

## CELLULE T-REGOLATORIE NEL TRAPIANTO DI RENE

C. Libetta, V. Portalupi, E. Margiotta, V. Sepe, M. Canevari, F. Meloni, M. Morosini, A. Dal Canton

Unità di Nefrologia, Dialisi e Trapianto e Unità di Malattie dell'Apparato Respiratorio, Università degli Studi e Fondazione I.R.C.C.S., Policlinico "San Matteo", Pavia

### Regulatory T cells in kidney transplant recipients

*Immunosuppressive drugs are essential for the prevention of acute transplant rejection but some may not promote long-term tolerance. Tolerance to self-antigens is ensured naturally by several mechanisms; one major mechanism depends on the activity of regulatory T lymphocytes (Treg), particularly CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. The transcription factor forkhead box protein 3 (Foxp3) has been identified as a molecular marker for Treg cells. The direct effects of immunosuppressive drugs on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells are uncertain. In the clinical setting, basiliximab used in the induction phase of immunosuppression effectively reduced the number of acute rejection episodes. We studied the effects of the most widely used immunosuppressive induction regimens including cyclosporine, mycophenolate mofetil, steroids, and anti-CD25 monoclonal antibody (basiliximab) on the capacity to regulate human Treg in vivo.*

*Twenty first cadaveric kidney transplant recipients (14 men, 6 women) were enrolled in the study. Blood samples were collected before kidney transplant and after one month. Blood sampling was done immediately before the administration of immunosuppressive therapy after an overnight fast. None of the transplant recipients presented laboratory or clinical signs of infection or acute rejection. The number and percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and Foxp3<sup>+</sup> T cells were determined by fluorescence activated cell sorter (FACS) analysis.*

*Our results showed absence of both CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells one month after transplant. Peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells significantly decreased after transplant but did not disappear.*

*These preliminary data suggest that immunosuppressive induction therapy with basiliximab completely suppresses CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells and significantly reduces the total number of Foxp3<sup>+</sup> lymphocytes. (G Ital Nefrol 2009; 26 (Suppl. S45): S54-7)*

Conflict of interest: None

### KEY WORDS:

T-regulatory  
Lymphocytes,  
Self tolerance,  
Kidney transplant,  
Basiliximab

### PAROLE CHIAVE:

Basiliximab,  
Linfociti T-  
regolatori,  
Self-tolleranza,  
Trapianto renale

### ✉ Indirizzo dell'Autore:

Prof. Carmelo Libetta  
U.O.C. di Nefrologia, Dialisi e  
Trapianto  
Policlinico "S. Matteo"  
27100 Pavia  
e-mail: carmelo.libetta@unipv.it

### INTRODUZIONE

L'impiego prolungato di farmaci immunosoppressori nei pazienti trapiantati di rene provoca un aumento delle complicanze cardiovascolari, infettive e neoplastiche, tutti fattori limitanti l'aspettativa di vita del paziente e dell'organo trapiantato (1). Negli ultimi anni la ricerca in campo trapiantologico si è concentrata sull'identificazione di strategie che permettano l'induzione della tolleranza ovvero l'inibizione del sistema immune del ricevente contro gli antigeni del donatore (2-4). La tolleranza verso il *graft* permetterebbe la riduzione o la sospensione dei farmaci immunosoppressori, con riduzione delle complicanze e l'allungamento della stessa sopravvivenza del *graft* (4).

La tolleranza verso il *self* è controllata da meccanismi molto complessi, al centro dei quali c'è l'attività regolatoria dei linfociti T. In particolare i linfociti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (che esprimono intensamente il cluster 25, recettore dell'IL-2) sembrano essere le cellule induttrici ed effettrici, dell'attività regolatoria. Recentemente la trascrizione del fattore *forkhead* (Foxp3) è stato identificato come un *marker* essenziale e specifico delle cellule T-regolatorie (T-reg) (5). I linfociti T-reg meglio caratterizzati sono i cosiddetti "*natural occurring T-regs*" (n T-regs), una sottopopolazione di linfociti CD4<sup>+</sup> che nasce e si sviluppa nel timo durante il processo di maturazione T-cellulare ed è in seguito normalmente presente nel sangue periferico con la funzione di controllo degli autoantigeni e di prevenzione delle malattie autoimmuni (6). Questi linfociti

esprimono costitutivamente oltre al CD25, il fattore di trascrizione Foxp3 (specifico per queste cellule e implicato nel controllo del loro sviluppo all'interno del timo), e le molecole di superficie CTLA-4, GITR e LAG-3, nonché la citochina TGF- $\beta$  (7).

L'introduzione del basiliximab (anticorpo monoclonale contro il recettore della interleukina 2, CD25), come trattamento di induzione, nei protocolli terapeutici del trapianto di rene effettivamente ha ridotto il numero di episodi di rigetto acuto. Tuttavia non si conosce il suo effetto sulle cellule T-reg e quindi sulla tolleranza (8).

Pertanto scopo di questo studio è stato di analizzare gli effetti della terapia di induzione con basiliximab sull'attività delle cellule regolatorie *in vivo*, di pazienti trapiantati di rene in terapia con regime immunosoppressivo standard: ciclosporina (CsA), micofenolato mofetile (MMF) e steroidi.

## PAZIENTI E METODI

Lo studio è stato condotto su 20 pazienti (14 maschi e 6 femmine) di età media  $47.7 \pm 11.6$  anni, trapiantati di rene (TxR) da donatore cadavere presso l'unità di Nefrologia e Trapianti del Policlinico San Matteo di Pavia. Tutti i pazienti sono stati arruolati dopo aver firmato il consenso informato. I pazienti ricevevano una dose iniziale di CsA di 8 mg/kg/die, dosaggio che era modificato al fine di mantenere i livelli ematici tra 200-250 ng/mL. La concentrazione ematica della CsA era determinata utilizzando metodica con anticorpi monoclonali (TDX, Abbott). Il dosaggio del micofenolato (MMF) era di 1000 mg x 2 die.

Al momento del TxR tutti i pazienti sono stati sottoposti a prelievo di sangue intero (20 mL) prima di essere sottoposti ad intervento di trapianto e prima della somministrazione della terapia immunosoppressiva di induzione (BAS). Tale prelievo è stato ripetuto dopo un mese dal trapianto (Tx 1 m).

## ISOLAMENTO DEI PBMC

Le cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC) sono state isolate dal sangue intero per gradiente di densità ottenuto mediante centrifugazione per 30 minuti a 1500 rpm con *ficoll hypaque* (Sigma, Milano).

## STUDIO DEI T-REG

Il numero dei linfociti T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e Foxp3<sup>+</sup> è stato determinato attraverso la citofluorimetria a flusso. Per ogni campione 1000000 di PBMC sono state studiate mediante una duplice marcatura di

superficie con anticorpi monoclonali CD4-PerCyP e CD25-FITC, era inoltre eseguita marcatura di controllo con IgG-FITC. Per lo studio del Foxp3 è stata utilizzata marcatura intracellulare, previa permeabilizzazione della membrana cellulare, con IgG2a-PE (controllo) e Foxp3-PE. Per tutte le marcature è stato utilizzato un kit commerciale "Human-regulatory T cell staining Kit" (eBiosciences, Saint Diego, CA, USA). Le cellule sono state, infine, analizzate con metodo citofluorimetrico (BD FACSAriaTM, Becton Dickinson).

## ANALISI STATISTICA

Tutti i dati sono espressi come media $\pm$ DS. L'analisi statistica è stata effettuata usando l'analisi della varianza (*software* di STATVIEW per Macintosh). Valori di P<0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

## RISULTATI

Nessun paziente arruolato nello studio ha presentato segni clinici ed istologici di rigetto acuto né ha sviluppato infezioni.

### Cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

I linfociti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> prima del trapianto renale erano  $585.7 \pm 384.5$  dopo un mese tali cellule non erano più rilevabili (Fig. 1).

### Cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>

Come mostrato nella Figura 2, anche i linfociti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> mostrano un andamento simile alle cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, infatti, i linfociti T-reg (BAS  $93.3 \pm 61.1$ ) si azzerano ad un mese dal trapianto.

### Cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>

La Figura 3 mostra il numero dei linfociti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> nei pazienti trapiantati di rene prima e ad un mese dal TxR. Tali cellule al basale risultano  $264.8 \pm 73.1$  mentre ad un mese dal trapianto si riducono significativamente ( $111.2 \pm 57.4$ , p<0.05).

## DISCUSSIONE

La risposta immunitaria è mediata dalla interazione tra APC, cellule T CD4<sup>+</sup> helper (Th) e cellule T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regolatore. Le cellule T-reg contribuiscono al mantenimento della tolleranza sopprimendo la risposta immune (9, 10). Le T-reg originano nel timo duran-

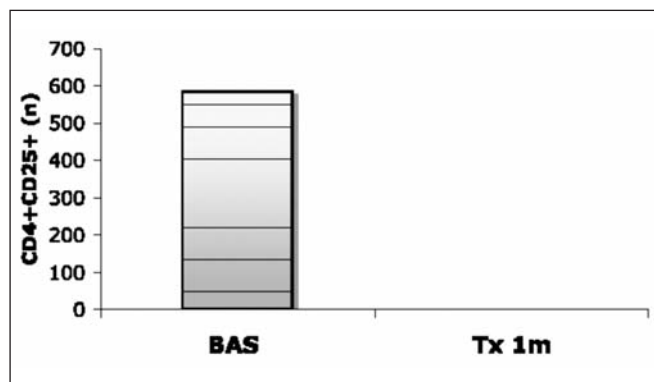


Fig. 1 - Numero di cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nei pazienti TxR, prima (BAS) e dopo un mese (Tx 1 m) dal trapianto di rene.

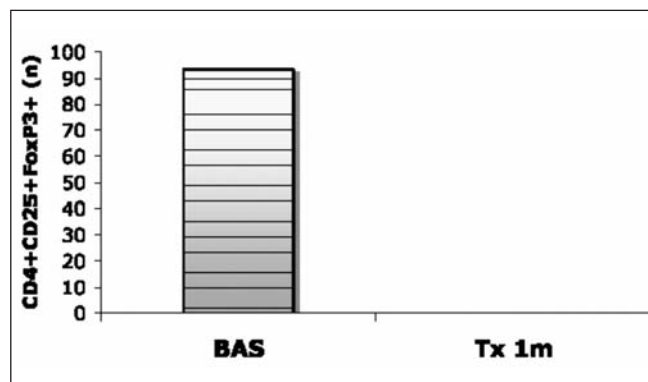


Fig. 2 - Numero di cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nei pazienti TxR, prima (BAS) e dopo un mese (Tx 1 m) dal trapianto di rene.

te l'ontogenesi e rappresentano circa 10% delle cellule CD4<sup>+</sup> periferiche (10).

Numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che la tolleranza al trapianto d'organo dipende dalla formazione di linfociti T con attività regolatrice (11). La ciclosporina sembra avere effetto soppressivo sia *in vitro* che *in vivo*, non solo sul numero, ma anche sulla funzione dei T-reg (12). Studi effettuati su pazienti hanno inoltre riportato che il trattamento con ciclosporina riduce l'espressione del Foxp3 nei T-regs e non è in grado di promuovere la differenziazione del fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, dopo stimolazione alloantigenica (13). La ciclosporina può infine antagonizzare l'induzione della tolleranza anche mediante un altro meccanismo, e cioè bloccando l'anergia delle cellule T ed interferendo con l'apoptosi proliferazione-indotta delle cellule T effettrici (14).

I dati del nostro studio indicano che le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sono completamente sopresse dopo un mese dall'inizio della terapia immunosoppressiva adiuvata dall'induzione con basiliximab, stesso comportamento hanno anche i linfociti T-reg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>). Questi risultati suggeriscono che la terapia di induzione con basiliximab, per la sua azione anti CD25 sopprime completamente i linfociti T (CD25<sup>+</sup>) e conseguentemente la risposta effettrice di tali cellule. L'altra faccia della medaglia è, che sopprime anche le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regolatorie, che si azzerano ad un mese dal trapianto.

Il blocco della trascrizione dell'IL-2 e dell'interazione IL-2/IL-2R da parte degli inibitori della calcineurina e degli anticorpi monoclonali anti-CD25 sopprimono significativamente le cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regolatore. Questi farmaci potrebbero perciò non solo danneggiare la funzione dei nT-regs ma anche impedire l'induzione di linfociti T-reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> allospecifici e pertanto inibire la tolleranza al trapianto (8).

L'espressione elevata del CD25 sui CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> High) è considerata un marker per iden-

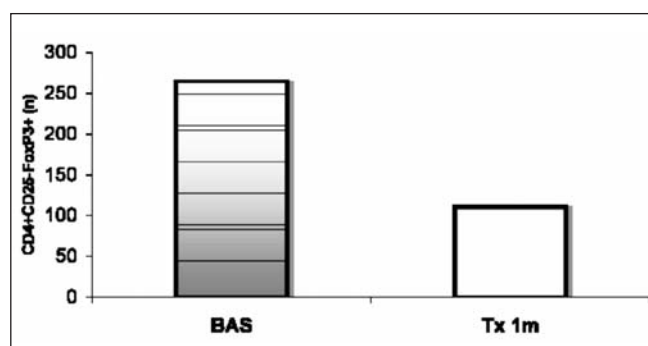


Fig. 3 - Numero di cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nei pazienti TxR, prima (BAS) e dopo un mese (Tx 1 m) dal trapianto di rene.

tificare le cellule regolatorie. Recentemente (15) anche cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> sono state identificate come T-reg, pertanto è stato ipotizzato, che tali cellule possano essere un pool di T-reg non ancora attive, una sorta di riserva, che può essere reclutata, quando opportuno, attraverso la induzione dell'espressione del CD25.

Il nostro studio dimostra per la prima volta, che la sottopopolazione CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>, una popolazione T linfocitaria non effettrice ma regolatoria, si riduce significativamente ad un mese dal trapianto, anche se a differenza delle CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, rimane ben rappresentata. Questo risultato potrebbe indicare che la presenza di un pool di cellule regolatore non differenziate ad un mese dall'inizio della terapia immunosoppressiva, potrebbero rendere possibile la tolleranza nel corso del trapianto. Pertanto studi a medio termine sono necessari per puntualizzare tale aspetto.

In conclusione, i risultati preliminari dello studio suggeriscono che la terapia classica con induzione con basiliximab induce sì una completa deplezione della popolazione T-reg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, ma preserva una parte del pool di linfociti regolatori CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>.

## RIASSUNTO

La tolleranza verso il self è controllata da meccanismi molto complessi, uno dei principali dipende dall'attività regolatoria dei linfociti. In particolare i linfociti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sembrano essere le cellule induttrici ed effentrici, dell'attività regolatoria. Recentemente la trascrizione del fattore forkhead (Foxp3) è stato identificato come un marker essenziale e specifico delle cellule T-regolatorie (T-reg). L'effetto della terapia immunosoppressiva sulle cellule T-reg, non è ancora completamente chiaro. Nei protocolli clinici l'introduzione del basiliximab come trattamento induzione della terapia immunosoppressiva, effettivamente ha ridotto la percentuale di episodi di rigetto acuto, ma non si conosce il suo effetto sulla tolleranza. In questo studio abbiamo analizzato gli effetti, sull'attività delle cellule T-reg in vivo, della terapia di induzione con basiliximab associata al seguente regime immunosoppressivo di mantenimento: ciclosporina, micofenolato mofetile e steroidi. Venti trapiantati di rene da donatore cadavere (14 maschi e 6 femmine) sono stati arruolati nello studio. A tutti i pazienti è stato eseguito un prelievo di sangue intero (20 ml) prima di essere sottoposti ad intervento di trapianto e prima della somministrazione della terapia immunosoppressiva di induzione (BAS), tale prelievo è stato ripetuto dopo un mese dal trapianto (Tx 1 m). Tutti i pazienti arruo-

lati non hanno presentato segni clinici ed istologici di rigetto né hanno sviluppato infezioni. La percentuale ed il numero assoluto dei linfociti T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup> è stata analizzata attraverso la citofluorimetria a flusso con anticorpi CD4-PE, CD25-FITC e Foxp3-PE.

I nostri dati mostrano una completa scomparsa sia delle cellule CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> che di quelle specificamente regolatorie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>, dopo un mese dal trapianto. Invece la sottopopolazione CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> si riduce significativamente in seguito alla terapia immunosoppressiva, ma non scompare.

I dati preliminari di questo studio indicano che le cellule ad attività regolatoria CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> sono completamente sopresse ad un mese dalla terapia immunosoppressiva di induzione con basiliximab. Le cellule ad attività regolatoria CD25<sup>-</sup> risultano invece ridotte ma sono ancora ben rappresentate ad un mese dal trapianto. Questi risultati suggeriscono che la terapia di induzione con basiliximab potrebbe inibire solo una parte dei T-reg (CD25<sup>+</sup>), preservando i linfociti regolatori CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>.

## DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi

## BIBLIOGRAFIA

- Scherer MN, Banas B, Mantouvalou K, et al. Current concepts and perspectives of immunosuppression in organ transplantation. *Langenbecks Arch Surg* 2007; 392: 511-23. Epub 2007 Apr 21.
- Clarkson MR, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation* 2005; 80: 555-63.
- Graca L, Le Moine A, Lin CY, Fairchild PJ, Cobbold SP, Waldmann H. Donor-specific transplantation tolerance: the paradoxical behavior of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10122-6. Epub 2004 Jun 24.
- Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18: 723-37.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005; 22: 329-41.
- Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 458-70. Epub 2006 Jun 29.
- Wan YY, Flavell RA. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; 212: 114-30.
- Baan CC, van der Mast BJ, Klepper M, et al. Differential effects of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation* 2005; 80: 110-7.
- Waldmann H, Adams E, Fairchild P, Cobbold S. Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue. *Immunol Rev* 2006; 212: 301-13.
- Bushnell A, Jones E, Gallimore A, Wood K. The generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells that prevent allograft rejection does not compromise immunity to a viral pathogen. *J Immunol* 2005; 174: 3290-7.
- Adeegbe D, Bayer AL, Levy RB, Malek TR. Cutting edge: allogeneic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells suppress autoimmunity while establishing transplantation tolerance. *J Immunol* 2006; 176: 7149-53.
- Wang H, Zhao L, Sun Z, Sun L, Zhang B, Zhao Y. A potential side effect of cyclosporine A: inhibition of CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells in mice. *Transplantation* 2006; 82: 1484-92.
- Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, Hilbrands LB, Joosten I. Rapamycin, and not cyclosporine A, preserves the highly suppressive CD27<sup>+</sup> subset of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Blood* 2006; 107: 1018-23. Epub 2005 Oct 6.
- Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 1999; 5: 1298-302.
- Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. CD25<sup>-</sup> T cells generate CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol* 2004; 173: 7259-68.