

## II SESSIONE COMUNICAZIONI - TRAPIANTO SALA VERCELLONE Lunedì, 8 Ottobre 2007 - ore 10.00-11.00

### TERAPIA DI INDUZIONE CON CAMPATH 1H IN UN REGIME IMMUNOSOPPRESSIVO SENZA STEROIDE E CON BASSE DOSI DI TACROLIMUS E SIROLIMUS IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI RENE (TX). STUDIO PROSPETTICO MONOCENTRICO

Bossini N, Mandrini S, Setti G, Iovinella L, Maffei C, Maiorca P, Cancarini G  
Divisione e Cattedra di Nefrologia, Spedali Civili e Università di Brescia, Brescia

**Introduzione.** L'uso protratto dello steroide è tra le cause principali di morbilità dopo tx di rene. Recenti esperienze documentano che l'induzione con alemtuzumab, anticorpo monoclonale umanizzato in grado di determinare una profonda e prolungata deplezione linfocitaria, potrebbe consentire di evitare l'uso dello steroide nella maggior parte dei riceventi di tx di rene.

**Scopo dello studio.** Valutare efficacia e sicurezza di una terapia di induzione con alemtuzumab in un protocollo immunosoppressivo privo di steroide, nel tx di rene.

**Pazienti e metodi.** Tra maggio e dicembre 2006 sono stati arruolati 18 pazienti sottoposti a tx di rene da donatore deceduto presso il nostro centro. Sono stati esclusi i 2°tx, gli iperimmuni (PRA > 50%) e gli HBsAg positivi. Il Campath veniva somministrato in una unica dose di 20-30 mg intraoperatoriamente, preceduta da Metilprednisolone 500 mg. La terapia di mantenimento era costituita da Tacrolimus (livelli ematici: 8-10 ng/ml il primo mese, poi 5-8 ng/ml) associato a Sirolimus (livelli ematici: 5-10 ng/ml). L'infezione da CMV veniva monitorata con modalità "pre-emptive". In tutti i pazienti si eseguiva un monitoraggio delle sottopopolazioni leucocitarie (granulociti, linfociti T e B, NK, Monociti) pre tx, giorno 1°, 5°, 10°, 30° e poi mensilmente fino al 6° mese. Lo steroide veniva ripreso e mantenuto dopo uno o due rigetti acuti, in base al grado istologico.

**Risultati.** Non sono stati registrati eventi avversi legati all'uso dell'alemtuzumab, dopo un fu medio di 4.5 mesi non è stato documentato alcun episodio di rigetto acuto e tutti i pazienti sono liberi da steroide. Il 33.3% dei pazienti hanno richiesto un trattamento antibiotico o antivirale per complicanze infettive, sempre reversibili.

N° pazienti/ età media	18/51 anni	Sopravvivenza del paziente al fu	100%
Follow-up medio	4.5 mesi	Sopravvivenza del trapianto al fu	100%
Reazioni avverse ad alemtuzumab	0	Infezione da CMV	16.6%
Ritardata ripresa funzionale	11%	Malattia da CMV	5.5%
Incidenza di rigetto acuto al fu	0%	Polmoniti	16.6%
Pazienti liberi da steroide al fu	100%	Complicanze infettive severe*	3 (16.6%)
Creatinina plasmatica al fu	1.5 mg/dl	Diabete	11%

\* 1 endocardite; 1 sepsi da candida; 1 nefrite da poliomavirus BK

(segue)

### ALLOSTIMOLAZIONE IN VITRO DEI CD4+: EFFETTI DI DIFFERENTI TERAPIE IMMUNOSOPPRESSIVE

Libetta C<sup>1</sup>, Sepe V<sup>1</sup>, Portalupi V<sup>1</sup>, Cosmai L<sup>1</sup>, Bellotti N<sup>1</sup>, Rossi N<sup>1</sup>, Canevari M<sup>1</sup>, Abelli M<sup>2</sup>, Dal Canton A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UO di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Università di Pavia e Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia; <sup>2</sup>UO Trapianto di Rene Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

**Introduzione.** L'effetto immunosoppressivo del Sirolimus (SRL) sulle cellule T è stato oggetto di numerosi studi, ma la sua influenza sulle cellule presentanti l'antigene (APC) è meno chiara. È stato dimostrato che l'inibizione della funzione di presentazione dell'antigene è un meccanismo alternativo attraverso il quale gli immunosoppressori agiscono sulla risposta T-mediata. La ciclosporina (CsA) inibisce l'espressione delle molecole di costimolazione sulle cellule dendritiche generate *in vitro*. Studi recenti hanno dimostrato che la rapamicina riduce la risposta antigenica nelle APC probabilmente attraverso l'inibizione della macropinosi ed endocitosi.

**Scopo.** Lo scopo di questo studio è stato quello di comparare la funzione delle sottopopolazioni T helper (Th) di pazienti trapiantati di rene in terapia immunosoppressiva con differenti protocolli, dopo allostimolazione *in vitro* con APC.

**Metodi.** 16 pazienti trapiantati di rene da donatore cadavere (9 uomini e 7 donne) sono stati arruolati nello studio. I pazienti sono stati randomizzati ed assegnati ad uno dei tre seguenti regimi immunosoppressivi: gruppo SRL (n = 6) = SRL + micofenolato mofetile (MMF) + metiprednisolone (MP); gruppo CsA-1 (n = 5) = CsA + MMF; gruppo CsA 2 (n = 6) = CsA + MP. Allo scopo di studiare soggetti clinicamente stabili, i prelievi, per lo studio della funzione linfocitaria, sono stati praticati a 3 mesi dal trapianto di rene. I prelievi di sangue intero (20 ml) sono stati sempre effettuati immediatamente prima dell'assunzione delle terapie immunosoppressive e a digiuno. 8 volontari sani di età 38 ± 10.6 (4 uomini e 4 donne), formavano il gruppo controllo (CON). Al momento del prelievo nessuno dei pazienti trapiantati presentava segni clinici o laboratoristici di infezione o rigetto acuto. La funzione delle due sottopopolazioni di cellule Th è stata valutata attraverso la valutazione delle citochine caratterizzanti la sottopopolazione Th1 (IFN $\gamma$ ) e la sottopopolazione Th2 (IL-5), attraverso la metodica ELISPOT. In breve alle piastre (96 pozzetti) sono state adsorbite, previa incubazione con 100  $\mu$ l di anticorpo monoclonale (MoAb) specifico per IFN $\gamma$  (clone 2G1, 5 mg/mL, Endogen, Woburn, MA USA) o con IL-5 (clone 5A10, 8 mg/mL, Endogen, Woburn, MA USA), i risultanti spots sono stati contati attraverso un sistema informatizzato dedicato. L'analisi ELISPOT è stata effettuata dopo 48 ore di allostimolazione con APC, ottenute dal buffy-coat di 10 donatori sani, depleto dei CD3, attraverso separazione negativa con il sistema di micro-beads magnetiche, e irradiato con raggi gamma (30 Gy). Il rapporto PBMC paziente/APC era 1:1.

(segue)

Percentuale di deplezione delle sottopopolazioni linfocitarie nei primi 6 mesi:

Intervallo (gg)	T 0	T 1	T 5	T 10	T 30	T 90	T 120
Monociti	100%	-51%	-46%	-35%	-37%	-20%	-22%
CD3	100%	-99%	-99%	-99%	-98%	-78%	-75%
CD19	100%	-99%	-11%	-100%	-99%	-47%	-8%

Il prezzo del Campath (Euro 550) è nettamente inferiore a quello di ATG (Euro 2.583) ed anti CD25 (Euro 3.016-3.345).

**Conclusioni.** Questi risultati preliminari suggeriscono che l'induzione con Campath, in associazione con Tacrolimus e Sirolimus in basse dosi è ben tollerata, è molto efficace nel prevenire il rigetto acuto e nell'evitare l'uso dello steroide. Ha un prezzo minore e non sembra comportare una incidenza maggiore di complicanze infettive severe.



1

**Risultati.** I risultati sono mostrati nella seguente tabella. I dati sono espressi come numero di spots $\pm$ DS.

	SRL	CsA-1	CsA-2	CON
IFN $\gamma$ (spots/2 x 10 <sup>5</sup> cellule)	32.8 $\pm$ 27.7**	68.3 $\pm$ 32.5*	76.5 $\pm$ 41.1*	233.5 $\pm$ 116
IL-5 (spots/2 x 10 <sup>5</sup> cellule)	39.1 $\pm$ 17.6*	34.6 $\pm$ 20.8*	28.9 $\pm$ 16.0*	98.6 $\pm$ 59.3

\*p < 0.05 vs CON ; \*\*p < 0.005 vs CsA-1 e CsA-2

**Conclusioni.** I dati di questo studio dimostrano che nei pazienti sottoposti a trapianto renale l'allostimolazione con APC è maggiormente inibita dal trattamento con SRL rispetto a quello con CsA. In particolare l'inibizione indotta dal SRL sulle Th1 si esprime attraverso una non responsività alla allostimolazione.

2

### VALUTAZIONE DEI PATTERN DI ESPRESSIONE GENICA ASSOCIATI AI MECCANISMI IMMUNOLOGICI DEL DANNO DA ISCHEMIA DI RIPERFUSIONE IN PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO DI RENE

Zaza G<sup>1</sup>, Verrienti R<sup>1</sup>, Taveri M<sup>1</sup>, Pontrelli P<sup>2</sup>, Gesualdo L<sup>2</sup>, Di Tonno P<sup>1</sup>, Battaglia M<sup>1</sup>, Carella M<sup>3</sup>, Schena FP<sup>1</sup>, Grandaliano G<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto e Unità di Nefrologia Chirurgica e Trapianto, Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organo, Università di Bari, Bari; <sup>2</sup> Unità di Nefrologia e Dialisi, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Foggia, Foggia; <sup>3</sup> U.O. Genetica Medica, Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Foggia

**Introduzione.** La ritardata ripresa funzionale del rene trapiantato (delayed graft function, DGF) è un evento frequente che espone il ricevente del trapianto di rene ad un aumentato rischio di morbilità nell'immediato post-trapianto, con significativo incremento della incidenza di rigetto acuto. Dati sperimentali suggeriscono un coinvolgimento della risposta immunitaria nel danno da ischemia-riperfusion, che sottende la DGF.

**Scopi.** Lo scopo del nostro studio è stato quello di individuare specifici pattern di espressione genica in grado di discriminare pazienti che sviluppavano DGF nel post-trapianto rispetto a quelli con immediata ripresa funzionale (EGF) e di identificare pathway cellulari alla base di tale processo.

**Pazienti e metodi.** A tale scopo sono stati arruolati 6 pazienti che presentavano DGF nel post-trapianto e 6 pazienti con EGF. L'individuazione dei pazienti con DGF è stata effettuata secondo i criteri di Govani MV et al (JASN, 13: 1645-2002).

L'RNA totale, estratto da linfomonociti periferici (PBMC) prima (T0) e 24h dopo il trapianto (T24), è stato utilizzato per misurare il livello di espressione di 22.283 probe set genici attraverso ibridazione alla piattaforma microarray HG-U133A (Affymetrix, Santa Clara, CA). Dopo normalizzazione dell'intensità del segnale (MAS 5.0), è stato calcolato il valore di fold-change (FC) di espressione genica (T24 versus T0) per tutti i probe set genici inseriti nel nostro dataset. I geni iper- o sotto espressi nei rispettivi gruppi di pazienti sono stati selezionati applicando un cut-off di 2 FC. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software R-project 2.0.1. Inoltre, i geni selezionati sono stati studiati utilizzando il software Ingenuity Pathways Analysis (Mountain View) per l'individuazione di network funzionali specifici.

**Risultati.** Dopo l'applicazione di algoritmi statistici sono stati selezionati n=25 probe set genici con un'aumentata espressione (range: 2,0-3,1 FC) e n=22 probe set genici con una ridotta espressione (range: 2,0-2,8 FC) nel gruppo di pazienti con DGF (p<0,0001). Sulla base dell'analisi delle Gene Ontology, i geni con un'aumentata espressione rientravano in processi chiave della trasduzione del segnale (PPARG) e della risposta infiammatoria (TNFAIP6). Nel gruppo di geni meno espressi nella DGF ne sono stati individuati alcuni coinvolti nella risposta immunitaria (CD6) e nella risposta allo stress (OSIL). Nei pazienti con

(segue)

3

### RUOLO DELLE CELLULE PROGENITRICI RENALI E TUBULARI PAX-2+ NELLA RIGENERAZIONE TUBULARE DEL RENE TRAPIANTATO CON RITARDATA RIPRESA FUNZIONALE (DGF)

Loverre A<sup>1</sup>, Capobianco C<sup>1</sup>, Divella C<sup>1</sup>, Dittono P<sup>2</sup>, Battaglia M<sup>2</sup>, Grandaliano G<sup>1</sup>, Schena FP<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organo, Divisione di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Bari; <sup>2</sup> Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organo, Divisione di Urologia e Trapianto Renale, Bari

**Introduzione.** La ritardata ripresa funzionale del rene trapiantato (DGF) è associata ad una aumentata morbilità nel post-trapianto ed è caratterizzata istologicamente da una necrosi tubulare acuta. In questo scenario, le cellule tubulari sopravvissute al danno vanno incontro a proliferazione rimpiazzando le cellule danneggiate. Molti studi hanno evidenziato un ruolo per le cellule progenitrici renali nella rigenerazione del danno tubulare. Recentemente è stata identificata una linea di cellule progenitrici che esprimono CD133 e Pax-2.

**Scopo.** Valutare la presenza di queste popolazioni cellulari nei reni umani pre- e post-trapianto nei pazienti con DGF.

**Pazienti e metodi.** Sono stati inclusi nello studio 25 pazienti: 10 senza DGF (gruppo I) e 15 con DGF (gruppo II). Inoltre, come tessuto normale, sono state utilizzate le porzioni apparentemente normali di 10 reni asportati per neoplasia. L'espressione proteica di CD133, Pax-2 e Ki-67 (marker della proliferazione cellulare) è stata valutata mediante microscopia confocale.

	Renormali	Pre-Tx (gruppo I)	Pre-Tx (gruppo II)	Post-Tx (gruppo II)
Pax-2+/CD133+	1.5 ± 0.7	0.8 ± 0.9	0 ± 0*	0.5 ± 0.8**
Pax-2+/CD133-	94.2 ± 33.9	77.0 ± 7.0	18.3 ± 8.3***	67.6 ± 29.1
CD133+/Ki-67+	1.3 ± 0.3	0 ± 0	0.1 ± 0.2	0.4 ± 2.1
Pax-2+/Ki-67+	0 ± 0	0.5 ± 0.4	0 ± 0	0.1 ± 0.2

I valori sono espressi come la mediana e range interquartile

**Risultati.** Nei reni normali e nelle biopsie pre-trapianto del gruppo I, le cellule CD133+/Pax-2+ sono state osservate sia all'interno della capsula del Bowman che a livello tubulare. Nelle biopsie pre-trapianto del gruppo II il numero di cellule CD133+/Pax-2+ era significativamente ridotto (\*p=0.0001). Nelle biopsie post-trapianto del gruppo II è stato rilevato un aumento significativo di queste cellule a livello tubulare (\*\* p=0.03). Il numero di cellule CD133+/Pax-2+ nelle biopsie pre-trapianto era inversamente e significativamente correlato con il tempo di ischemia fredda (p=0.01).

(segue)

4

DGF, l'analisi delle pathway dimostrava una aumentata espressione di geni coinvolti: 1) nell'attivazione del sistema del complemento, 2) nella presentazione dell'antigene e 3) nella polarizzazione della risposta immunitaria mediata in senso Th1.

**Conclusioni.** Il risultato di questa analisi ci ha permesso di individuare geni in grado di discriminare pazienti con DGF da quelli con normale ripresa funzionale del rene trapiantato e ha aperto la strada ad uno studio funzionale atto a definire il ruolo dell'immunità adattativa nella patogenesi di questa condizione clinica.