni eterogenei non ancora completamente chiariti. Tra questi figurano proteine citoscheletriche con domini extracellulari (in genere molecole di interazione con la matrice extracellulare) che possono essere espresse sia in tutto l'endotelio che esclusivamente nel microcircolo piuttosto che nei vasi di maggior calibro<sup>26</sup>. 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) e indagando quindi le relazioni organo-specifiche degli anticorpi. Nello studio è messo in rilevanza che una quota 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 e un aumento del calcio citoplasmatico con riduzione di caderina e claudina. Questo profondo rimaneggiamento citoscheletrico conduceva ad un aumento della permeabilità di un singolo strato di HKEC 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 degli indici di flogosi e di interleuchina-6 plasmatica, una citochina notoriamente pro-infiammatoria<sup>27</sup>.

A rendere il quadro ancora più complesso vi è la certezza che gli AECA sono talvolta presenti in soggetti apparentemente sani e presentano 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<sup>28</sup>.

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<sup>29</sup>. È stato prospettato che anticorpi rivolti contro gli antigeni endoteliali abbiano un importante ruolo nella patogenesi sia dei rigetti iperacuti<sup>30-31-32</sup> che di quelli acuti e cronici<sup>33</sup>, tanto che dalla classificazione Banff del 2001 in poi 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)<sup>34</sup>.

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<sup>35</sup>.

L'eterogeneità degli antigeni coinvolti, inoltre, verosimilmente correlata allo sviluppo di AECA differenti, ha

implicato anche notevoli difficoltà nello sviluppo di test adeguati alla loro misurazione<sup>36</sup>. Permane anche la difficoltà di comprenderne la genesi, sebbene alcuni studi abbiano ipotizzato anche un possibile trigger infettivo. Lo sviluppo di AECA nel post-trapianto di rene è stato infatti correlato a fattori infettivi immunomodulanti come le infezioni da CMV.

C. Costa nel 2010<sup>37</sup> ha dimostrato 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 rigetto acuto vascolare, infezione da CMV e AECA. Precedentemente M. Toyoda (1997)<sup>38</sup> aveva evidenziato che, in pazienti trapiantati di cuore o rene da cadavere con riscontro di viremia da CMV, gli AECA misurati tramite ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay) e il livello di IL-2, aumentassero significativamente nell'arco di tre settimane e persistessero anche per alcuni mesi. Lo stesso M. Toyoda<sup>39</sup> nel 1999, tramite le tecniche di elettroforesi e quella di Western blot, caratterizzò meglio la struttura degli anticorpi AECA

sviluppati in seguito a infezioni da CMV. Lo studioso ritenne a conclusione 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, implicando un'attivazione immunitaria policlonale di dubbio significato clinico. Anche nel trapianto di altri organi, quali il fegato, il numero di infezioni da CMV si correlerebbe con lo sviluppo di un'ampia risposta autoanticorpale, con probabile attivazione endoteliale e successiva esposizione di determinanti antigenici "nascosti"<sup>40</sup>.

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<sup>41</sup> 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 significativamente più alto nella popolazione sana di riferimento senza differenze tra emodialisi e dialisi peritoneale. Nella popolazione trapiantata il titolo



AECA pre-trapianto sembrava associato positivamente ad un maggior rischio di rigetto: e inoltre si assisteva ad una riduzione significativa del titolo AECA dopo il trapianto stesso.

Nel 2002 Y. Nakagawa<sup>42</sup> 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.

Nel 2003 il gruppo di S. Le Bas-Bernardet<sup>43</sup> 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- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ . Gli AECA risultarono associati a pazienti sensibilizzati con PRA (Panel Reactive Antibodies) maggiore del 10%; tuttavia la valutazione retrospettiva non evidenziò alcuna associazione tra rigetti acuti, risultato del graft e AECA. 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.

Nel 2005 Q. Sun<sup>44</sup> descrisse 3 casi di grave rigetto vascolare associato ad incremento del titolo anticorpale degli AECA. Tale titolo tendeva a rimanere elevato nei pazienti con risultato 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 di tali anticorpi sul risultato del graft renale. Nel 2008, infatti, lo stesso Q. Sun<sup>45</sup> pubblicò uno studio retrospettivo effettuato su 635 riceventi 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<sup>+</sup> e quelli AECA<sup>-</sup> permise di affermare che nei pazienti AECA<sup>+</sup> i rigetti, prevalentemente vascolari, erano associati a un maggiore impegno sia dal punto visto

istopatologico che clinico. Tali pazienti avevano un maggior numero di rigetti, soprattutto steroido-resistenti e un peggior risultato della funzionalità del graft a un anno; pertanto veniva suggerito un controllo di routine di questa classe anticorpale prima e dopo il trapianto di rene .

Nel 2009 uno studio retrospettivo di Han<sup>46</sup> 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 % con un'associazione significativa tra numero di rigetti acuti e AECA. La presenza di questi ultimi, già nel pre-trapianto, veniva considerata un fattore di rischio per l'insorgenza di rigetti acuti gravi (cellulo-mediati dal II grado in su nella classificazione di Banff<sup>47</sup>).

La stessa conclusione fu raggiunta dal gruppo di A.M. Ismail<sup>48</sup> 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.

Recentemente, alla fine del 2010, Sun<sup>49</sup> 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 ad 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, permettendo le seguenti distinzioni tra pazienti: un gruppo persistentemente negativo per AECA, un gruppo che si positivizzava successivamente (22 pazienti) e uno persistentemente positivo già nel pre-trapianto. Gli autori concludevano che 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), steroideo-resistenti, multipli e con un maggior impegno vascolare alla biopsia renale, mentre non vi era alcuna differenza significativa nel risultato del graft

tra i pazienti persistentemente negativi e quelli persistentemente positivi. Gli stessi autori proponevano quindi gli AECA de novo come fattori patogenetici di rigetto acuto multiplo oppure, data la loro associazione con danni acuti quale quello da ischemia-riperfusion, come epifenomeni di eventi in grado di innescare l'alloimmunità e in ogni caso marker utili nel definire pazienti ad alto rischio di rigetto.

## II. SCOPO DELLA TESI

L'oggetto di questo studio è il ruolo dell'autoimmunità, argomento di recente interesse scientifico, in aggiunta a quello ben noto dell'alloimmunità, nel condizionare la sopravvivenza del trapianto di organo solido.

Gli anticorpi anti-endotelio (AECA) sono stati associati alla probabilità di rigetto in seguito a trapianto. Tra le tecniche utilizzate per la loro rilevazione disponibili oggi si ricordano Xm-One<sup>50</sup> e AT1R ELISA<sup>51</sup>. La prima tecnica usa come substrato precursori endoteliali circolanti (EPC), e ha il limite, come il Titerplane, di non discriminare gli anticorpi anti-HLA donatore-specifici (DSHA, Donor-specific antihuman leukocyte antigen antibodies) e di essere molto costosa e laboriosa. La seconda tecnica, AT1R ELISA, è anch'essa costosa ed ha il grosso limite di rilevare anticorpi contro un solo antigene endoteliale ignorando tutti gli altri.

Purtroppo la mancanza di test economici standardizzati e a basso costo ha impedito l'effettuazione routinaria di questo screening.

La tecnica di immunofluorescenza indiretta Titerplane™ su linee di cellule endoteliali della vena ombelicale umane (HUVEC) mira a colmare questa mancanza e permette di poter effettuare contemporaneamente 50 prove.

È stato usato un singolo lotto di Titerplane™, le cui HUVEC sono state tipizzate in modo da poter discriminare gli AECA dagli anticorpi anti-HLA.

Alla luce dei risultati contraddittori ottenuti in letteratura in merito alla correlazione tra AECA e rigetto, 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.

Lo studio, in merito a questo argomento, è stato condotto presso il Centro Trapianti di Pancreas e Rene dell'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana.



## **III. MATERIALI E METODI**

### **3.1 PAZIENTI**

I campioni utilizzati in questo studio sono stati prelevati da 168 pazienti trapiantati consecutivamente presso l'Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana dal 1/10/2009 al 30/06/2012. Di questi 40 sono stati esclusi per follow-up inferiore a 6 mesi (mancanza sieri per AECA, decesso, espianto del graft o perché seguiti presso altro Centro) o per esecuzione di procedure aferetiche peritrapianto, 45 (35,2 %) sono 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. 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.

Tutti i pazienti analizzati sono stati sottoposti a terapia d'induzione e di mantenimento, garantendo così immunosoppressione e sopravvivenza del trapianto a più lungo termine.

La terapia d'induzione ha lo scopo di impedire una precoce attivazione del sistema immunitario. Nei pazienti analizzati per la terapia d'induzione è stato usato Basiliximab o la globulina anti-timociti (ATG).

Il Basiliximab è un anticorpo monoclonale di tipo chimerico (topo-Uomo) che si lega alla catena  $\alpha$  (CD25) del recettore dell'IL-2<sup>52</sup> delle cellule T, bloccandone l'attività e quindi riducendo la velocità e la capacità di duplicazione dei linfociti.

La globulina anti-timocita è una  $\gamma$ -globulina purificata dal siero di conigli immunizzati con timociti umani<sup>53</sup> e

contiene anticorpi citotossici che legano CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD18, CD25, CD44, CD45 e molecole HLA di classe I e II sulla superficie dei linfociti T umani.<sup>54</sup> Gli anticorpi riducono i linfociti circolanti per tossicità diretta (complemento- e cellulo-mediata) e bloccano la funzione dei linfociti, legandosi a molecole sulla superficie cellulare coinvolte nella regolazione della funzione cellulare.

La terapia immunosoppressiva di mantenimento prevede l'uso di farmaci nel periodo post-trapianto per tutta la durata della vita. Due esempi di terapia di mantenimento messe in atto per i pazienti sono Tacrolimus (tac) + micofenolato mofetile (MMF) o acido micofenolico (MYF) + steroidi (ster) oppure ciclosporina A (Csa) + MMF/MYF + ster.

In questo studio sono stati analizzati i sieri pre e post trapianto dei pazienti. I sieri post trapianto si riferiscono a 1 mese, 3 mesi, 6 mesi, 1 anno e 2 anni dopo l'intervento.

### 3.2 TECNICA TITERPLANE

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, Lubeca, Germania), che permette la determinazione in vitro di anticorpi nel plasma e nel siero umano.

Il kit Titerplane di Euroimmun comprendeva:

- Vetrini con 5 BIOCHIP rivestiti con cellule endoteliali estratte da vena di cordone ombelicale umano (Human Umbilical Vein Endothelial Cells HUVEC) (Fig. 3.1) .
- Un supporto vetroso diviso in 5 parti, in ciascuna delle quali sono presenti i pozzetti corrispondenti al BIOCHIP.
- Un supporto di polistirolo in cui sono stampati i numeri corrispondenti ai pozzetti dei BIOCHIP; in modo da poter associare a ciascun pozzetto un numero. Nell'esperimento il supporto vetroso viene posto sopra quello di polistirolo. (Fig. 3.2)

- Anticorpi anti-IgG umane (capra) coniugati con fluoresceina.
- Controllo positivo (autoanticorpi umani anti-cellule endoteliali).
- Controllo negativo.
- Tampone fosfato salino pH 7,2 (Phosphate Buffered Saline, PBS) contenente Tween 20 2%.
- Mezzo di montaggio (glicerolo).
- Vetrini copri oggetto.



Figura 3.1 Vetrino con BIOCHIP



Figura 3.2: Supporto vetroso e di polistirolo

Le HUVEC vengono incubate con il campione diluito di un paziente. Se la reazione è positiva, specifici anticorpi di classe IgA, IgG e IgM si legano agli antigeni e in un secondo passaggio questi stessi anticorpi reagiscono con anticorpi anti-immunoglobuline umane coniugati con fluoresceina (FITC) e vengono visualizzati al microscopio a fluorescenza.

La tecnica Titerplane quindi sfrutta l'immunofluorescenza indiretta, in cui si tratta un tessuto o una cellula con un anticorpo che non è marcato con un colorante.

Questo anticorpo, detto anticorpo primario, si lega a specifici siti antigenici all'interno del tessuto o cellula. Quindi si aggiunge un secondo tipo di anticorpo all'interno del tessuto o cellula, detto anticorpo secondario, che è marcato con un colorante fluorescente, la fluoresceina, che emette un'intensa fluorescenza verde quando è eccitata con luce blu, in quanto possiede uno spettro di assorbimento massimo che va da 490 a 495 nm, e uno spettro di emissione a 517 nm, producendo un colore verde brillante. L'anticorpo secondario si lega

all'anticorpo primario (Fig.3.3). Poiché più di una molecola di anticorpo primario si lega ad un antigene, e più di una molecola di anticorpo secondario si lega a ciascun anticorpo primario, più molecole fluorescenti sono concentrate su ciascuna molecola che si vuole rivelare. Di conseguenza, l'immunofluorescenza indiretta determina l'amplificazione del segnale, per cui è molto più sensibile rispetto all'uso dell'anticorpo primario da solo. Il metodo è detto "indiretto" in quanto non rivela dove gli anticorpi sono legati agli antigeni ma dove sono legati gli anticorpi secondari, fornendo un'indicazione, appunto, indiretta della localizzazione della molecola di interesse.

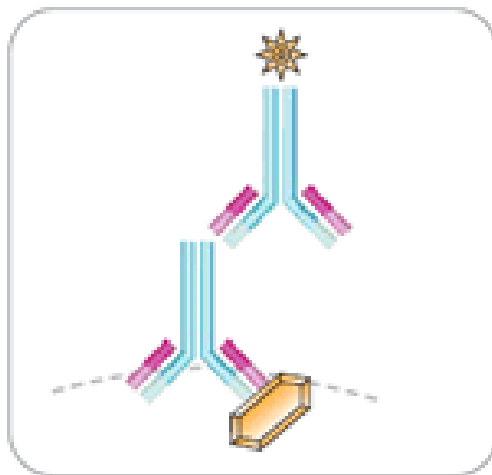


Figura 3.3: "Metodo indiretto"(Immagine gentilmente concessa dal sito [www.menarinidiagnostics.it](http://www.menarinidiagnostics.it) il giorno 7/11/2013)

### 3.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni da testare sono stati preparati diluendo 5 $\mu$ L di siero in 495  $\mu$ L di soluzione detergente (PBS-tween) in modo da ottenere una diluizione finale 1:100. Sono stati usati 2 mL di Tween 20.

Successivamente si sono depositati 30  $\mu$ L di siero diluito su ciascun pozzetto del supporto vetroso (Fig.3.2 pag.57) e applicato sopra il vetrino con le HUVEC (Fig.3.1 pag.57).

Il tutto è stato fatto incubare al buio per 30 minuti. Terminato il periodo di incubazione i vetrini sono stati lavati con la soluzione PBS-Tween e immersi per 5 minuti in una cuvetta porta oggetti contenente la soluzione detergente. In seguito i vetrini con i BIOCHIP sono stati asciugati lungo il contorno dei pozzetti e applicati su un nuovo supporto vetroso a cui erano stati aggiunti su ciascun pozzetto 25  $\mu$ L di anticorpi anti immunoglobuline umane (anti-IgG) coniugate con la fluoresceina (Fig. 3.4)





Figura 3.4: Sieri su supporto vetroso.

Il tutto è stato messo ad incubare con le stesse modalità descritte a pagina 60.

Al termine dell'incubazione è stato montato il vetrino nel seguente modo: i vetrini copri-oggetto sono stati posti sul supporto di polistirolo e vi è stato aggiunto glicerolo in corrispondenza dei numeri che indicavano i pozzetti; infine vi sono stati adagiati sopra i vetrini con BIOCHIP ed è stata effettuata la lettura al microscopio a fluorescenza.

Nella lettura dei campioni effettuata con il microscopio a fluorescenza si è utilizzato un filtro di eccitazione a 480 nm e un separatore colorimetrico a 510 nm con un filtro di

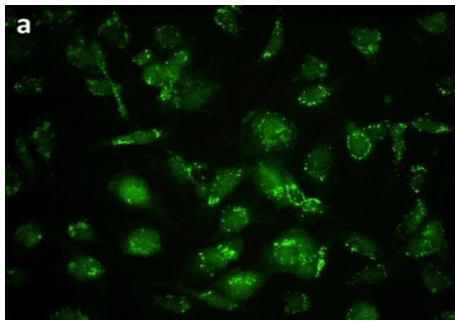
bloccaggio 520 nm; come sorgente luminosa si è usata la lampada a vapori di mercurio da 100 W.

## IV. RISULTATI

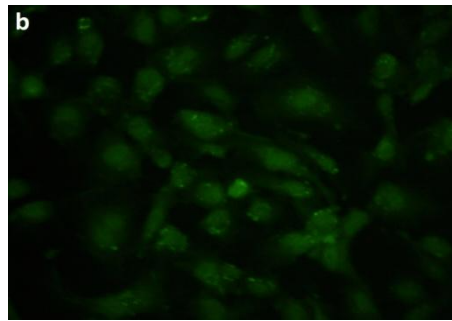
I campioni positivi per gli AECA erano caratterizzati dalla presenza di immunofluorescenza granulare all'interno del citoplasma e si distinguevano molto bene dai campioni negativi in quanto questi ultimi non presentavano fluorescenza granulare ma soltanto una debole fluorescenza omogenea (Fig.3.5 a, b).

Per evidenziare meglio il fenomeno è stato aggiunto al vetrino preparato con la tecnica Titerplane il colorante DAPI o 4',6-diamidin-2-fenilindol, colorante organico fluorescente che lega fortemente regioni del DNA ricche in sequenze A-T( Fig. 3.5 c, d ).

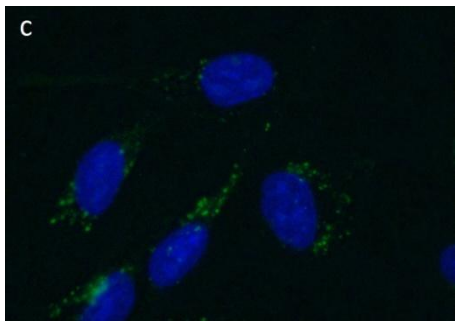
I campioni positivi per gli ANA erano caratterizzati dalla presenza di immunofluorescenza granulare od omogenea all'interno del nucleo; mentre quelli negativi da debole fluorescenza omogenea (Fig. 3.5 e, f, g).



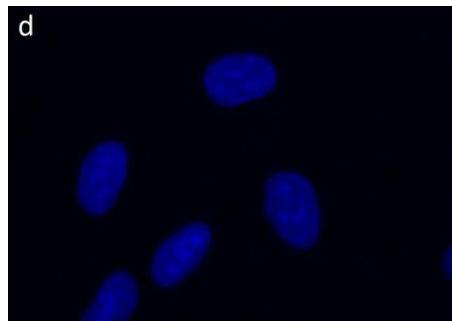
(a) Campione positivo per AECA



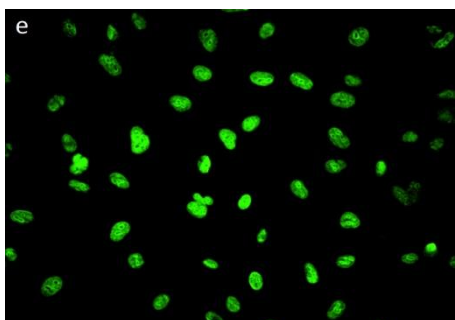
(b) Campione negativo per AECA



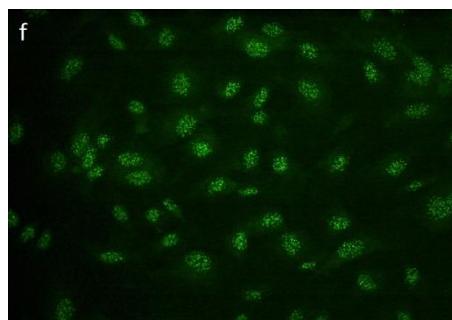
(c) Campione positivo per AECA



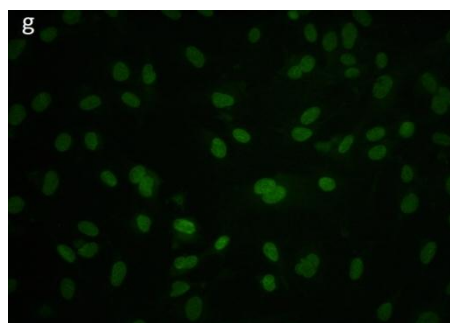
(d) Campione negativo per AECA



(e) Campione positivo per ANA



(f) Campione positivo per ANA



(g) Campione negativo per ANA

Figura 3.5 Immagini microscopio ingrandimento 40X.

Si è detto che i pazienti in osservazione clinica erano 128. Tra questi 17 sono risultati AECA positivi già prima del trapianto (AECA pre<sup>+</sup>) e 111 AECA negativi (AECA pre<sup>-</sup>).

Per confrontare i due gruppi è stato eseguito il test "t" di Student per le medie e per le proporzioni il test di Fisher esatto. Sono state considerati significativi valori di  $p < 0,05$ .

Il gruppo di pazienti AECA pre<sup>-</sup> non differisce in maniera significativa dal gruppo pre<sup>+</sup> per:

- Dati anagrafici: considerando le medie dell'età espressa in anni si ottiene per gli AECA pre<sup>+</sup>  $43,5 \pm 11,4$  e per gli AECA pre<sup>-</sup>  $46,4 \pm 12,4$ ;  $p=0,366$ .
- Sesso: il gruppo AECA pre<sup>+</sup> è composto da 9 maschi e 8 femmine e il gruppo AECA pre<sup>-</sup> da 78 maschi e 33 femmine;  $p = 0,171$ .
- Età del donatore: considerando anche in questo caso le medie dell'età espresse in anni, si ottiene per gli AECA pre<sup>+</sup>  $46,4 \pm 13,5$  e per gli AECA pre<sup>-</sup>  $50,3 \pm 17,7$ ;  $p=0,386$ .

- Precedenti trapianti: nel gruppo AECA pre<sup>+</sup> 3 pazienti su 17 (17,6%) avevano effettuato un trapianto in precedenza, mentre nel gruppo AECA pre<sup>-</sup> lo avevano effettuato 11 su 111 (9,7%); p=0,398.
- Tempo ischemia fredda: nel gruppo AECA pre<sup>+</sup> la media dei vari tempi, espressa in ore, è risultata 6,8 ± 5,6 mentre nel gruppo AECA pre<sup>-</sup> 9,3 ± 7,6; p=0,196.
- Trapianto pre-emptive: nel gruppo AECA pre<sup>+</sup> 4 pazienti su 17 (23,5%) hanno eseguito questo tipo di trapianto mentre nell'altro gruppo 25 su 111 (22,3%); p=1.
- Dialisi: nel gruppo AECA pre<sup>+</sup> 13 pazienti su 17 (76,5%) hanno effettuato dialisi e tutti di tipo emodialisi (HD). Nel gruppo AECA pre<sup>-</sup> 83 pazienti su 111 (80,2%) hanno effettuato dialisi e tra questi 14 dialisi peritoneale (DP) e 71 HD. Il confronto tra i pazienti che hanno o non hanno effettuato dialisi non è significativo (p=1); così come non lo è il confronto

rispetto al tipo di dialisi. Infatti per il trattamento DP  $p=0,204$  e per il trattamento HD  $p=0,36$ .

- Età dialitica: intesa come tempo di dialisi espresso in mesi, si ottiene per gli AECA pre<sup>+</sup>  $36,4 \pm 33,7$  e per gli AECA pre<sup>-</sup>  $27,9 \pm 23,2$ ;  $p=0,253$ .
- Anticorpi anti-tiroide: nel gruppo AECA pre<sup>+</sup> 4 pazienti su 17 (23,5%) hanno evidenziato la presenza di questi anticorpi mentre nel gruppo AECA pre<sup>-</sup> 11 su 111 (9,7%);  $p=0,115$ .
- Prevalenza di ANA: nel gruppo AECA pre<sup>+</sup> gli ANA sono stati riscontrati soltanto in un paziente su 17 (5,9%) mentre nel gruppo AECA pre<sup>-</sup> in 22 su 111 (20,5%);  $p=0,306$ .
- Donatore vivente: nel gruppo AECA pre<sup>+</sup> i donatori viventi erano 8 su 17 trapianti (47%) mentre nel gruppo AECA pre<sup>-</sup> erano 44 su 111 (38,9%);  $p=0,603$ .
- Sieropositività per le IgG del CMV: nel gruppo AECA pre<sup>+</sup> 15 persone su 17 (88,2%) presentavano sieropositività per IgG del CMV, mentre nel gruppo

AECA pre<sup>-</sup> la presentavano 86 su 111 (76,8%);  
p=0,523.

Le differenze tra i due gruppi AECA pre<sup>+</sup> e AECA pre<sup>-</sup>  
spiccano a riguardo di :

- Patologie immunomediate: sia sistemiche che renali. Nel gruppo AECA pre<sup>+</sup>, 12 pazienti su 17 le presentavano (70,5 %) mentre nel gruppo AECA pre<sup>-</sup> le presentavano 49 su 111 (44,1%); ottenendo p=0,07 che rasenta la significatività. Nelle patologie immunomediate sono comprese sia quelle sistemiche (ad es. Diabete tipo I o lupus) sia quelle renali primitive ad eziologia autoimmune.
- Pre-sensibilizzazione HLA: a favore del primo gruppo (47,1% vs 19,5%, p 0,027). A causa di questa, pur non differendo per la terapia di mantenimento, al gruppo AECA pre<sup>+</sup> è stato somministrato significativamente più globulina anti-timocite (ATG) che Basiliximab durante la terapia di induzione (52,9 % vs 19,6 %).

I dati complessivi sono riassunti in tabella 1:



Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti AECA<sup>+</sup> e AECA<sup>-</sup> allo screening pre-trapianto inclusi nello studio:

	AECA pre <sup>+</sup> (n= 17)	AECA pre <sup>-</sup> (n= 111)	P
<b>Età [anni]</b>	43,5 ± 11,4	46,4 ± 12,4	0,366
<b>Sesso (M/F)</b>	9 / 8	78 / 33	0,171
<b>Malattie immunomediate</b>	12 (70,5%)	49 (44,1 %)	0,07
<b>anti- HLA Ab pre-tx</b>	8 (47,1 %)	22 (19,5 %)	0,027
<b>Età donatore [anni]</b>	46,4 ± 13,5	50,3 ± 17,7	0,386
<b>Tx- precedenti</b>	3 (17,6%)	11 (9,7 %)	0,398
<b>Tempo ischemia fredda [ore]</b>	6,8 ± 5,6	9,3 ± 7,6	0,196
<b>Pre-emptive</b>	4 (23,5 %)	25 (22,3 %)	1
<b>Dialisi</b>	13 (76,5%)	83 (80,2 %)	1
<b>Dialisi peritoneale (DP)</b>	0	14 (16,9 %)	0,204
<b>Emodialisi (HD)</b>	13 (100 %)	71 (85,5 %)	0,36
<b>Tempo in dialisi [mesi]</b>	36,4 ± 33,7	27,9 ± 23,2	0,253
<b>Ac anti-tiroide</b>	4 (23,5 %)	11 (9,7 %)	0,115
<b>ANA</b>	1 (5,9 %)	22 (20,5 %)	0,306
<b>Donatore vivente</b>	8 (47 %)	44 (38,9 %)	0,603
<b>CMV IgG+</b>	15 (88,2%)	86 (76,8 %)	0,523
<b>Tac+MMF/MYF+ ster</b>	16 (94,1%)	106 (95,5%)	0,583
<b>Csa+MMF/MYF+ ster</b>	0	2 (1,8 %)	1
<b>Basiliximab</b>	8 (47,1 %)	89 (80,4 %)	0,006
<b>ATG</b>	9 (52,9 %)	22 (19,6 %)	-
<i>Legenda:Tx =trapianto, Pre-emptive = trapianto eseguito prima di iniziare il trattamento dialitico, Tac= Tacrolimus, MMF = Micofenolato mofetile, MYF = acido micofenolico, Ster=steroidi, Csa = ciclosporina A</i>			

In seguito al trapianto nel gruppo AECA pre<sup>+</sup> si è osservata una negativizzazione degli AECA in 8 pazienti

(AECA pre<sup>+</sup>/post<sup>-</sup>), nel gruppo AECA pre<sup>-</sup> una positivizzazione in 4 pazienti (AECA pre<sup>-</sup>/post<sup>+</sup>) (Fig. 4.1).

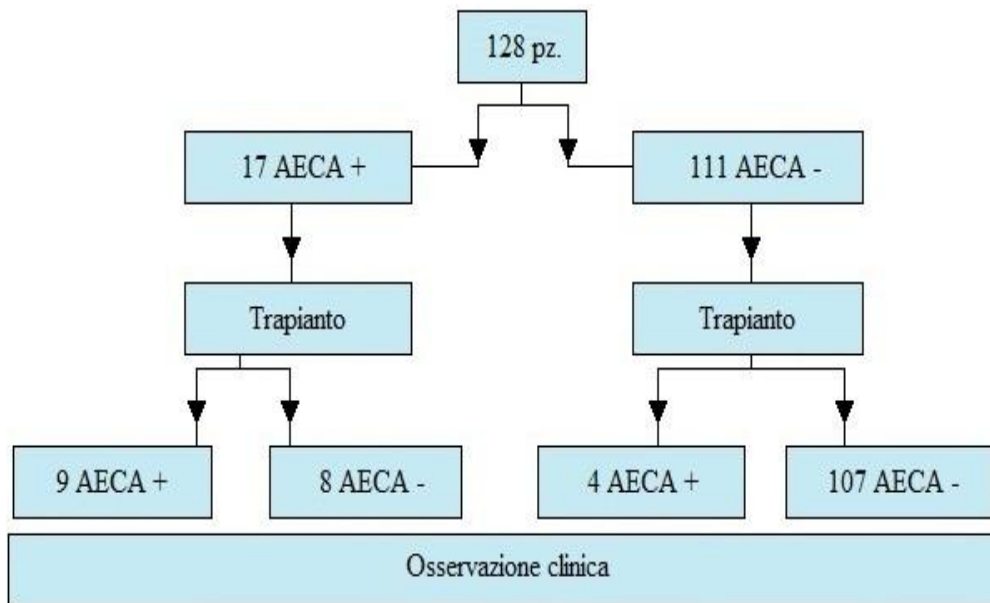


Figura 4.1: Diagramma di suddivisione dei pazienti in studio

I risultati clinici, in seguito a trapianto, dei pazienti con AECA pre<sup>-</sup> o con AECA pre<sup>+</sup> sono i seguenti (tabella 2.1, rene, e tabella 2.2, pancreas):

Tabella 2.1 Risultato clinico dei pazienti trapiantati di **rene** AECA pre<sup>-</sup> e AECA pre<sup>+</sup> allo screening post-trapianto:

	AECA pre <sup>-</sup> (n= 108)	AECA pre <sup>+</sup> (n=16)	P
<b>de novo anti-HLA class I and/or II post-tx (DSA e non)</b>	32 (29,6 %)	7 (43,8 %)	0,92
<b>Rigetti acuti renali provati da biopsia (Banff'07)<sup>47</sup></b>	11 su 108 KT (10,2 %)	1 su 16 KT (6,3 %)	1
<b>C4d focale</b>	3 (27,3 %)	0	1
<b>C4d diffuso</b>	1 (9,1 %)	0	1
<b>Sospetto</b>	4 (36,4 %)	0	1
<b>CMR I</b>	3 (27,3 %)	1 (100 %)	0,416
<b>CMR II</b>	3 (27,3 %)	0	1
<b>CMR III</b>	1 (9,1 %)	0	1
<b>AMR I</b>	2 (18,2 %)	0	1
<b>AMR II</b>	1 (9,1 %)	0	1
<b>AMR III</b>	0	0	-
<b>Rigetti acuti precoci (&lt;2 sett.) KT</b>	1 (9,1 %)	0	1
<b>Rigetti acuti multipli KT</b>	4 (36,4 %)	0	1
<b>Perdita del graft KT</b>	1 (0,9 %)	0	1
<b>Morte</b>	0	0	n.d.
<b>CMV riattivazioni</b>	26 (24,1 %)	3 (18,8 %)	0,456
<b>EBV riattivazioni</b>	3 (2,8 %)	1 (6,3 %)	0,919

**Legenda:** tx = trapianto, KT = trapianto di rene, PT = trapianto di pancreas, CMR = cell-mediated rejection, AMR = antibody-mediated rejection, CMV = Cytomegalovirus, EBV= Epstein-Barr virus.

Tabella 2.2 Risultato clinico dei pazienti trapiantati di **pancreas** AECA pre<sup>-</sup> e AECA pre<sup>+</sup> allo screening post-trapianto:

	AECA pre <sup>-</sup> (n= 25)	AECA pre <sup>+</sup> (n=6)	p
<b>de novo anti-HLA class I and/or II post-tx (DSA e non)</b>	12 (48 %)	2 (33,3 %)	0,429
<b>Rigetti acuti pancreas provati da biopsia (Drachenberg'07)<sup>55</sup></b>	1 su 25 PT (4 %)	3 su 6 PT (50 %)	0,02
<b>Indeterminato</b>	0	0	-
<b>CMR I</b>	0	1 (33,3 %)	1
<b>CMR II</b>	1 (100 %)	2 (66,7 %)	1
<b>CMR III</b>	0	0	-
<b>AMR I</b>	0	0	-
<b>AMR II</b>	0	0	-
<b>AMR III</b>	0	0	-
<b>Rigetti acuti precoci (&lt;2 sett.) PT</b>	0	0	n.d.
<b>Rigetti acuti multipli PT</b>	0	1 (33, 3 %)	1
<b>Perdita del graft PT</b>	1 (4 %)	0	1
<b>Morte</b>	0	0	n.d.
<b>CMV riattivazioni</b>	0	3 (50 %)	1
<b>EBV riattivazioni</b>	1 (4 %)	0	0,806
<i>Legenda: tx = trapianto, KT = trapianto di rene, PT = trapianto di pancreas, CMR = cell-mediated rejection, AMR = antibody-mediated rejection, CMV = Cytomegalovirus, EBV= Epstein-Barr virus.</i>			

Il risultato clinico dei pazienti con AECA pre<sup>+</sup> di fatto non differisce significativamente da quello dei pazienti AECA pre<sup>-</sup> rispetto alla sensibilizzazione HLA post-trapianto e l'evoluzione del *graft* renale. E' stata riscontrata invece una significativa differenza (50% vs 4%, p 0,02) nel numero dei rigetti pancreatici, tutti cellulo-mediati .

Infatti, considerando il rigetto acuto di rene, (classificazione di Banff '07)<sup>47</sup>, si sono verificati 11 rigetti acuti su 108 (10,2%) trapianti di rene nel gruppo AECA pre<sup>-</sup> e uno solo su 16 (6,3%) nel gruppo AECA pre<sup>+</sup>; ottenendo p=1.

Invece nel caso di trapianto di pancreas, i rigetti acuti si sono verificati in un paziente su 25 (4%) di quelli appartenenti al gruppo AECA pre<sup>-</sup> nei 3 su 6 (50%) del gruppo AECA pre<sup>+</sup>; p=0,02. In particolare il rigetto di pancreas più significativo sembra essere quello di tipo cellulo-mediato .

Gli stessi criteri di analisi dei dati sono stati applicati anche ai quattro gruppi finali ottenuti ovvero (pre<sup>-</sup> / post<sup>-</sup>, pre<sup>-</sup> / post<sup>+</sup>, pre<sup>+</sup>/post<sup>+</sup>, pre<sup>+</sup> / post<sup>-</sup>) e sono i seguenti:

- **Pre<sup>-</sup> / post<sup>-</sup>** : in questo gruppo sono stati evidenziati 11 rigetti acuti renali su 104 trapianti (10,6%) e 1 rigetto acuto pancreatico su 24 trapianti (4,2%).
- **Pre<sup>-</sup> / post<sup>+</sup>** : in questo gruppo non sono stati evidenziati rigetti acuti renali né rigetti acuti pancreatici.

- **Pre<sup>+</sup> / post<sup>+</sup>** : non stati evidenziati rigetti acuti renali mentre lo sono stati 2 rigetti acuti pancreatici su 2 trapianti di pancreas (100%).
- **Pre<sup>+</sup> / post<sup>-</sup>** : è stato registrato 1 rigetto acuto renale su 8 (12,5%) e un rigetto acuto pancreatico su 4 (25%).

È stato effettuato un confronto fra tutti e quattro i gruppi utilizzando il test ANOVA ad una via applicato ai parametri d'interesse (tabella 3.1, rene, e tabella 3.2, pancreas):

Tabella 3.1. Risultato clinico dei pazienti trapiantati di **rene** riferito ai gruppi pre<sup>-</sup>/post<sup>-</sup>, pre<sup>-</sup>/post<sup>+</sup>, pre<sup>+</sup>/post<sup>-</sup> e pre<sup>+</sup>/post<sup>+</sup> allo screening post-trapianto:

	AECA pre <sup>-</sup> post <sup>-</sup> (n= 104)	AECA pre <sup>-</sup> post <sup>+</sup> (n=4)	AECA pre <sup>+</sup> post <sup>+</sup> (n=8)	AECA pre <sup>+</sup> post <sup>-</sup> (n=8)	p
<b>de novo anti-HLA class I and/or II post-tx (DSA e non)</b>	31 (29,8%)	1 (25 %)	5 (62,5%)	2 (25%)	0,2736
<b>Rigetti acuti renali provati da biopsia (Banff'07)<sup>47</sup></b>	11 su 104 KT (10,6%)	0 su 4	0 su 8	1 su 8 (12,5%)	0,7003
<b>C4d focale</b>	3(27,3 %)	-	-	0	-
<b>C4d diffuso</b>	1 (9,1 %)	-	-	0	-
<b>Sospetto</b>	4 (36,4 %)	-	-	0	-
<b>CMR I</b>	3 (27,3 %)	-	-	1 (100%)	-
<b>CMR II</b>	3 (27,3 %)	-	-	0	-
<b>CMR III</b>	1 (9,1 %)	-	-	0	-
<b>AMR I</b>	2 (18,2 %)	-	-	0	-
<b>AMR II</b>	1 (9,1 %)	-	-	0	-
<b>AMR III</b>	0	-	-	0	-
<b>Rigetti acuti precoci (&lt;2 sett.) KT</b>	1 (9,1 %)	0	0	0	0,9794

<b>Rigetti acuti multipli KT</b>	4 (36,4 %)	0	0	0	0,8555
<b>Perdita del graft KT</b>	1 (0,9 %)	0	0	0	0,9794
<b>Morte</b>	0	0	0	0	n.d.
<b>CMV riattivazioni</b>	26 (25 %)	0	0	3 (37,5 %)	0,1985
<b>EBV riattivazioni</b>	3 (2,9 %)	0	0	1 (12,5 %)	0,4582

*Legenda: tx = trapianto, KT = trapianto di rene, PT = trapianto di pancreas, CMR = cell-mediated rejection, AMR = antibody-mediated rejection, CMV = Cytomegalovirus, EBV= Epstein-Barr virus*

Tabella 3.2. Risultato clinico dei pazienti trapiantati di **pancreas** riferito ai gruppi pre<sup>-</sup>/ post<sup>-</sup>, pre<sup>-</sup>/ post<sup>+</sup>, pre<sup>+</sup>/post<sup>-</sup> e pre<sup>+</sup>/ post<sup>+</sup> allo screening post-trapianto inclusi nello studio:

	<b>AECA pre<sup>-</sup> post<sup>-</sup> (n= 24)</b>	<b>AECA pre<sup>-</sup> post<sup>+</sup> (n=1)</b>	<b>AECA pre<sup>+</sup> post<sup>+</sup> (n=2)</b>	<b>AECA pre<sup>+</sup> post<sup>-</sup> (n=4)</b>	<b>p</b>
<b>de novo anti-HLA class I and/or II post-tx (DSA e non)</b>	12 (50%)	0	0	2 (50%)	0,4682
<b>Rigetti acuti pancreas provati da biopsia (Drachenberg'07)<sup>55</sup></b>	1 su 24 PT * (4,2 %)	0 su 1	2 su 2 * (100%)	1 su 4 (25%)	<b>0,0002</b>
<b>Indeterminato</b>	0	-	-	-	-
<b>CMR I</b>	0	-	1 (50%)	-	-
<b>CMR II</b>	1 (100 %)	-	1 (50 %)	1 (100 %)	-
<b>CMR III</b>	0	-	-	-	-
<b>AMR I</b>	0	-	-	-	-
<b>AMR II</b>	0	-	-	-	-
<b>AMR III</b>	0	-	-	-	-
<b>Rigetti acuti precoci (&lt;2 sett.) PT</b>	0	0	0	0	n.d.
<b>Rigetti acuti multipli PT</b>	0	0	1 (100%)	0	-
<b>Perdita del graft PT</b>	1 (4,2 %)	0	0	0	0,9658
<b>Morte</b>	0	0	0	0	n.d.
<b>CMV riattivazioni</b>	0	0	0	3 (75 %)	-
<b>EBV riattivazioni</b>	1 (4,2 %)	0	0	0	0,9658

*Legenda: tx = trapianto, KT = trapianto di rene, PT = trapianto di pancreas, CMR = cell-mediated rejection, AMR = antibody-mediated rejection, CMV = Cytomegalovirus, EBV= Epstein-Barr virus, \* = gruppi con probabilità di rigetto significativamente diversa (test ANOVA).*

Dal confronto tra pazienti AECA pre<sup>-</sup> / post<sup>+</sup> e AECA pre<sup>-</sup> / post<sup>-</sup> 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* e mortalità. Tali risultati sono sovrapponibili nel confronto tra AECA pre<sup>-</sup>/post<sup>-</sup> e AECA pre<sup>+</sup>/post<sup>-</sup>, mentre nel gruppo persistentemente positivo per AECA risulta ancora una volta significativamente più alto il numero di rigetti cellulo-mediati di pancreas.

I risultati presentati finora nello studio sono riassunti e confrontati in forma grafica nelle pagine seguenti (Fig. 4.2):



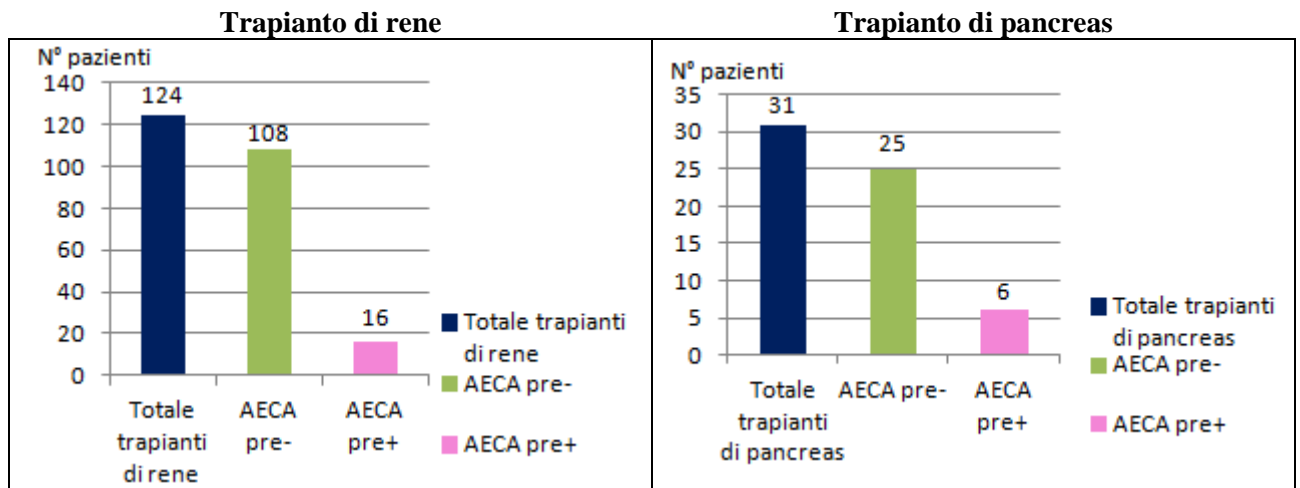


Fig. 4.2 a

Fig. 4.2 b

Numero di pazienti AECA pre<sup>-</sup> e AECA pre<sup>+</sup> inclusi nello studio per quanto riguarda il trapianto di rene (Fig. 4.2 a) e il trapianto di pancreas (Fig. 4.2 b).

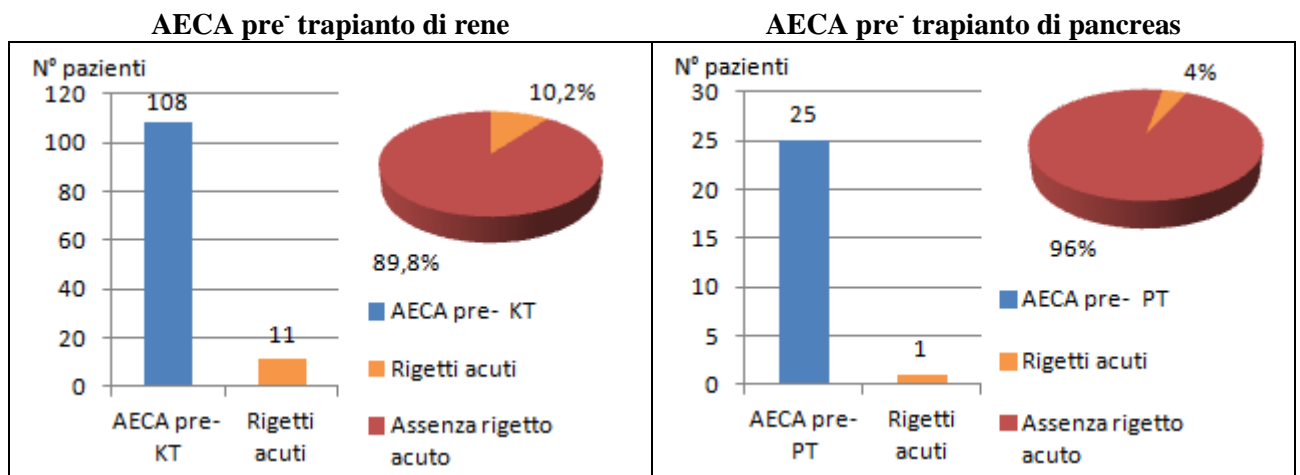


Fig. 4.2 c

Fig. 4.2 d

Numero dei pazienti AECA pre<sup>-</sup> trapiantati di rene (Fig. 4.2 c) e di pancreas (Fig. 4.2 d) e rispettivi rigetti acuti.

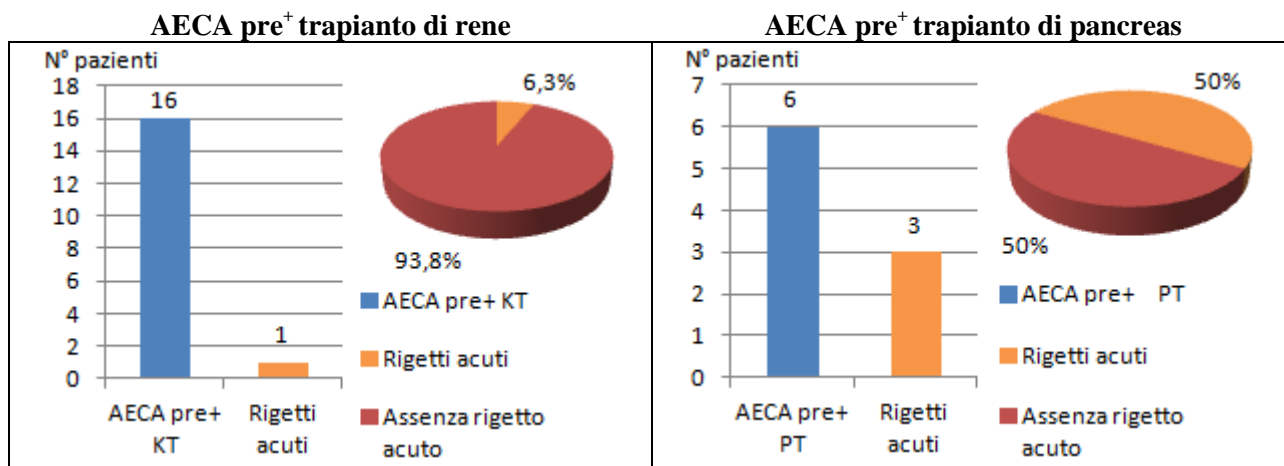


Fig. 4.2 e

Fig. 4.2 f

Numero dei pazienti AECA pre<sup>+</sup> trapiantati di rene (Fig. 4.2 e) e di pancreas (Fig. 4.2 f) e rispettivi rigetti acuti.

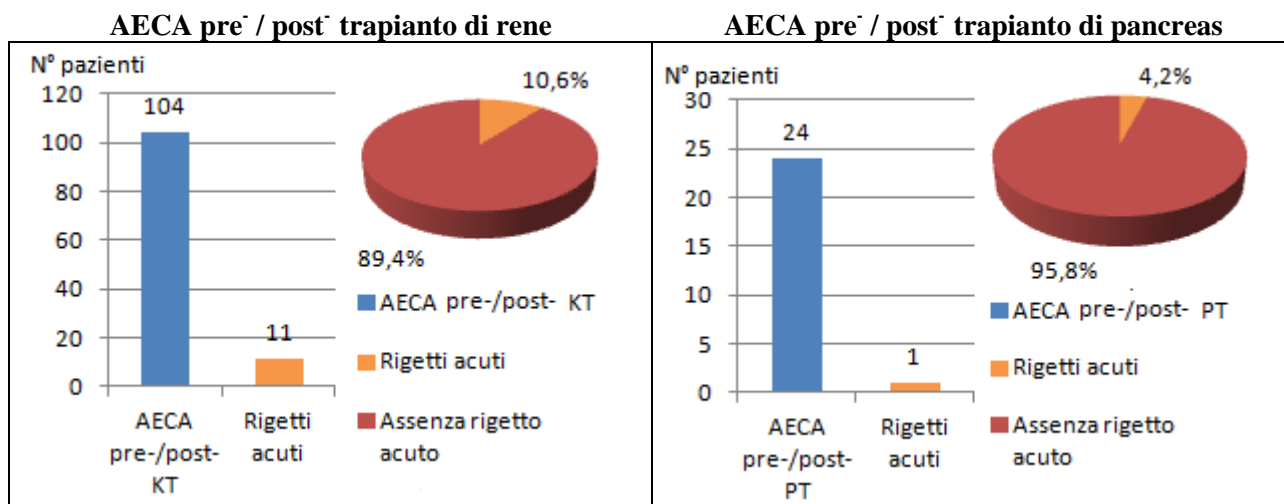


Fig. 4.2 g

Fig. 4.2 h

Numero dei pazienti AECA pre<sup>-</sup>/post<sup>-</sup> trapiantati di rene (Fig. 4.2 g) e di pancreas (Fig. 4.2 h) e rispettivi rigetti acuti.

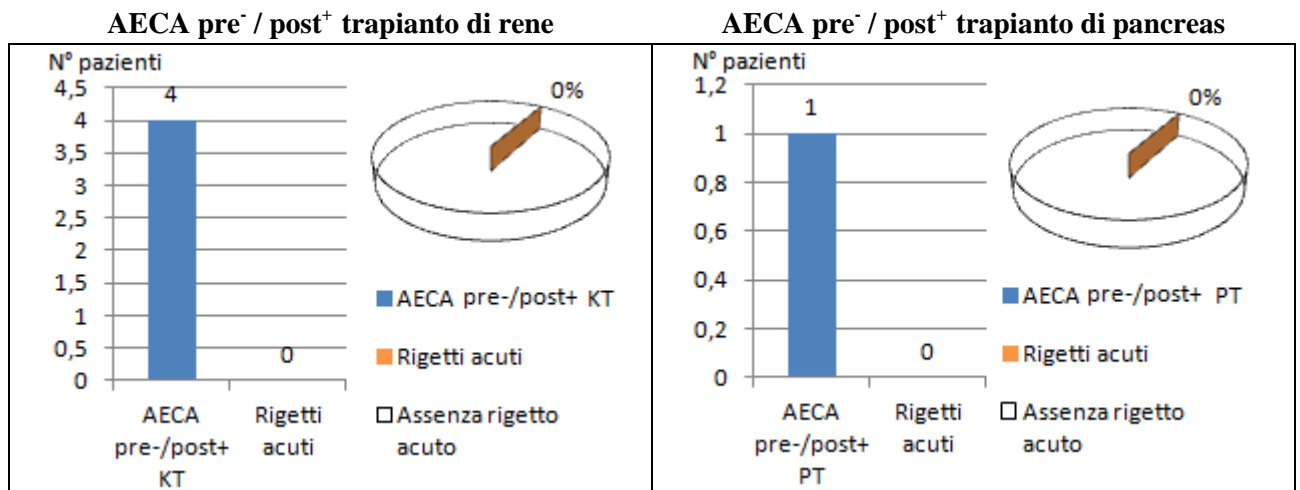


Fig. 4.2 i

Fig. 4.2 l

Numero dei pazienti AECA pre<sup>-</sup>/post<sup>+</sup> trapiantati di rene (Fig. 4.2 i) e di pancreas (Fig. 4.2 l) e rispettivi rigetti acuti.

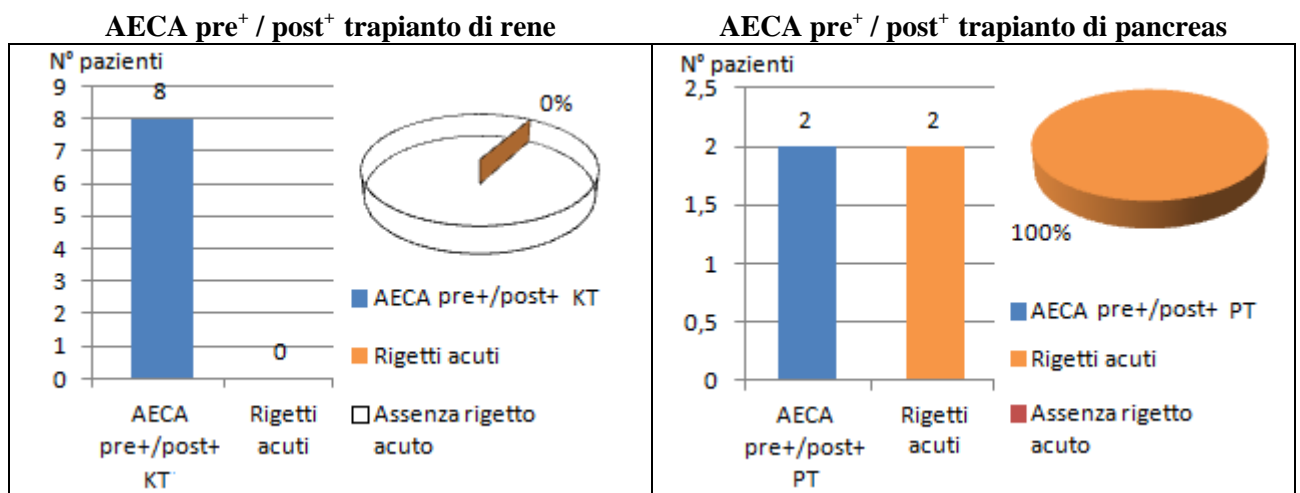


Fig. 4.2 m

Fig. 4.2 n

Numero dei pazienti AECA pre<sup>+</sup>/post<sup>+</sup> trapiantati di rene (Fig. 4.2 m) e di pancreas (Fig. 4.2 n) e rispettivi rigetti acuti.

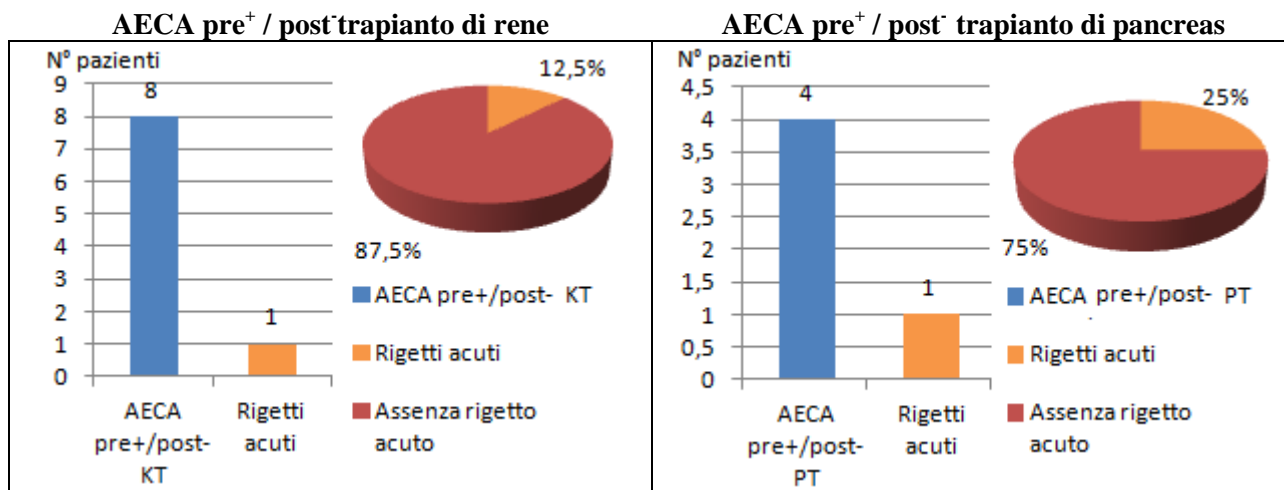


Fig. 4.2 o

Fig. 4.2 p

Numero dei pazienti AECA pre<sup>+</sup>/post<sup>-</sup> trapiantati di rene (Fig. 4.2 o) e di pancreas (Fig. 4.2 p) e rispettivi rigetti acuti.

Fig. 4.2 Riassunto risultati

## V. DISCUSSIONE

Il gruppo AECA pre<sup>+</sup> presenta una modesta prevalenza di patologie immunomediate rispetto al gruppo AECA pre<sup>-</sup>. Rispetto agli altri studi finora eseguiti, noi abbiamo inserito tra le suddette patologie anche le malattie primitive renali ad eziologia autoimmune provate biotticamente, e di fatto l'introduzione di quei casi di glomerulopatia non diagnosticata con biopsia, ma clinicamente evidente (per esempio nei casi di sindrome nefrosica), in assenza di ereditarietà o malattie metaboliche, avrebbe condotto alla piena significatività del dato. D'altra parte l'associazione significativa tra AECA e pre-sensibilizzazione HLA (considerando qualunque PRA), peraltro già nota, permette di collocare gli AECA in un *continuum* tra auto- e alloimmunità.

Un dato originale è la proporzione di pazienti con AECA pre-formati che si sono negativizzati dopo il trapianto. Q. Sun aveva avuto un numero di pazienti negativizzati significativamente inferiore al nostro (5 su 52 vs 8 su 17), ma il suo studio contemplava l'uso del solo Basiliximab come terapia di induzione e si poteva quindi pensare ad una influenza dell'ATG su questo aspetto. In realtà, per quanto il gruppo AECA pre<sup>+</sup>, anche a causa della maggiore pre-sensibilizzazione HLA, sia stato trattato in proporzione significativamente maggiore con ATG piuttosto che con Basiliximab, non vi è, in questo studio, una differenza significativa tra la terapia d'induzione e di mantenimento dei pazienti persistentemente positivi agli AECA e quelli AECA pre<sup>+</sup>post<sup>-</sup>.

Per quanto riguarda eventuali fattori infettivi immunomodulanti non è risultata alcuna differenza significativa tra il gruppo AECA pre<sup>+</sup> e AECA pre<sup>-</sup> riguardo la sieropositività delle IgG per CMV. Nel post-

trapianto non sembra esservi alcuna influenza delle infezioni da CMV né da EBV sullo sviluppo o negativizzazione degli AECA, che pertanto sembrano essere indipendenti da tali fattori.

Come riportato da Q. Sun, anche nel nostro studio la presenza di AECA pre-formati non ha condizionato in alcuna maniera il risultato del *graft* renale, non avendo inciso sul numero di rigetti acuti singoli, multipli o precoci (<2 settimane dal trapianto), sulla perdita del trapianto né sull'andamento della funzione renale. Tali conclusioni sono risultate sovrapponibili sia riguardo a pazienti persistentemente AECA positivi, sia a quelli negativizzati e, diversamente da quanto descritto da Sun , anche nei pazienti che presentavano AECA *de novo*, pur sottolineando che nella nostra casistica si tratta di un gruppo estremamente esiguo (4 soggetti).

Molto interessante è risultata l'associazione tra AECA e rigetti di pancreas, peraltro non descritta in letteratura e che richiederà ulteriori approfondimenti. Dai

dati essa sembra essere legata essenzialmente agli AECA preformati ( $p < 0,01$ ), ma il gruppo AECA pre<sup>-</sup> /post<sup>+</sup>, già piccolo, contempla un solo trapianto di pancreas, troppo poco per esprimersi in questo senso.

In conclusione, nella valutazione globale dei dati bisogna sottolineare come, nello studio più simile al nostro (come si è detto quello di Sun del 2010), fosse compresa una percentuale significativamente più alta sia di pazienti AECA pre<sup>+</sup> che di positivizzazioni *de novo*. E' possibile che ciò sia stato legato a tempi d'ischemia significativamente più lunghi dei nostri (17 vs 8 ore) con conseguente necrosi ischemica e sensibilizzazione ad antigeni endoteliali, oppure ad un *bias* metodologico assolutamente non secondario. L'autore, infatti non ha tipizzato l'HLA delle cellule HUVEC, con il risultato possibile che gli AECA<sup>+</sup> all'immunofluorescenza indiretta fossero un falso positivo legato alla presenza di anticorpi del ricevente contro gli HLA della cellula endoteliale.



Nonostante nel presente studio sia stato osservato solo un numero relativamente modesto di pazienti per un breve *follow-up* (in media 14 mesi vs i 36 di Sun) taluni dati, primi fra tutti quelli inerenti al trapianto di pancreas, risultano interessanti.

Per questo motivo ci si propone di approfondire lo studio esaminando un numero maggiore di pazienti trapiantati di pancreas e di rene per verificare se questo risultato statistico sia confermato.

## VI. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio indicano che non ci sono evidenze di correlazione tra la probabilità di rigetto acuto in seguito a trapianto di rene e la presenza di AECA preformati oppure AECA *de novo*.

Per quanto riguarda il trapianto di pancreas non ci sono evidenze sul legame tra AECA *de novo* e probabilità di rigetto acuto, così come nel trapianto di rene, mentre, nonostante i dati siano riferiti ad un numero esiguo di trapianti di pancreas, sembra ci sia correlazione tra AECA preformati e rigetto pancreatico di tipo cellulo-mediato.

Quest'ultimo aspetto, come già anticipato nella discussione, meriterà ulteriori approfondimenti aumentando il numero di pazienti inclusi nello studio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abul K. Abbas, A.H. Lichtman, S.Pillai. *Immunologia cellulare e molecolare*. Elsevier, 2010.
2. M. Laposata. *Medicina di laboratorio*, Piccin, 2012.
3. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL. *Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipient of a first cadaveric transplant*. N Engl JMed.1999;341:1725-31.
4. Orsenigo E, Socci C, Fiorina P, Cristallo M, Castaldi, R, Gavazzi F. *Simultaneous pancreas-kidney transplantation: short- and long-term results*. Transplant Proc 2004; 36:586-588
5. Burke GW, 3rd, Vendrame F, Pileggi A, Ciancio G, Reijonen H, Pugliese A. *Recurrence of autoimmunity following pancreas transplantation*. Curr Diab Rep 2011; 11 (5): 413.
6. Canaud G, Audard V, Kofman T, Lang P, Legendre C, Grimbert P. *Recurrence from primary and secondary glomerulopathy after renal transplant*. Transpl Int 2012; 25 (8): 812.
7. Goers TA, Ramachandran S., Aloush A., Trulock E., Patterson GA., Mohnakumar T.. *De novo production of K-alpha1 tubulin-specific antibodies: role in chronic lung allograft rejection*. J Immunol, 2008 **180**(7): p. 4487-94.
8. 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.
9. 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.

10. 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.
11. Nath, D, IliasBasha 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
12. 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 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients.* Transplantation, 2010.90 (12): 1473-1477.
13. 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.
14. Pober J, Orosz CG, Roese ML, Savage CO. *Can graft endothelial cells initiate a host-graft immune response?* Transplantation 1996; 61: 343-349.
15. 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.
16. Cerilli J, Brasile L, Galouzis T, Lempert N, Clarke J. *The vascular endothelial cell antigen system.* Transplantation 1985 ; 39 : 286-289.
17. Paul LC, Baldwin WM, Van Es LA. *Vascular endothelial alloantigens in renal transplantation.* Transplantation 1985 ; 40 : 117-123.
18. Dragun D. *Humoral responses direct against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplantation.* Transplantation. 2008 ; 86 (8) : 1019-1025.
19. Linqvist KJ, Osterland CK. *Human antibodies to vascular endothelium.* Clin Exp Immunol. 1971 ; 9:753-760

20. 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.
21. Heurkens AH, Daha MR, Breeveld FC. *Anti-endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid vasculitis.* Arthritis Rheum 1989;32:1191-1192.
22. 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
23. 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.
24. 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
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Servettaz A, Guilpain P, Tamas N, Kaveri SV, Camoin L, Mouthon L. *Natural anti-endothelial cell antibodies.* Autoimmun Rev 2008 ; 7 (6) : 426-430
29. 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.

30. 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.
31. 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
32. 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.
33. 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.
34. Racusen LC, Colvin RB, Solez K. *Antibody mediated rejection criteria- an addition to the Banff97 classification of renal allograft rejection*. Am J Transplant 2003 ; 3:708-714.
35. Rose ML, Smith JD, Lawson C. *Antibody formation and its impact on long-term graft outcome*. Transplant Proc 2001 ; 33:2411-2413.
36. Glotz D, Lucchiari N, Pegaz-Fiornet B, Suberbielle-Boissel C. *Endothelial cells as targets of allograft rejection*. Transplantation 2006 ; 82 : 19-21.
37. 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.
38. 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.
39. Toyoda M, Petrosian A, Jordan SC. *Immunological characterization of anti-endothelial cell antibodies induced by cytomegalovirus infection*. Transplantation 1999 ; 68 (9) 1311-1318.

40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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
46. Han F, Lv R, Jin J, Wu J, Chen Y, Wang H, Chen J. *Pre-transplant serum concentrations of antiendothelial cell antibody in panel reactive antibody negative renal recipients and its impact on acute rejection.* Clin Chem Lab Med 2009 ; 47 (10):1265-1269.
47. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. *Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions.* Am J Transplant 2008; 8 (4): 753.
48. Ismail AM, Badawi RM, El-Agroudy AE, Mansour MA. *Pretransplant detection of antiendothelial cell antibodies could predict renal allograft outcome.* Exp Clin Transplant, 2009 ; 7 (2) : 104-109.
49. 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.

50. Xavier P, Aires P, Sampaio S, et al. *XM-ONE detection of endothelium cell antibodies identifies a subgroup of HLA-antibody negative patients undergoing acute rejection*. *Transplant Proc* 2011; 43 (1): 91.
51. Barz D, Rummler S. *Detection of antibodies in eluates of immunoadsorption causing humoral rejection in patients after solid organ transplantation*. *Atheroscler Suppl* 2013; 14 (1): 191.
52. Lupo L, Panzera P, Tandoi F, et al. (ottobre 2008). *Basiliximab versus steroids in double therapy immunosuppression in liver transplantation: a prospective randomized clinical trial*. *Transplantation* **86** (7):92531.
53. Regan, J.F., Campbell, K., Van Smith, L., Schroeder, T J., Womble, D., Kano, J., and Buelow, R. *Sensitization following Thymoglobulin and Atgam rejection therapy as determined with a rapid enzyme-linked immunosorbent assay*. US Thymoglobulin Multi-Center Study Group *Transplant. Immunol.*, **1999**, 7:115-121.
54. Bourdage, J.S., and Hamlin, D.M. *Comparative polyclonal anti-thymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flowcytometry*. *Transplantation*, **1995**, 59: 1194-1200.
55. Drachenberg CB, Odorico J, Demetris AJ, et al. *Banff schema for grading pancreas allograft rejection: working proposal by a multi-disciplinary international consensus panel*. *Am J Transplant* 2008; 8 (6): 1237.



## *Ringraziamenti*

*Desidero ringraziare il Dott. Daniele Focosi per i preziosi insegnamenti ricevuti durante l'anno dell'internato di tesi e per la disponibilità a dirimere i miei dubbi nella stesura di questo lavoro.*

*Vorrei anche esprimere la mia sincera gratitudine al Prof. Aldo Paolicchi per la disponibilità mostratami e al Dott. Fabrizio Scatena per avermi ospitato presso la sua struttura.*

*Inoltre ringrazio le correlatrici Dott.ssa Vanna Fierabracci e Dott.ssa Arianna Tavanti per i loro puntuali suggerimenti.*

*Infine ho desiderio di ringraziare con affetto la mia famiglia, il mio fidanzato e la carissima Emma Falaschi per il sostegno ed il grande aiuto che mi hanno dato e per essermi stati vicini in ogni momento durante questo anno di lavoro.*