



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Fisiopatologia Dell'Insufficienza renale

Ciclo XXII

LA TERAPIA DI INDUZIONE NEL TRAPIANTO RENALE:
CONFRONTO TRA DIVERSI PROTOCOLLI CON ANTICORPI
MONO E/O POLICLONALI

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Carlo Buzio

Tutor:
Chiar.mo Prof. Salvatore David

Dottorando: Dott. Carlo Jovane

INDICE

INTRODUZIONE

IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI

MHC-STORIA

TCR-MOLECOLE ACCESSORIE-CORECETTORI

CITOCHINE

SINAPSI IMMUNOLOGICA

TERAPIA IMMUNOSSOPPRESSIVA

ANTICORPI MONOCLONALI

ANTICORPI POLICLONALI

SCOPO

MATERIALI E METODI

PAZIENTI E SCHEMI TERAPEUTICI

PARAMETRI BIOUMORALI

ANALISI STATISTICA

RISULTATI

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

FATTORI DI RISCHIO

FUNZIONE DEL GRAFT-EFFETTI COLLATERALI

EVENTI AVVERSI

DISCUSSIONE

CONCLUSIONI

TABELLE-FIGURE-FRAFICI

REFERENZE BIBIOGRAFICHE

INTRODUZIONE

IMMUNOLOGIA DEI TRAPIANTI

MHC-STORIA

Il trapianto è una procedura chirurgica con cui si prelevano organi e tessuti (l'organo trapiantato è comunemente indicato col termine di "Graft") da un Donatore (cadavere o vivente) e s'impiantano in un Ricevente. Se il trapianto è posizionato in sede anatomica, la procedura è chiamata trapianto ortotopico, in sede non anatomica, trapianto eterotopico. Il trapianto di rene è un trapianto eterotopico.

Il numero di trapianti è costantemente aumentato negli ultimi 40 anni; attualmente negli USA si eseguono circa 15.000 trapianti di rene/anno (nel 2010 sono stati eseguiti 14088 trapianti di rene, di cui 5201 da donatore vivente)¹. Il limite maggiore per il successo di un trapianto è la risposta immunitaria del ricevente verso il donatore.

Tale problema si presentò per la prima volta durante i tentativi di sostituire la cute lesa di pazienti ustionati con cute di donatori occasionali; tali tentativi si rivelarono fallimentari; la cute trapiantata, in 2 settimane, andava incontro a necrosi; Peter Medawar e al. cominciarono a studiare i trapianti di cute in modelli animali²⁽²⁻¹⁰⁾. Il fallimento della cute trapiantata era causato da una reazione di tipo infiammatorio chiamata *rigetto*.

¹ <http://optn.transplant.hrsa.gov/latestData/rptData.asp>

² Peter Brian Medawar (1915 - 1987). Biologo brasiliano naturalizzato britannico, premio Nobel per la medicina nel 1960, insieme a Frank Macfarlane Burnet, per i suoi lavori su come il sistema immunitario rigetta gli organi trapiantati.

La scoperta e la comprensione dei geni d'istocompatibilità, il cosiddetto locus genico MHC (Major Histocompatibility Complex), ha permesso di stabilire sia l'esistenza di caratteri geneticamente ereditabili, sia l'esistenza di specifiche reazioni immunologiche alla base dei rigetti di organi e/o tessuti trapiantati. Come sappiamo, alcuni geni sono rappresentati da un'unica sequenza di DNA in una medesima specie, detti *geni non polimorfi* la cui sequenza genica (wild-type) è presente su entrambi i cromosomi di ogni individuo. Altri geni sono presenti in una forma variante, detti *geni polimorfi* e ogni variante comune è chiamato allele. Il locus MHC è costituito dai geni più polimorfi presenti nel genoma di tutte le specie analizzate, i cui prodotti sono espressi sulle superfici di molti tipi cellulari.

Questo locus fu scoperto negli anni '40 da George Snell durante lo studio dei rigetti di trapianti di lembi di cute tra ceppi di topi inbred.³⁽¹¹⁻¹⁷⁾. Gli esperimenti dimostrarono che i trapianti tra topi di ceppi inbred erano "accettati", mentre i trapianti tra ceppi inbred diversi (outbred - non consanguinei) erano rigettati. Il riconoscimento di un trapianto come estraneo "non self", dipendeva da un carattere genetico ereditario. I geni responsabili del riconoscimento come "*self o non self*" di un tessuto trapiantato furono chiamati Geni d'istocompatibilità. Fu identificato il

³ George Davis Snell (1903 - 1996). Biologo e zoologo statunitense, premio Nobel per la medicina nel 1980, insieme al marocchino Baruj Benacerraf e al francese Jean Dausset, per la scoperta del complesso maggiore di istocompatibilità. Snell utilizzò ceppi di topi inbred (facendo accoppiamenti tra fratello-sorella per 20- 30 generazioni successive) così da ottenere topi con sequenze geniche identiche in tutti i loci; sono omozigoti in ogni locus e ogni topo è geneticamente identico (**singenico**) ad ogni altro topo dello stesso ceppo; esprimono un allele dei geni polimorfi della popolazione originale. I diversi ceppi possono esprimere alleli differenti e sono detti **allogeni** l'uno rispetto all'altro.

locus genico responsabile dei rigetti sul cromosoma 17, che codifica per un antigene polimorfo del gruppo sanguigno chiamato antigene II°, il locus genico fu chiamato Locus H2. Nel corso degli esperimenti, i geni polimorfici individuati risultarono numerosi, diversi, ma strettamente legati e la regione genica in cui mappavano fu chiamata MHC.

Per quasi vent'anni, al locus MHC fu attribuito unicamente il ruolo di regolazione dei rigetti dei tessuti, senza capire quale altro ruolo avesse nella regolazione immunitaria. Negli anni '60-'70 fu scoperto che i geni MHC avevano un ruolo principale per tutte le risposte immunitarie verso gli antigeni proteici estranei "non self" con cui un organismo viene a contatto continuamente; ciò giustificava il perché il locus MHC si sia lungamente preservato durante l'evoluzione, indipendente dal trapianto d'organo.

Nel 1972 Baruj Benacerraf⁴⁽¹⁹⁻²³⁾ e Hugh McDevitt scoprirono che diversi ceppi inbred di topi differivano nella capacità di produrre anticorpi contro semplici peptidi, tale responsività era legata a geni ereditati come carattere dominante mendeliano. Tali geni furono chiamati geni della risposta immune IR, mappati nel locus MHC.

Con questa scoperta Benacerraf creò una nuova prospettiva per l' MHC.

Negli anni seguenti, la tipizzazione HLA avrebbe introdotto il concetto dell'immunogenetica nella medicina clinica, individuando in tal modo

⁴ Baruj Benacerraf (1920). Fisiologo e immunologo marocchino naturalizzato statunitense, nato in Venezuela da genitori sefarditi di origine marocchina.
Hugh McDevitt. Professore Emerito, Microbiologia & Immunologia, Emerita Facoltà, Acad Council, Stanford Medicine.

diversi modelli associati alle malattie.

Oggi sappiamo che i geni IR sono i medesimi geni dell'MHC che codificano per le molecole (Antigeni) MHC.

Nello stesso periodo Jean Dausset⁵ cominciò a studiare le reazioni immunitarie anche nell'uomo; i pazienti, che avevano rigettato il rene trapiantato o vittime di reazioni trasfusionale ai leucociti, sviluppavano Anticorpi (Ab) circolanti vs gli Antigeni (Ag) leucocitari del donatore, detti appunto allo-anticorpi. Tali antigeni, espressi sui leucociti, sono stati chiamati Antigeni leucocitari Umani (HLA).

I primi 3 geni, studiati sierologicamente, furono chiamati HLA A B C. Col test della Reazione Leucocitaria Mista (MLR) furono identificati ulteriori geni in una regione adiacente alla regione HLA sierologicamente definita; il primo fu chiamato HLA D, la cui molecola fu chiamata HLA DR (D related), gli altri 2 gruppi di molecole codificate furono chiamate HLA DQ e DP. Queste proteine furono chiamate Antigeni MHC.

Le varianti alleliche di questo locus aumentano di anno in anno: attualmente MHC è considerato il locus genico più polimorfo nel genoma di tutte le specie analizzate⁶, tanto che c'è solo una probabilità su dieci milioni di trovare 2 individui HLA identici.

Le successive decadi portarono un'immensa mole di informazioni sul funzionamento della rete immunitaria cellulare. Markers cellulari di

⁵ Jean Dausset (Tolosa, 1916 - 2009). Fisiologo e immunologo francese naturalizzato statunitense, premio Nobel per la medicina nel 1980, insieme a Baruj Benacerraf e George Davis Snell, per la scoperta del complesso maggiore di istocompatibilità[1].

⁶ Ad oggi gli alleli HLA A sono 28; HLA B sono 50; HLA C sono 10; HLA DP sono 20; HLA DQ sono 21 HLA DR sono 45. Gli alotipi >3000. Genotipi nell'ordine 10⁶.

superficie sono stati descritti su linfociti, macrofagi e cellule endoteliali, conducendo al sistema CD (Cluster of Differentiation, da CD1 a oltre CD100). Sono state scoperte più di 100 citochine, implicate nelle interazioni cellulari e nell'infiammazione dei tessuti. La caratterizzazione dei linfociti timo-derivati coinvolti nel riconoscimento antigenico MHC-relato, vale a dire le cellule T, progredì rapidamente in seguito alla clonazione di diversi tipi di recettori cellulari T.

Con il test della reazione leucocitaria mista (MLR), ottimo modello di rigetto di trapianto in vitro, furono scoperte le due sottopopolazioni di linfociti T che riconoscono diverse molecole MHC:

- I linfociti T helper CD4⁺, specifici per gli antigeni MHC di classe II (HLA-DR-DQ-DP).
- I linfociti T CTL CD8⁺, specifici per gli antigeni MHC di classe I (HLA-A-B-C)

L'Antigene MHC I Fig.1 È un peptide formato da una catena pesante α , una catena leggera β , legata non covalentemente con la porzione extracellulare della catena α , chiamata β_2 - μ globulina. È su quasi tutte le cellule nucleate.

L'Antigene MHC II Fig. 2 È un peptide formato da due catene pesanti, α e β associate non covalentemente. Sono espresse su i linfociti B, macrofagi, cellule dendritiche, c. endoteliali.

Le cellule, che esprimono MHC sulla loro superficie e che sono in grado di processare gli Antigeni peptidici estranei "non self", sono chiamate Cellule presentanti l'Antigene (APC). Il recettore presente sui T linfociti

che riconosce i peptidi processati dalle APC prende il nome di Recettore dei linfociti T (TCR)

TCR e molecole accessorie co-stimolatorie.

È un complesso peptidico di superficie formato da un eterodimero (1α , 1β), legate covalentemente al CD3 (formato dalle catene γ δ ϵ) e da un omodimero costituito da 2 catene ζ Fig. 3. Il CD3 e le due catene ζ sono peptidi accessori che favoriscono i segnali di trasduzione citoplasmatici. L'eterodimero riconosce il complesso "MHC-peptide" sulla superficie delle APC.

Corecettori e molecole di adesione

Sulla superficie dei T linfociti esistono numerose altre proteine integrali dette "Molecole co-stimolatorie" che legano specifici recettori presenti sulle APC, per la trasduzione del segnale citoplasmatico all'interno dei T linfociti. Sono anche utili marcatori di superficie per l'identificazione immuistochimica di linfociti. Vengono descritti brevemente solo alcuni di essi, in quanto direttamente o indirettamente implicati nell'area trapiantologica.

- CD4/CD8. Sono glicoproteine transmembrana appartenente alla superfamiglia delle Ig Il CD4 è un monomero con 4 domini Ig extracellulare Il CD8 è un eterodimero con 2 catene α e β .
- CTLA-4 (CD 152). È una proteina di membrana omologa a CD28. Lega

B7 1 e B7 2, con funzione di regolatore negativo per i linfociti T attivati.

- CD40L (CD154) È un peptide trimerico omologo al TNF, espresso sulla superficie dei T linfociti Attivati. Si lega al CD40 (espresso sulle APC) e promuove l'espressione di B7 sulle APC e sui B linfociti. Ciò favorisce il legame tra linfociti T e B, aumentando ulteriormente l'attivazione dei T linfociti.
- CD40. È un peptide trimerico, appartenente alla famiglia dei recettori per il TNF. È espresso costitutivamente sui B linfociti.
- Integrine. Sono le molecole di adesione, peptidi di membrana eterodimeriche $\alpha \beta$, identificate in più di trenta varianti. Hanno la capacità di rispondere a segnali intracellulari, in risposta alle chemochine, e aumentano l'avidità del T linfociti ai ligandi (superficie endoteliale/matrice extracellulare); in base alla catena β utilizzata sono classificate in due sottofamiglie:
 1. β 1-VLA-(Very-Late-Antigens)-CD49a-fCD29. Tutte condividono il CD29; legano diverse molecole di membrana. La maggior parte è espressa sui leucociti e mediano l'adesione alle proteine della matrice extracellulare.
 2. β 2-LFA1, CD11a-cCD18. Identificate mediante l'uso di anticorpi monoclonali, favoriscono l'adesione dei T linfociti alle APC e all'endotelio vascolare. Espressa sul 90% dei T linfociti maturi, si lega a ICAM 1 (CD54), espressa su molti tipi cellulari, c. emopoietiche, c. endoteliali; altri ligandi sono ICAM 2 (endotelio) e ICAM 3 (linfociti).

Le citochine

Le citochine sono proteine prodotte dal sistema immunitario in risposta a microorganismi e ad altri antigeni, con funzioni regolatorie di tipo immunitario e infiammatorio. Molte di esse sono prodotte dai leucociti e su queste stesse cellule esercitano i loro effetti e per questo motivo sono chiamate anche *Interleuchine*. Sarà descritta solo IL-2, essendo coinvolta direttamente nella risposta immunitaria verso un organo estraneo (non self) trapiantato.

Interleuchina 2 IL-2_{Fig. 4.} È una glicoproteina globulare con 4 domini ad α elica. L'attivazione dei T linfociti provoca la trascrizione genica, la sintesi e secrezione di IL-2. I linfociti T secernono IL-2 nella sinapsi immunologica, tra APC e T linfociti, dove si localizzano anche i recettori dell'IL-2, così da raggiungere concentrazioni ottimali per innescare la risposta cellulare.

Il recettore per IL-2 (IL-2R)_{Fig. 5.} È un trimero costituito da 3 catene peptidiche trans-membrana associate non covalentemente:

- ✚ IL-2R α (CD25)
- ✚ IL-2/15R β (CD122)
- ✚ γ c (catena γ comune CD64)

IL-2 si lega con bassa affinità alla catena α , senza nessuna risposta biologica; solo dopo il legame con le altre due catene, si attivano le vie di trasduzione. La seconda catena - IL-2/15R β - attiva il segnale di Jak3/STAT5, legandosi anche a IL-15. La terza catena - Γ c - , condiviso con i recettori per IL-4, IL-7, IL-15, contribuisce sia a creare il legame ad

alta affinità di IL2, sia ad attivare la traduzione della via MAPK/PI-3K.

IL-2 è un fattore di crescita di tutti i T linfociti, garantisce sia la proliferazione e differenziazione delle cellule NK, sia proliferazione e sintesi di anticorpi da parte delle plasmacellule.

Formazione della sinapsi Immunologica Fig. 6.

La regione di contatto del linfocita T con le APC è identificata con il nome "Sinapsi Immunologica", o SMAC (SupraMolecular Activation Cluster). Sono rapidamente reclutate verso il centro della Sinapsi (c-SMAC) le molecole del complesso TCR (TCR, CD3, catene ζ), i linfociti CD4, CD8, CD28, le proteine adattatrici citoplasmatiche dei recettori di membrana. A tale livello la distanza tra le membrane citoplasmatiche delle APC e del linfocita T è di 15 nm. Le integrine rimangono nella regione periferica della sinapsi, dove stabilizzano tale legame e formano la p-SMAC (periferical SMAC) dove, in una distanza intercellulare di 40 nm, viene prolungata l'interazione tra le molecole di adesione coinvolte, così da sostenere il segnale di trasduzione cellulare. La S.I. rappresenta anche il sito preferenziale per la degradazione delle molecole coinvolte nella trasduzione del segnale, mediante il processo di ubiquitazione.

Immunosoppressione e farmaci utilizzati.

L'immunosoppressione è il principale approccio per pervenire e trattare il rigetto del trapianto. Gli attuali protocolli terapeutici hanno radicalmente migliorato la sopravvivenza dei trapianti. Prima della ciclosporina, il tasso

di sopravvivenza a 1 anno del trapianto di rene era del 50-60% da donatore cadavere. Con uso di ciclosporina e MMF tale sopravvivenza è diventata superiore al 90% ⁷⁽¹⁾.

Tra i farmaci utilizzati nella pratica clinica:

1. Inibitori della calcineurina (Ciclosporina /FK 506- Tacrolimus). La ciclosporina è un peptide ciclico, legata alla ciclofillina citoplasmatica, inibisce la calcineurina (fosfatasi calcio-calmodulina-dipendente) e l'induzione di NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) per la trascrizione del gene di IL-2. FK 506 è un macrolide che funziona in modo analogo, ma si lega a FKBP: tale complesso va a legarsi alla calcineurina inibendone l'attività.
2. Inibitori del mTOR (mammalian Target of Rapamycin) - Rapamicina. Interagisce con FKBP, ed il complesso formato si lega a mTOR, - una serina/treonina chinasi - necessaria per la traduzione delle proteine per la differenziazione cellulare, inibendolo.
3. Antimetaboliti - Azatioprina-Micofenolato Mofetile. La prima induce inibizione della maturazione dei linfociti, oggi poco utilizzata per l'elevata tossicità midollare. Il più recente Micofenolato mofetile è anch'esso un antimetabolita, agisce bloccando un'isoforma linfocita-specifica dell'inosina deidrogenasi monofosfato, un enzima per la sintesi de novo dei nucleotidi della guanina. Poco effetti tossici per la sua azione selettiva linfocitaria.

⁷ Transplant Patient Datasource, United Network for Organ Sharing, Richmond Va. Estratta dal sito <http://207.239.150.13/tpd/>.

4. Corticosteroidi. Bloccano la sintesi e secrezione di molte citochine, tra cui il TNF, IL-1; riducono l'attivazione delle cellule endoteliali del trapianto ed il reclutamento dei leucociti infiammatori. Inibiscono il sistema delle prostaglandine e reattivi di Ossido Nitrico.
5. Nuovi farmaci antiinfiammatori come FTY720, legano e bloccano i recettori per la sfingosina 1 fosfato sui linfociti. Questo fosfolipide è coinvolto nella fuoriuscita dei linfociti dagli organi linfoidi.
6. Agenti bloccanti le vie co-stimolatorie delle cellule T. CTLA-4-Ig, una proteina di fusione formata dal dominio extracellulare di CTLA4 e dalla porzione Fc delle IgG umane. Lega B7-1 e B7-2. con inibizione dell'attivazione dei T linfociti; in fase sperimentale per psoriasi, morbo di Crohn e il controllo del rigetto.
7. Anti-CD40L. Inibisce l'attivazione dei macrofagi e dell'endotelio bloccando il legame di CD40L sui linfociti T con CD40 sui macrofagi/B linfociti (sperimentale).

Anticorpi monoclonali

Gli anticorpi sono proteine circolanti, prodotte in seguito all'esposizione ad agenti estranei detti antigeni. Sono incredibilmente diversi e specifici nel riconoscere antigeni estranei e sono i principali mediatori dell'immunità umorale in confronti di un ampio spettro di microbi.

Nel 1890 Behring e Kitasato⁸ dimostrarono che alcune tossine inattivate potevano indurre immunità protettiva quando iniettate in un animale e che la protezione poteva essere trasferita ad altri animali iniettando il siero degli animali immunizzati. Gli studi condotti sul mieloma multiplo, un tumore monoclonale plasmacellulare, produttore di grandi quantità di anticorpi identici, ha dato via ad una serie di filoni di ricerca per la produzione degli anticorpi monoclonali, a scopo terapeutico. La tecnica per produrre anticorpi monoclonali, tuttora utilizzata, fu descritta da G. Köhler e C. Milstein nel 1975⁹.

L'incomparabile specificità degli anticorpi monoclonali, unita alla loro relativamente facile produzione e alla possibilità di averne scorte pressoché inesauribili, li rende interessanti strumenti in campo

⁸ Emil Adolf von Behring (1854 - 1917). Fisiologo e batteriologo tedesco, premio Nobel per la medicina nel 1901 per le sue scoperte, insieme al giapponese Shibasaburo Kitasato, dei sieri antidifteritico e antitetanici. Nel 1880, mentre lavorava con Kitasato nel laboratorio di Robert Koch all'istituto d'igiene di Berlino, Behring rese un animale temporaneamente immune dalla difterite o dal tetano iniettandone siero sanguigno di un altro animale infettato da tali germi. Dimostrò che questo siero aveva proprietà sia preventive sia curative, in grado di provocare la guarigione, se viene iniettato ai primi sintomi della difterite o del tetano. Nella notte di Natale del 1891, in un ospedale di Berlino, un bambino veniva salvato per la prima volta dal siero antidifterico di Behring. Aveva così inizio la sieroterapia che dalla difterite e dal tetano si è estesa alla cancrena gassosa, al botulismo, al morso della vipera, al morbillo ed alla pertosse. Il siero conferisce un'immunità passiva perché contiene le sostanze (anticorpi) che prevengono o combattono la malattia, mentre il vaccino conferisce un'immunità attiva perché promuove, a scopo preventivo la formazione degli anticorpi; nel 1889 diventò assistente di Koch. Nel 1894 tenne la cattedra di igiene ad Halle e dal 1895 a Marburgo.

Shibasaburo Kitasato (北里 柴三郎) (1853 - Nak1931). Medico e batteriologo giapponese. Nel 1889 insieme ad Emil Adolf von Behring è il primo ad isolare il bacillo del tetano, mentre nel 1890 sviluppa una antitossina per la difterite e l'antrace. Nel 1894, durante un'epidemia di peste ad Hong Kong, isola la *Pasteurella pestis*, così chiamato in onore di Louis Pasteur. Intanto però il medico svizzero Alexandre John-Émile Yersin lo stesso anno ottiene indipendentemente gli stessi risultati, ma è solo in onore di quest'ultimo che il batterio della peste viene ribattezzato *Yersinia pestis*.

⁹ César Milstein (1927 - 2002). Biochimico argentino naturalizzato britannico, premio Nobel per la medicina nel 1984, insieme all'immunologo Niels Jerne e a Georges Köhler, per aver inventato una tecnica per la produzione di anticorpi monoclonali. George Jean Franz Köhler (1946 - 1995) è stato un biologo tedesco.

Nel 1975 G. Köhler e C. Milstein ottengono anticorpi coltivando in provetta le cellule del sistema immunitario che li producono (linfociti), opportunamente fuse con cellule tumorali di mieloma. La tecnica utilizzata era basata sull'assunto che le plasmacellule (B linfociti attivati) producono anticorpi specifici, ma non sono immortali. L'immortalizzazione si ottiene mediante fusione cellulare o ibridazione somatica tra i linfociti B e le cellule mielomatose; tali cellule sono le migliori partner di fusione perché tendono a fondersi e a dare origine a ibridi stabili. Tali cellule mielomatose sono rese difettive, con tecniche di mutagenesi, di alcuni geni necessari alla sintesi del DNA; in particolari terreni di coltura, HAT (Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidina), non potrebbero sopravvivere se non fuse con i B linfociti che forniranno gli enzimi necessari alla sintesi del DNA e alla crescita cellulare. Gli ibridi generati sono coltivati in terreni HAT, dove cresceranno solo gli ibridomi produttori degli anticorpi monoclonali. Attualmente gli ibridomi sono prodotti fondendo mielomi murini sensibili ad HAT con i linfociti B ottenuti dalla milza o dai linfonodi di diverse cavie (topi, ratti criceti) immunizzate per un certo antigene.

biochimico; in campo terapeutico, essi rappresentano di gran lunga la più grande categoria di sostanze biofarmaceutiche attualmente in studio, e centinaia di queste preparazioni si trovano correntemente sotto sperimentazione. Negli anni '80 si è focalizzata l'attenzione sul loro uso sia come agenti traccianti (diagnostica per immagini) o come diretti agenti terapeutici. I primi studi sono stati concentrati sul cancro, ma i preparati di anticorpi monoclonali sono usati in una gran varietà di campi della medicina. Le applicazioni cliniche degli anticorpi monoclonali in commercio prevedono.

- + Immunizzazione passiva.
- + Diagnostica per immagini (es. cancro, malattie infettive, patologie cardiovascolari).
- + Terapia del cancro e delle patologie cardiovascolari
- + Diagnosi di gravidanza e di malattie a trasmissione sessuale.
- + Purificazione di prodotti industriali.
- + Prevenzione dei rigetti nei trapianti di organi.

L'anticorpo monoclonale del topo (murino) OKT-3 (anti CD3) fu il primo ad essere approvato dalla Food and Drug Administration americana come agente immunosoppressore per il trapianto nell'uomo. Si lega al CD3 e promuove la fagocitosi o la lisi complemento mediata. L'immunosoppressione effettuata con questi mezzi è stata accettabilmente efficace, anche se, come previsto, non mancarono effetti secondari come febbre ed eruzione cutanea.

Gli anticorpi monoclonali murini inducono una risposta immunitaria

quando somministrati agli umani; nella maggior parte dei casi una singola dose di anticorpi monoclonali murini provoca una risposta immunitaria nel 50-80% dei pazienti, con formazione di anticorpi umani anti murini (HAMA) entro 14 giorni dalla somministrazione. Per ovviare al problema dell'immunogenicità, si potrebbe ricorrere all'uso di anticorpi monoclonali di origine umana, cosa possibile ma difficile. I linfociti umani B, possono potenzialmente essere resi immortali, per mezzo di trasformazione da infezione da virus di Epstein-Barr (EBV), oppure ancora per mezzo di una fusione con anticorpi monoclonali.

La tecnologia del DNA ricombinante ha fornito un metodo alternativo per ridurre l'immunogenicità innata degli anticorpi monoclonali murini. Sono stati clonati i geni di tutti i sottotipi di immunoglobuline umane, ciò ha permesso la produzione di vari anticorpi ibridi ad immunogenicità ridotta. Il primo metodo impiegato per ridurre l'antigenicità di un anticorpo monoclonale murino ha previsto l'uso di geni "chimerici" che codificavano proteine in cui le regioni variabili degli anticorpi murini erano fuse con le regioni costanti di un anticorpo umano: l'anticorpo chimerico conservava la specificità di legame ma assomigliava maggiormente a un anticorpo umano naturale (Fig. 7).

Gli anticorpi monoclonali chimerici sono significativamente meno immunogenici, hanno una prolungata emivita sierica, permettono l'attivazione di varie funzioni mediate dalla regione Fc.

Rituximab- Mabthera®.

È un anticorpo monoclonale chimerico specifico per il CD20, molecola di superficie espressa sui B linfociti inattivati, assente sulle plasmacellule. Agisce con citotossicità anticorpo e complemento mediata e meccanismi di apoptosi per eliminare i B linfociti CD20+. Non agendo direttamente sulle plasmacellule, il Rituximab non ha alcun effetto sugli anticorpi circolanti, per questo motivo viene usato in combinazione. Fino a 2 anni dopo la somministrazione (singola dose), si assiste a completa scomparsa delle cellule B memoria (CD27+). È utilizzato in molte patologie autoimmunitarie, nei linfomi B non-Hodgkin, nei protocolli di desensibilizzazione per i pazienti iperimmuni in attesa di trapianto d'organo.

I protocolli di desensibilizzazione in pazienti in lista trapianto sono principalmente due:

- Immunomodulazione con uso di Immunoglobuline (Ig) ev ad alte o basse dosi e Rituximab.
- Rimozione con l'uso di varie tecniche di plasmaferesi e Immunoassorbimento.

Le tecniche di rimozione sono praticabili solo nell'ambito di donatori viventi, con intervento programmabile, a causa del rapido rebound degli anticorpi anti HLA donatore specifici (DSA).

L'uso di Ig vena ad alte dosi (infusioni/mensili ripetute per più cicli a 2gr/Kg di p.c.) è stato introdotto dal Cedars-Sinai Medical Center di Los

Angeles negli anni '90^(25,26). Numerose sono le osservazioni cliniche dimostranti un effetto immunomodulatorio delle preparazioni di Ig in malattie autoimmunitarie con inibizione dei geni di citochine infiammatorie, inibizione del complemento, attività anti TCR; inibizione su APC di CD19,CD40,ICAM-1,CD86; Apoptosi dei B linfociti. In molti studi si è dimostrato che la combinazione con Ig ad alte dosi con tecniche di rimozione sono efficaci nella desensibilizzazione dei pazienti con DSA circolanti e nella rimozione /inibizione delle emoagglutinine nel caso di trapianti ABO incompatibili.

Il lavoro di Vo del 2008⁽²⁶⁾ ha dimostrato che la somministrazione combinata di rituximab e Ig ev ad alte dosi, permette una desensibilizzazione molto rapida, con una riduzione del numero di infusioni, in una gestione del trapianto sia da donatore vivente sia da cadavere.

Basiliximab-Simulect®

È un anticorpo chimerico, costituito da una parte Variabile legante l'antigene di origine murina e una parte Costante di origine umana. Questo chimerismo rende l'anticorpo non immunogeno. Presenta un'alta affinità per IL-2R α (CD 25). Dopo somministrazione si assiste alla completa scomparsa dei linfociti CD25⁺ che identificano solo i Linfociti T attivati. Ha una lunga emivita, prevede la somministrazione di due sole dosi, 20 mg il giorno dell'intervento, 20 mg al 4° giorno, ottenendo la scomparsa dei linfociti T CD25⁺ per 40 giorni⁽²⁸⁻²⁹⁾. Vari sono i meccanismi

d'azione proposti tra cui lisi cellulare citotossica, apoptosi, modulazione del IL-2R tramite down-regulation.

Anticorpi policlonali (ATG) e sieri anti-leucocitari

Le conoscenze delle proprietà immunologiche di un siero antileucitario risalgono al 1899, anno in cui Elie Metchnikoff¹⁰, un immunologo Russo, descrisse per la prima volta gli effetti di tale siero; egli osservò che tale siero era capace di agglutinare e distruggere i leucociti dei ratti. Per le applicazioni all'uomo, furono usati i sieri anti-leucocitari di diverse specie di animali (cavalli, capre, pecore conigli), fin quando non si dimostrò che il siero di coniglio era il più adatto.

In commercio esistono almeno 2 varianti di IG antilinfocitarie.

1. Thymoglobuline® (Rabbit anti/human thymocyte immunoglobulin) Genzyme
2. ATG Fresenius S® (Rabbit anti-human T-lymphocyte globulin) Fresenius

Le prime sono preparate dopo immunizzazione di conigli (Nuova Zelanda e California) con estratti di timo umano, ottenuto da donatori pediatrici. Vengono isolate solo le IgG1 il cui Fc è altamente affine con FcR umano.

Le ATG Fresenius S (T-Lymphocyte Globulin) sono un concentrato, altamente purificato, di anticorpi, IgG e IgM, prodotte dai conigli immunizzati con le Jurkat cell line¹¹. Gli anticorpi policlonali sono usati

¹⁰ Il'ja Il'ič Mečnikov (1845 - 1916) Biologo russo. Tra i suoi meriti più importanti vi è la scoperta del meccanismo della fagocitosi, grazie al quale vinse il Premio Nobel per la Medicina nel 1908 assieme a Paul Ehrlich.

¹¹ Jurkat cells are an immortalized line of T lymphocyte cells that are used to study acute T cell leukemia, T cell signaling, and the expression of various chemokine receptors susceptible to viral entry, particularly HIV. Jurkat cells are also useful in science because of their ability to produce interleukin 2. Their primary use, however, is to determine the mechanism of differential susceptibility of cancers to drugs and radiation. The Jurkat cell line (originally called JM) was established in the late 1970s from the peripheral blood of a 14 year old boy with T cell

principalmente per la profilassi e la terapia dei trapianti di organi solidi (Rene, Pancreas, Cuore, Polmoni, Fegato), ma anche in trapianto di midollo osseo, disordini genetici delle cellule staminali, anemia aplastica, sindromi mielodisplasiche, graft -versus-host-disease. Sono delle immunoglobuline IgG, non cross-reattive versus eritrociti, le proteine plasmatiche, le membrane basali glomerulari.

Le ATG agiscono a vari livelli:

- Adesione endoteliale. In risposta a stress ossidativi, come i tempi di ischemia fredda dell'organo da trapiantare, vengono prodotte $TNF\alpha$ o IL-6, con attivazione dell'adesione endoteliale. Le ATG inibiscono tal effetto a differenza degli Ab monoclonali⁽³⁸⁾. L'incubazione con ATG Fresenius S sgretola il muro di adesione linfocitaria sull'endotelio.
- Blocco del legame TCR/MHC. Blocco de segnali co-stimolatori di CD28, CD40, CD80, CD86, CTLA4; Inibizione dell'attivazione dei segnali di CD69 e CD71 (recettore della transferrina), con riduzione dei livelli di IL $I\beta$, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$.
- Induzione di apoptosi.
- Riduzione della sottopopolazione linfocitaria. A due giorni i CD3 CD2 CD4 e CD8 si riducono per tutta la durata della terapia induttiva. Si assiste a inversione rapporto CD4/CD8 fino a 66 mesi da trapianto. Temporanea riduzione dei GB e delle PLT.

leukemia. Different derivatives of the Jurkat cell line can now be obtained from cell culture banks that have been mutated to lack certain genes.

SCOPO

Il presente lavoro consiste in un'analisi retrospettiva dei pazienti sottoposti a trapianto renale presso Università dell'Insubria e Azienda Ospedaliera "Fondazione Macchi" in Varese, dal 01-01-2009 al 01-12-2010, con particolare riferimento ai diversi protocolli di terapia di induzione.

Sono stati analizzati i principali dati demografici del donatore, del ricevente e i risultati in termini di sopravvivenza, rigetti, effetti indesiderati.

MATERIALI E METODI

Pazienti e schemi terapeutici

Il numero totale dei pazienti trapiantati è 92.

Tutti i pazienti sono stati divisi in quattro gruppi in base alla terapia d'induzione loro somministrata *Tabelle 1a,b,c,d*.

- I. 32 pazienti con doppia induzione con anticorpo monoclonale (Basiliximab) e anticorpi policlonali (ATG Fresenius S).
- II. 26 pazienti con singola induzione con anticorpo monoclonale (Basiliximab).
- III. 19 pazienti senza induzione con anticorpi mono/policlonali.
- IV. 15 pazienti con singola induzione con anticorpi policlonali (Thymoglobuline).

La terapia immunosoppressiva di mantenimento (*Tabella 1e*), ha previsto, per tutti i pazienti, l'uso di metilprednisolone, a dosaggio di 16 mg dal V° giorno di trapianto con dosaggio a scalare progressivamente a 8 mg-4 mg-2mg fino alla completa sospensione alla termine del 3° mese. L'uso di ciclosporina (Cya) a dosaggio di 4 mg/Kg/die dal giorno 0, refratta in due somministrazioni giornaliere, mantenendo un trough level a 2h (C2) di 600-800 ng/ml per il primo mese, scalando la dose secondo i livelli di C2 (400-500 ng/ml); l'uso di everolimus dal giorno 1 a dosaggio di 0,75 mg x 2/die, con trough level 5-10 ng/ml. FK-506 a dosaggio di 0,1 mg/kg/die dal giorno 0 refratto in due somministrazioni giornaliere, con trough level

di 10-12 ng/ml per il primo mese, scalando la dose fino a raggiungimento di t.l. 6-8 ng/ml dal secondo mese in poi. L'uso di Micofenolato Mofetile a dosaggio di 1 gr x 2/die per i primi 14 giorni, di 500 mg x 2/die da 15 giorno come dose di mantenimento. Il Sirolimus è stato somministrato a dosaggio di 4 mg/die per i primi 5 giorni, continuando secondo t.l. (6-10 ng/ml). Generalmente le associazioni farmacologiche hanno previsto la Cya con Everolimus; il Tacrolimus con MMF; il sirolimus in genere con basse dosi di Cya. Il MMF è stato associato anche alla cya o in aggiunta come terzo farmaco (CCS+ inibitore calcineurino + MMF).

Dosaggi dei parametri bioumorali.

La funzionalità del rene trapiantato è stata valutata con il dosaggio della Creatinemia nei giorni 0, 1, 7, 15, in dimissione, all'ultimo follow-up del post trapianto.

Sono stati valutati gli effetti collaterali ematologici con dosaggio delle piastrine, dei globuli bianchi; sono stati analizzati i casi di leucopenia, linfopenia (con il dosaggio delle sottopopolazioni linfocitarie) e di trombocitopenia.

La leucopenia è definita con il n. totale di leucociti $< 4000/\text{mm}^3$.

La trombocitopenia, è definita come n. totale di piastrine $< 100.000/\text{mm}^3$.

La linfopenia è definita come n. totale di linfociti $< 1000/\text{mm}^3$.

Nei giorni 0, 1, 5, 7, 10, 15, in dimissione, 1 mese 3 mesi e 6 mesi del post trapianto, sono dosati i linfociti totali con studio dell'Immunofenotipizzazione cellulare con dosaggio dei linfociti totali, CD3+,

CD4+, CD8+, CD4+/CD8+.

L'immufenotipizzazione leucocitaria è stata eseguita presso i laboratori del Servizio di Immunoematologia e trasfusione dell'Ospedale di Varese. Tutti i prelievi ematici sono stati eseguiti presso i laboratori dell'Azienda Ospedaliera di Varese. I mismatch (MM) sono stati effettuati dal NITp (Nord Italia Transplant program) presso la Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico a Milano.

Analisi statistica

Le variabili sono state espresse come media e deviazione standard.

I pazienti sono stati confrontati con il Fisher's exact test per le proporzioni, l'analisi della varianza (ANOVA) per le variabili continue e il Mann-Whitney test (χ^2 test), dove appropriato. Il livello di significatività è stato fissato a 0,05.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando Prism Graphpad (versione 5.0).

RISULTATI

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

In tabella 2 sono descritte le caratteristiche demografiche.

Sono stati trapiantati quattro pazienti HIVAb+, selezionati secondo i criteri di eleggibilità del Centro Nazionale Trapianti⁽²⁶⁾, trattati con monoterapia d'induzione solo con Basiliximab (gruppo II); due di questi, trattati in passato con IFN γ , sono portatori anche di epatopatia cronica HCV correlata, senza segni di replicazione virale in corso (HCV RNA negativo). Nel 2009 è stato eseguito anche il 4° trapianto combinato rene-pancreas a un paziente HIVAb+ (al momento la maggiore casistica in Italia). Tutti i precedenti trapianti combinati rene-pancreas (in paziente HIV+) sono stati eseguiti a Varese, essendo l'Azienda Ospedaliera unica in Italia a essere autorizzata a realizzare questo tipo di doppio trapianto. Tutti i pazienti sono regolarmente seguiti unitamente sia presso gli ambulatori dell'U.O. Malattie infettive e tropicali, diretta dal Prof.re P. Grossi, sia presso gli ambulatori dell'U.O. di Nefrologia e Dialisi.

Uno solo di questi pazienti ha avuto un rigetto acuto (a tre mesi), trattato con boli di Metilprednisolone con buona risposta funzionale.

Quattro pazienti sono portatori di epatopatia HBV correlata, in terapia cronica con Lamivudina, senza segni di replicazione virale.

Tre pazienti hanno subito un espianto in tabula per sopraggiunte complicanze chirurgiche. Per tutti i gruppi sono descritte l'età media dei

donatori e dei riceventi. L'età media dei donatori del IV gruppo è significativamente maggiore rispetto a quella del gruppo III.

FATTORI DI RISCHIO

In tabella 3 sono elencati i fattori di rischio per insorgenza di rigetto acuto e di DGF. Per ciascun gruppo i fattori di rischio sono stati divisi in:

- Fattori di rischio legati al donatore
- Fattori di rischio legati al ricevente
- Fattori di rischio legati al graft

Il numero dei donatori con più di 50 anni del gruppo I è significativamente maggiore rispetto a quella del gruppo III. Il numero di donatori con una differenza di età tra DON/RIC superiore a 10 anni nel gruppo IV è significativamente maggiore rispetto al gruppo II. In tutti e quattro gruppi, i tempi d'ischemia fredda sono stati in media 12-14 ore e in nessun caso sono stati superiori alle 24 ore. Tre pazienti "iperimmunizzati" per precedente trapianto renale, con PRA >70%, e con anticorpi anti-HLA+ (DSA), sono stati pre-trattati con terapia desensibilizzante con IgG vena al dosaggio di 2 gr/kg di peso corporeo ideale, somministrate in 3-5 gg ripetute 4 volte ad intervalli mensili; al momento del trapianto ultima dose di IgG vena a 2 gr/kg + Rituximab 375 mg/m². L'analisi statistica dei MM, divisi in tre fasce di rischio, non è risultata significativa.

FUNZIONE DEL GRAFT – EFFETTI COLLATERALI

In tabella 4, viene mostrata la funzionalità del graft con il dosaggio della creatininemia sierica al 7° giorno del post trapianto, in dimissione e il dosaggio all'ultimo follow-up; sono illustrati i casi di leucopenie, trombocitopenia e linfopenia. Nel gruppo IV il 26% dei pazienti ha presentato una trombocitopenia significativamente maggiore rispetto al gruppo II. I casi di leucopenie tra i gruppi erano omogeneamente distribuiti tra i gruppi, senza differenze significative. Le linfopenie totali dei gruppi I e IV sono state significativamente superiori rispetto agli altri gruppi. Non è stata eseguita l'analisi statistica completa sull'andamento della linfopenie all'interno di ogni singolo gruppo, di quante volte il paziente abbia presentato la linfopenia durante il ricovero, in quanto il numero di osservazioni è incompleto.

Nel grafico n. 1 è illustrato la media della creatininemia nei giorni 0, 7, 15, 1, dimissione, 1 mese, 3 mesi in tutti i gruppi.

Nei grafici 2 e 3 sono illustrati la media dei leucociti e delle piastrine di tutti i gruppi.

Nei grafici n. 4, 5, 6 e 7 sono illustrati rispettivamente le medie dei Linf. Tot., CD3+, CD4, CD8, di tutti i gruppi.

Come si evince dal grafico n. 8 il 97% dei pazienti del gruppo I al 1° giorno post trapianto ha avuto un numero di linfociti totali nettamente < a 1000/mm³. La linfopenia è stata un fenomeno transitorio senza complicanze cliniche; dopo 1° mese i casi di linfopenia transitoria erano il

47%; al 6° mese solo il 13% dei pazienti è rimasto linfopenico.

EVENTI AVVERSI

In tabella 5 sono descritti tutti gli eventi avversi.

Quattro pazienti sono deceduti - 2 pazienti per eventi cardiovascolari - 1 paziente per polmonite - 1 paziente per carcinoma polmonare.

Tre pazienti hanno subito un espianto in tabula per sopraggiunte complicanze chirurgiche inattese.

Il numero di rigetti clinici in tutti i gruppi è stato 9, di questi 5 sottoposti a biopsia. Il gruppo III ha presentato un tasso di rigetto significativamente superiore rispetto agli altri gruppi. Le riattivazioni di HCMV (Human Cytomegalovirus), considerate come infezioni senza malattia, con un numero di copie/ml nel serio >100.000, come tali trattate, secondo lo schema di un trattamento pre-emptive, con Ganciclovir e/o Valganciclovir, sono presenti in tutti i gruppi, senza alcuna differenza significativa. Il Fischer's exact test in tutti i gruppi ha mostrato un'associazione statisticamente significativa tra insorgenza di infezione da HCMV e insorgenza di Rigetto acuto, indipendentemente dai tempi di insorgenza dell'uno o dell'altro, con $P < 0,05$ (0,014).

DISCUSSIONE

Da questo studio è emerso che la terapia di induzione con ATG a basse dosi e Basiliximab è stata ottimamente tollerata. Gli effetti ematologici, pur presenti in modo significativo, non hanno contribuito al peggioramento delle condizioni cliniche in termini di insorgenza di infezioni opportunistiche, nè hanno condizionato una degenza ospedaliera maggiore. L'uso di ATG combinato o in monoterapia è un trattamento sicuro e più efficace in termine di prevenzione dei rigetti acuti. I rigetti acuti a "breve termine" sia nel trattamento combinato sia solo con anticorpi monoclonali sono stati significativamente più bassi rispetto al trattamento tradizionale senza l'uso di Anticorpi.

In nessun caso è stato necessario modificare lo schema o le dosi terapeutiche.

Ciò ha permesso la riduzione delle dosi della terapia di mantenimento con ottimi risultati in termini di sopravvivenza del graft e del paziente.

CONCLUSIONI

Nel corso degli ultimi anni l'approccio terapeutico per la gestione dei trapianti di organi solidi è cambiato. Col passare del tempo la maneggevolezza nell'uso dei farmaci immunosoppressori si è affinata; di ogni farmaco, in uso da decenni, se ne conoscono gli effetti benefici ma anche i limiti stessi a lungo termine. I follow-up migliorano di anno in anno e la sopravvivenza del rene trapiantato e del paziente rimane elevata anche nel "lungo termine". La gestione del paziente trapiantato non è unica e indistinguibile, così come la gestione dei pazienti iperimmunizzati in lista trapianto. Gli schemi d'induzione della soppressione del sistema immunitario, nei primi 15 giorni del post trapianto, può essere diversa da Centro a Centro. Ciò dipende dalle esperienze individuali, dalle "abitudini", ma, soprattutto, dall'approccio mentale di cambiare gli schemi farmacologici consolidati in atto, cercando di migliorare la sopravvivenza del trapianto e la qualità di vita dei pazienti. Il centro trapianti di Varese ha deciso di seguire schemi terapeutici innovativi e, nel corso degli ultimi anni, si è progressivamente allineata all'uso di farmaci biotecnologici usati in monoterapia o in combinazione.

Relativamente ai pazienti trattati con thymoglobuline monoterapia a dosi piene (gruppo IV) si è registrata una elevata incidenza di trombocitopenie e linfopenie ma l'analisi dei dati ha confermato che il trattamento con anticorpi policlonali è in generale un trattamento sicuro ed efficace. Per la maggior parte dei pazienti di questo gruppo è stata usata

un'immunosoppressione classica con Metilprednisolone + inibitori calcineurini. La ciclosporina, farmaco fondamentale nei decenni scorsi per aumentare la sopravvivenza del graft, è nefrotossica causando la fibrosi del graft, condizionandone irreversibilmente la sopravvivenza. Molti studi hanno dimostrato che può essere sospesa dopo i primi 6 mesi. Nel 2010 è stato individuato un approccio più intensivo per la fase induzione, per ridurre al minimo la terapia di mantenimento a medio e lungo termine ovvero l'associazione Basiliximab+ATG nella fase induttiva.

Nel "lungo termine" del post trapianto è auspicabile un sistema immunitario "tollerante" tale da garantire una buona sopravvivenza del graft, senza rigetto, anche con basse dosi di farmaci antirigetto e/o con la sospensione di alcuni di essi, riducendo, in questo modo il rischio d'insorgenza di gravi infezioni e di neoplasie.

Questo studio preliminare ha certamente molti limiti. È un'analisi retrospettiva con lo scopo di confrontare sia i diversi schemi terapeutici in uso nel Centro trapianti, sia di confermare che l'uso di nuovi schemi e combinazioni terapeutiche può portare a miglioramenti clinici. Per una conferma definitiva di dati è auspicabile uno studio prospettico randomizzato a tre braccia (Basiliximab in monoterapia, ATG in monoterapia e la combinazione dei due farmaci).

TABELLE

Tabella n. 1a

32 PAZIENTI CON DOPPIA INDUZIONE Ab POLI/MONOCLONALI AL TX (ATG + BASILIXIMAB - GRUPPO I)

Giorno post tx	0	1	2	3	4	5
ATG (Fresenius) S	100	100	100	100	100	
Simulect	20				20	
Metilprednisolone	500	250	160	80	40	
Metilprednisolone per os						16

Le dosi sono espresse in mg/die

Tabella n. 1b

26 PAZIENTI CON INDUZIONE SOLO CON Ab MONOCLONALE AL TX (BASILIXIMAB - GRUPPO II)

Giorno post tx	0	1	2	3	4	5
Simulect	20				20	
Metilprednisolone	500	250	160	80	40	
Metilprednisolone per os						16

Le dosi sono espresse in mg/die

Tabella n. 1c

19 PAZIENTI SENZA INDUZIONE CON Ab MONO/POLICLONALI AL TX (- GRUPPO III)

Giorno post tx	0	1	2	3	4	5
Metilprednisolone	500	250	160	80	40	
Metilprednisolone per os						16

Le dosi sono espresse in mg/die

Tabella n. 1d

15 PAZIENTI CON INDUZIONE CON Ab POLICLONALI AL TX (THYMOGLOBULIN - GRUPPO IV)

Giorno post tx	0	1	2	3	4	5
THTMOGLOBULINE	2,5	2	1,25	1	0,625	0,625
Metilprednisolone	500	250	160	80	40	
Metilprednisolone						16

Le dosi di thymoglobuline sono mg/Kg p.c.

Tabella n. 1e

Terapia Immunosoppressiva di mantenimento

Metilprednisolone (dal 5° gg...)	16 mg con dosaggi a scalare
Ciclosporina (dal g. 0 -....)	4 mg/kg con C2 600-800 ng/ml per il 1° mese, secondo C2 (300-400 ng/ml) dal 2° mese.
Everolimus (dal g 1°-....)	0,75 mg x 2/die, continuando secondo t.l. (5-10 ng/ml) dal 1° mese
Sirolimus (dal g 4°....)	4 mg/ die per 5 giorni, secondo t.l. (6-10 ng/ml)
FK 506-Tacrolimus (dal g 0 -...)	0,1 mg/Kg con t.l. 7-10 ng/ml per il 1° mese, continua secondo t.l. (6-8 ng/ml) dal 2° mese
Micofenolato Mofetile (dal g 0...)	1 g x 2 per i primi 15 giorni, continua con 500 mg x2/ die

Tabella n .2

CARATTERISTICHE DEMOCRAFICHE DEL CAMPIONE

Totale pazienti 92	I Gruppo	II Gruppo	III Gruppo	IV Gruppo	P
	Doppia Induz.	Solo Basiliximab	Senza Anticorpi	Solo Thymogl.	
	32 (35%)	26 (28%)	19 (21%)	15 (16%)	
persi al F.U.	3 (9%)	3 (12%)	2 (10%)	2 (13%)	
decessi con graft funzionante	1 (3%)	2 (2%)	1 (5%)	0	0,89
ETÀ Donatori	53,7±11,7	53,0±16,5	45,6±13,1	*54,0±12,2	0,01
DONATORI CON ETÀ > 50 aa	19 (59%)	11 (42%)	*4 (21%)	4 (26%)	0,0134
ETÀ Riceventi	51,7± 11,7	54,7±11,4	48,3± 11,2	58,9±8,3	0,06
RICEVENTI Femmine ♀	9 (28%)	10 (38%)	5 (26%)	3 (20%)	
RICEVENTI Maschi ♂	24 (75%)	16 (62%)	15 (79%)	10 (67%)	
Giorni di ricovero	21,±9,1	24,±11,2	18,±6,2	26,±12,2	0,13
PAZIENTI HIVAb+	0	4 (15%)	0	0	

2 pazienti, del gruppo II, HIVAb+, sono portatori di epatopatia cronica HCV correlata, senza replicazione RNA virale

4 pazienti in tutti i gruppi sono portatori di epatopatia HBV correlata, senza replicazione DNA virale

Tabella n .3

FATTORI DI RISCHIO

Don con età >50 aa, differenza età Don-Ric.>10 aa, PRA >70%, MM, ischemia fredda, doppio tx.

Tale dei pazienti 92	I Gruppo	II Gruppo	III Gruppo	IV Gruppo	P
	Doppia Induz.	Solo Basiliximab	Senza Anticorpi	Solo Thymogl.	
	32 (35%)	26 (28%)	19 (21%)	15 (16%)	
F.R. del Donatore					
donatori con età > 50 anni	19 (59%)	11 (41%)	*4 (21%)	4 (26%)	0,0134
Donat. con differenza età >10 aa	6 (19%)	* 0	3 (16%)	4 (26%)	0,02
F. R. del Ricevente					
Secondo trapianto	4 (12%)	0	0	1 (7%)	
PRA > 70%	3 (9%)	0	0		
F. R del Graft					
Doppio Trapianto con DON. >70 aa	1 (3%)	0	0	2 (13%)	
Tx rene-pancreas in ricevente HIVAb+	0	1	0	0	
Durata ischemia fredda	13,6±2,3	12,6±4,1	11,4±5,7	12,8±2,8	
Numero di MM 0-2	3	6	4	4	0,4110
Numero di MM 3-4	25	16	12	8	0,0838
Numero di MM 5-6	3	3	0	3	0,2690

Tabella n .4

FUNZIONE DELGRAFT - EFFETTI COLLATERALI

Tale dei pazienti 92	I Gruppo	II Gruppo	III Gruppo	IV Gruppo	P
	Doppia	Solo	Senza	Solo	
	Induz. 32 (35%)	Basiliximab 26 (28%)	Anticorpi 19 (21%)	Thymogl. 15 (16%)	
Creatininemia media al 7° giorno	2,6±2,8	1,9±1,4	2±1,3	3,8±2,9	0,20
Creatininemia media alla dimissione	1,5±0,8	1,3±0,3	1,4±0,4	1,7±0,7	0,59
Creatininemia media all'ultimo F.U.	1,3±0,3	1,5±0,7	1,4±0,5	1,7±0,7	0,58
Leucopenia GB <4000/mm ³	6 (19%)	4 (15%)	2 (10%)	5 (45%)	0,3590
Trombocitopenia < 100 x 10 ⁹ /mm ³	4 (12%)	2 (7%)	0	*4 (26%)	0,08
N. total di Linfopenie < 1000/mm ³	29 (97%)*	14 (64%)	6 (31%)	14 (93%)	0,0001
Nei gruppi II III e IV il numero di osservazioni della conta linfocitaria è inferiore al n. totale dei pazienti.					
N. totale di Linfopenie al 1°giorno	29 (97%)	6/7 (86%)	6/14 (43%)	9/9 (100%)	
N. totale di Linfopenie a 1° mese	14 (47%)	2/6 (33%)	2/6 (33%)	5/5 (100%)	
N. totale di Linfopenia al 3° mese	7 (23%)	1/7 (14%)	0	3/3 (100%)	
N. totale di Linfopenia al 6° mese	4 (13%)	2/9 (22%)	0	3/3 (100%)	

*Nel gruppo II i 4 pazienti HIV+ non sono stati inclusi, essendo essi linfopenici per altre cause

Tabella n .5

FATTORI DI RISCHIO

Don con età >50 aa, differenza età Don-Ric.>10 aa, PRA >70%, MM, ischemia fredda, doppio tx.

Tale dei pazienti 92	I Gruppo	II Gruppo	III Gruppo	IV Gruppo	P
	Doppia	Solo	Senza	Solo	
	Induz. 32 (35%)	Basiliximab 26 (28%)	Anticorpi 19 (21%)	Thymogl. 15 (16%)	
F.R. del Donatore					
donatori con età > 50 anni	19 (59%)	11 (41%)	*4 (21%)	4 (26%)	0,0134
Donat. con differenza età >10 aa	6 (19%)	* 0	3 (16%)	4 (26%)	0,02
F. R. del Ricevente					
Secondo trapianto	4 (12%)	0	0	1 (7%)	
PRA > 70%	3 (9%)	0	0		
F. R del Graft					
Doppio Trapianto con DON. >70 aa	1 (3%)	0	0	2 (13%)	
Tx rene-pancreas in ricevente HIVAb+	0	1	0	0	
Durata ischemia fredda	13,6±2,3	12,6±4,1	11,4±5,7	12,8±2,8	
Numero di MM 0-2	3	6	4	4	0,4110
Numero di MM 3-4	25	16	12	8	0,0838
Numero di MM 5-6	3	3	0	3	0,2690

FIGURE

Fig n. 1 MHC 1

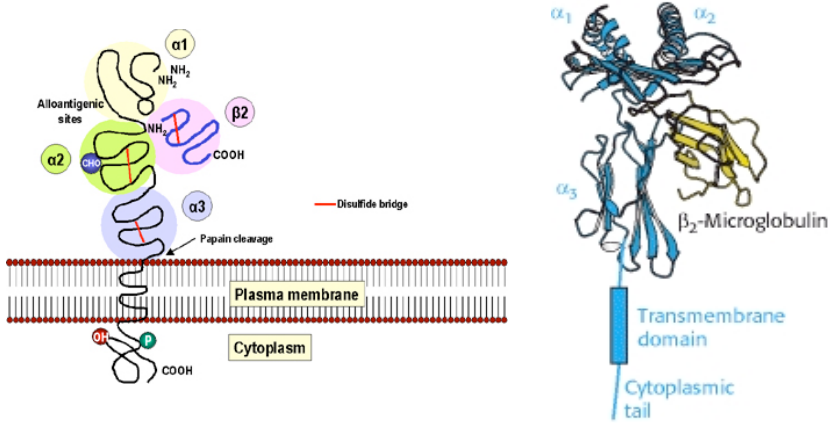


Fig n. 2 MHC 2

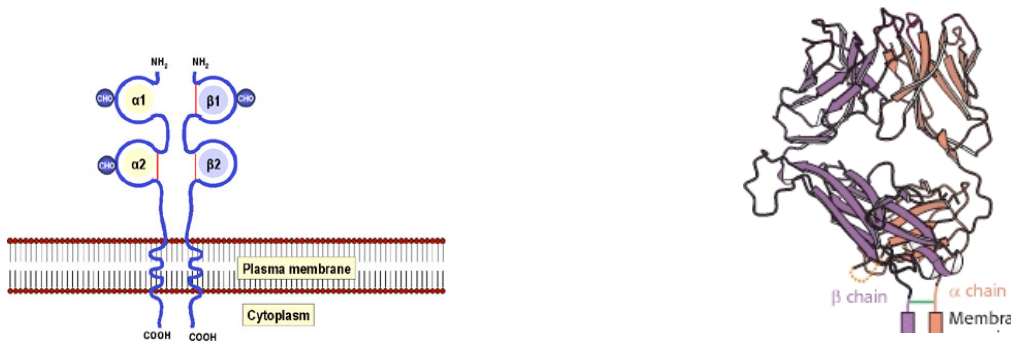


Fig n. 3 TCR

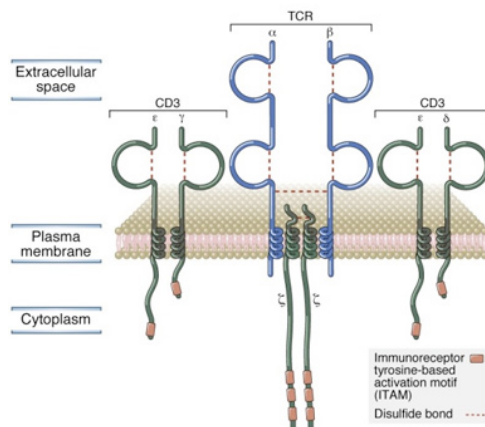


Fig n. 4 IL-2



Fig. n. 5 IL-2R

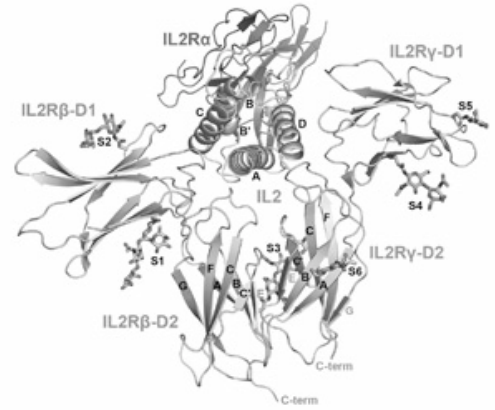
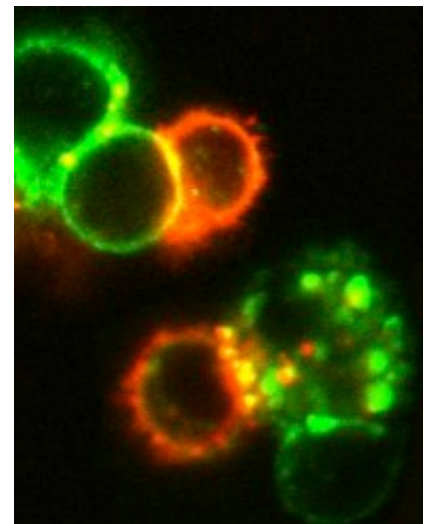
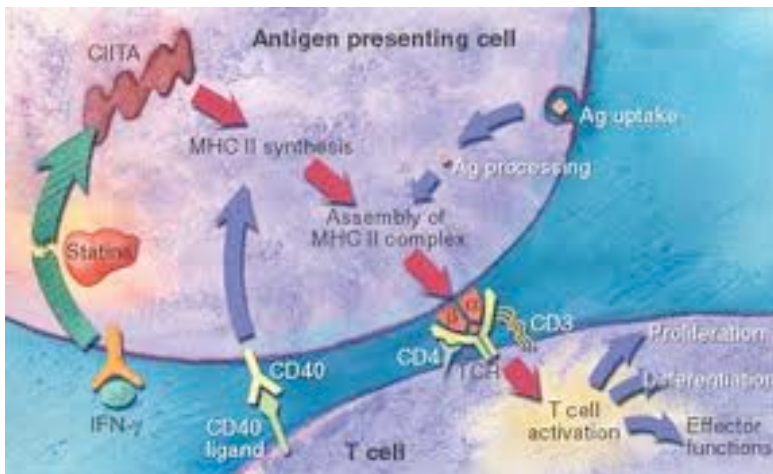


Fig n. 5 Sinapsi immunologica



GRAFICI

Grafico n. 1

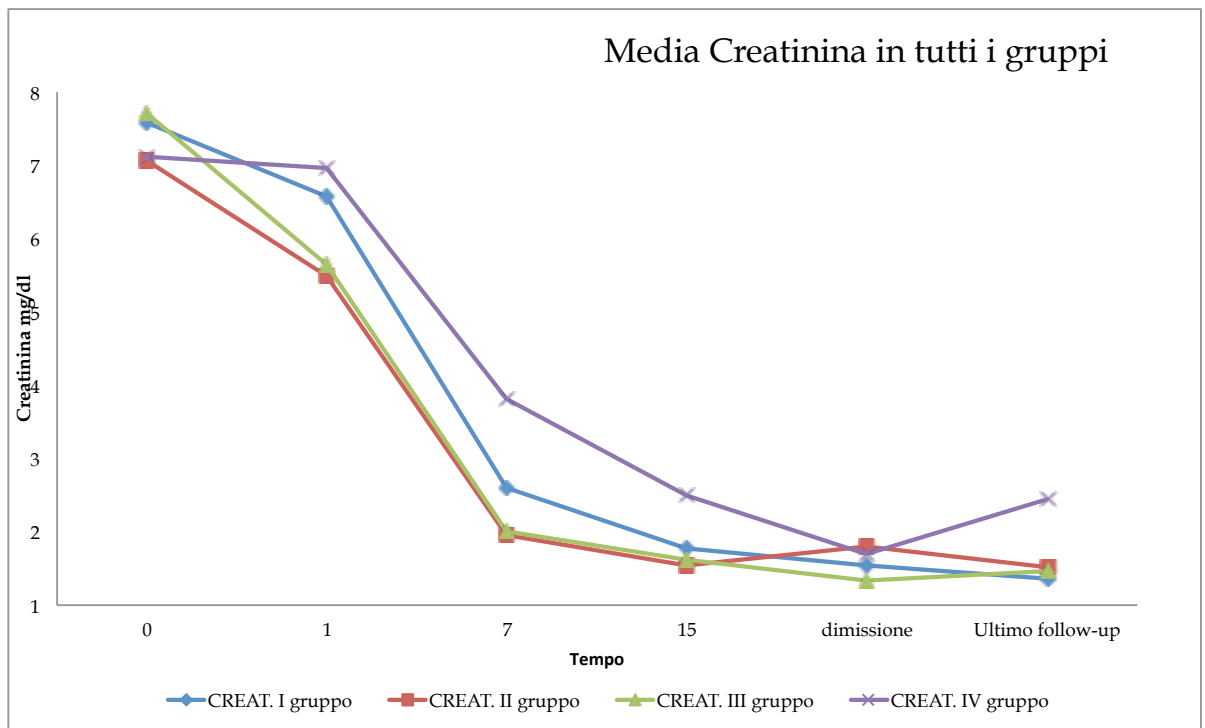


Grafico n. 2

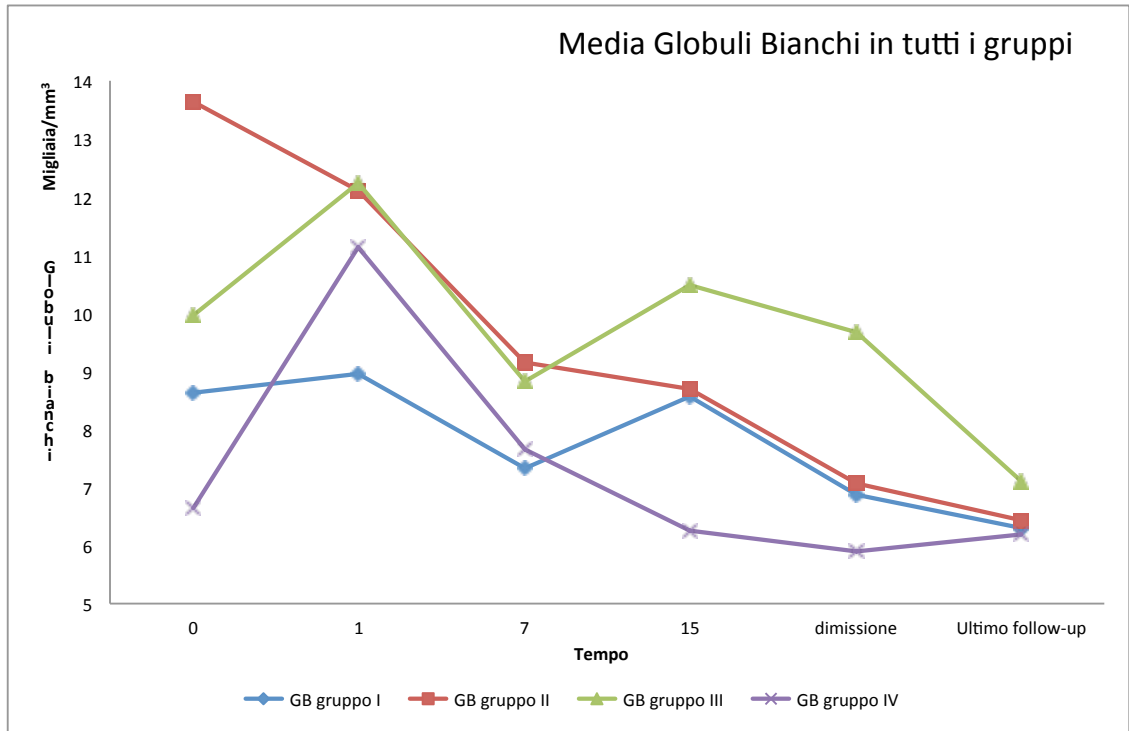


Grafico n. 3

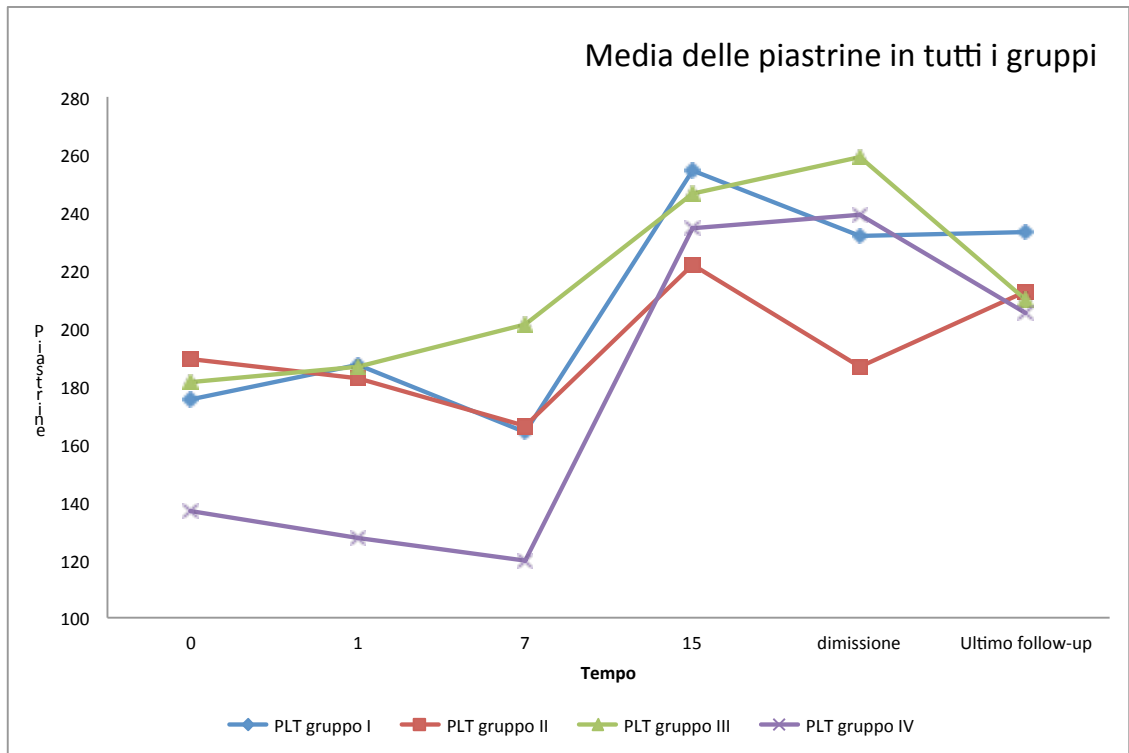


Grafico n. 4

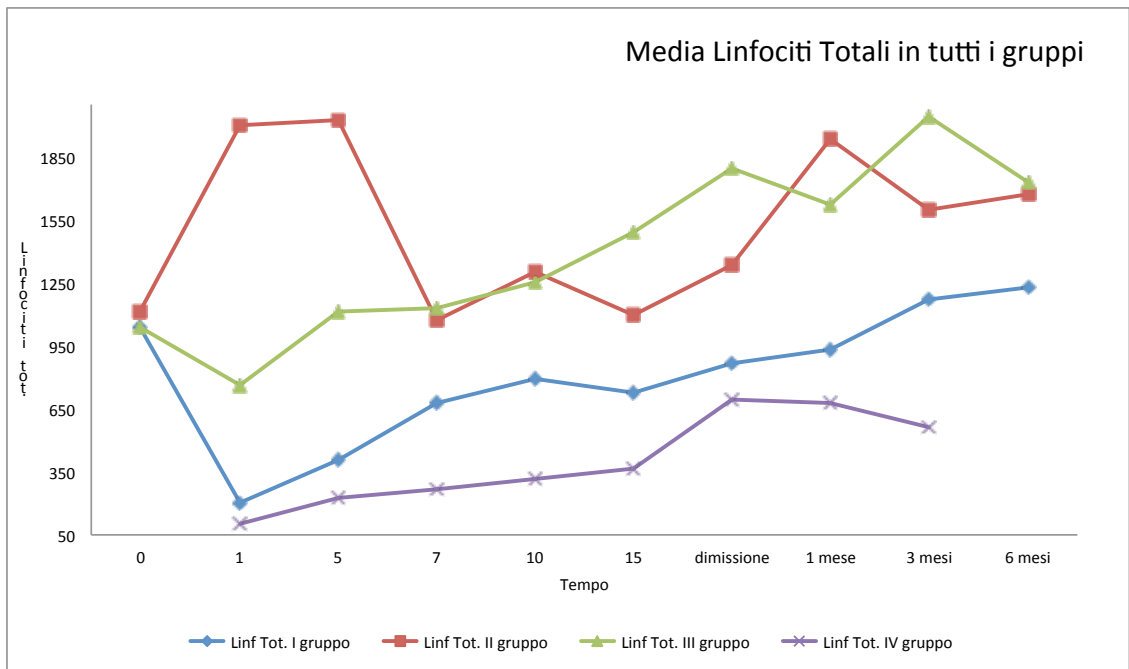


Grafico n. 5

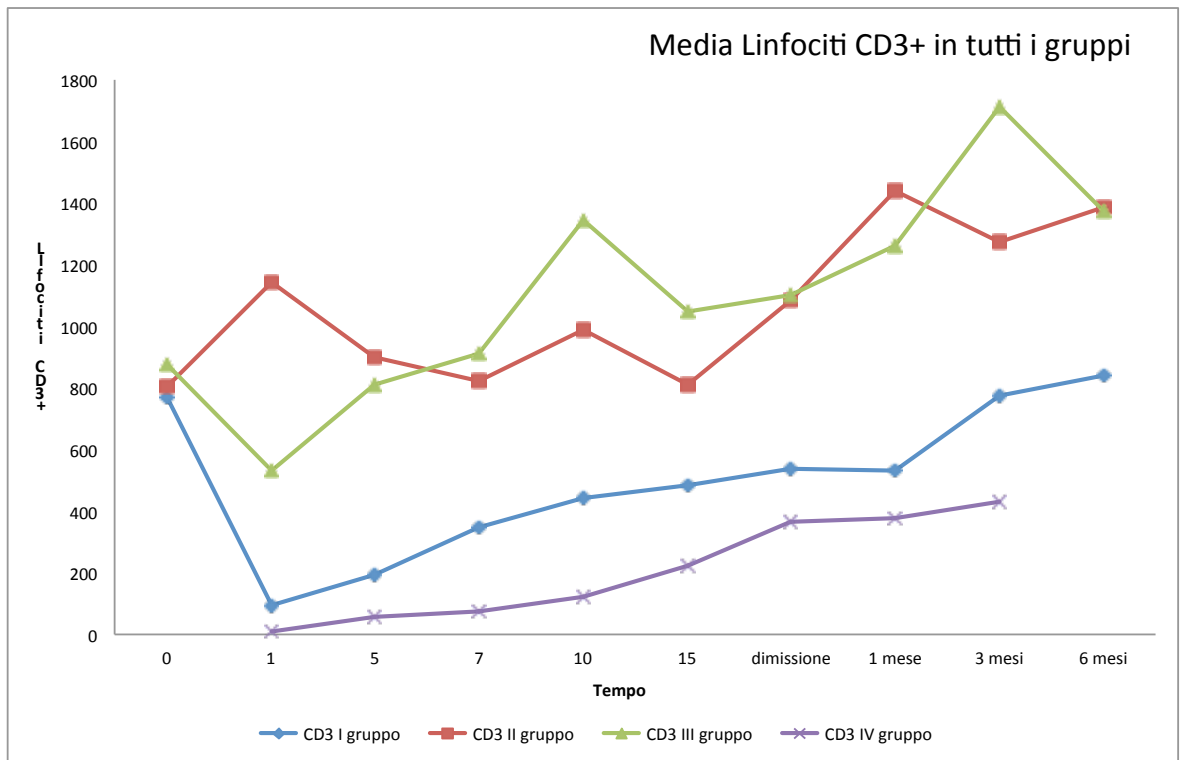


Grafico n. 6

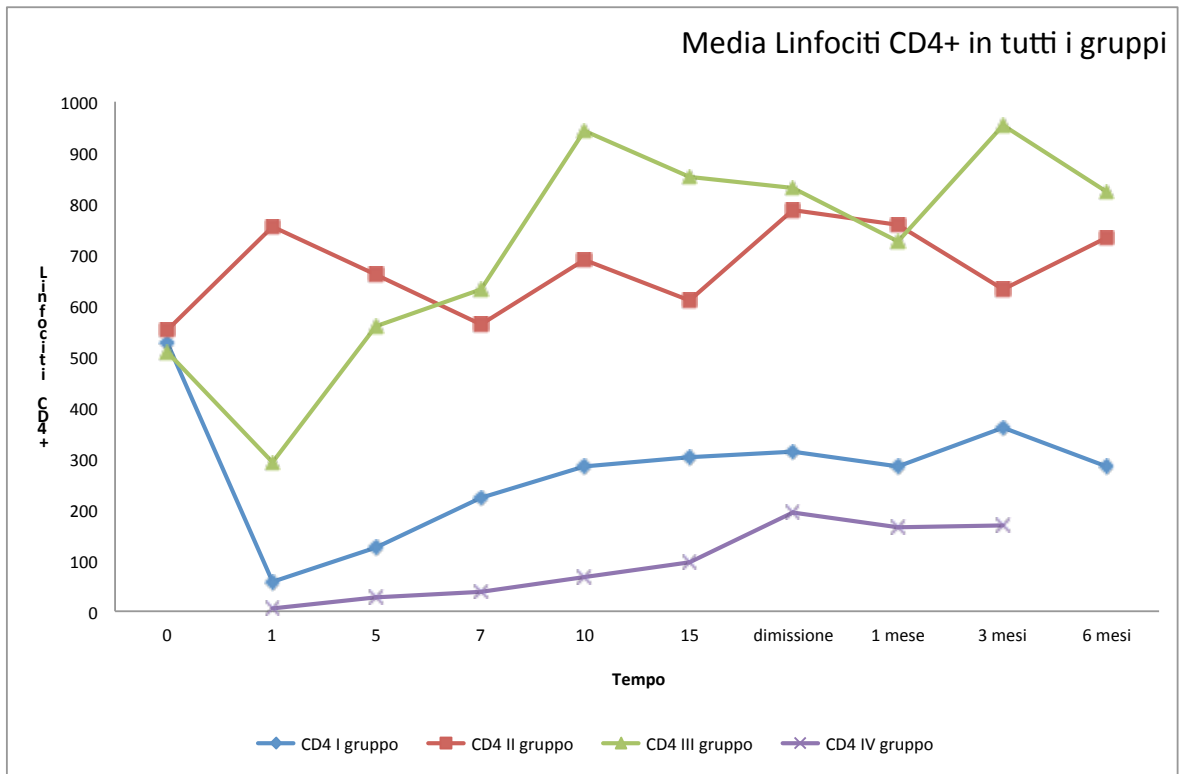


Grafico n. 7

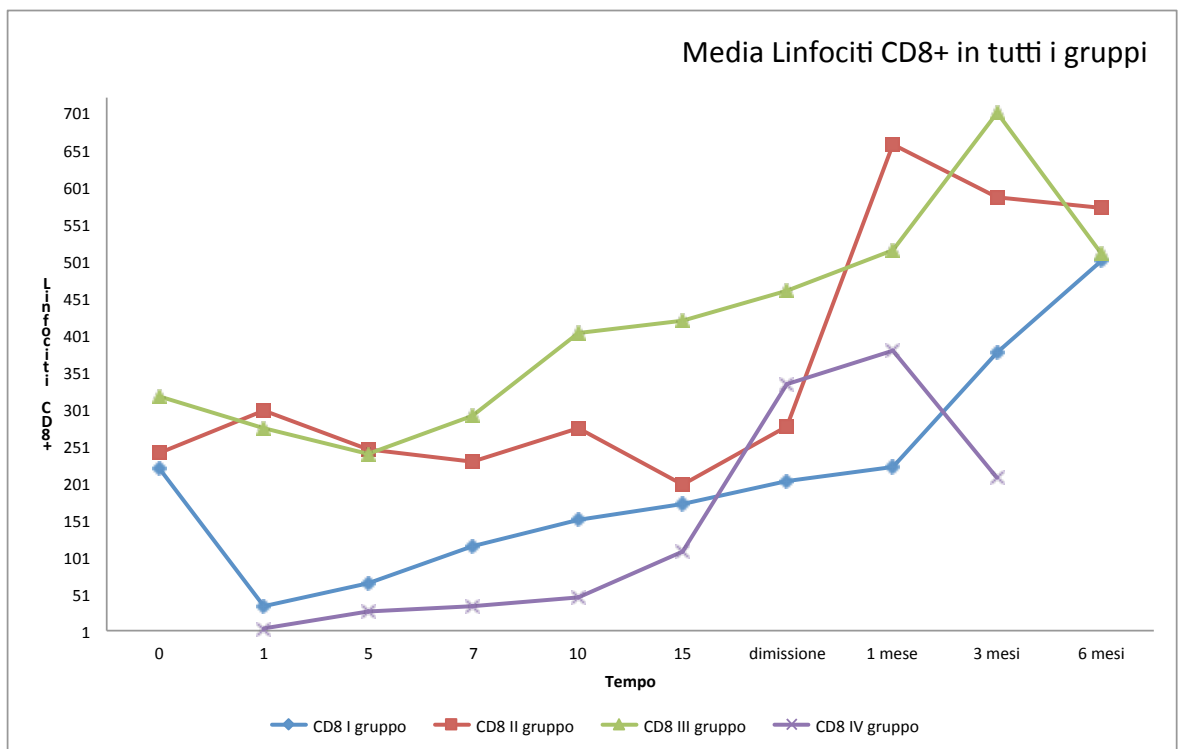
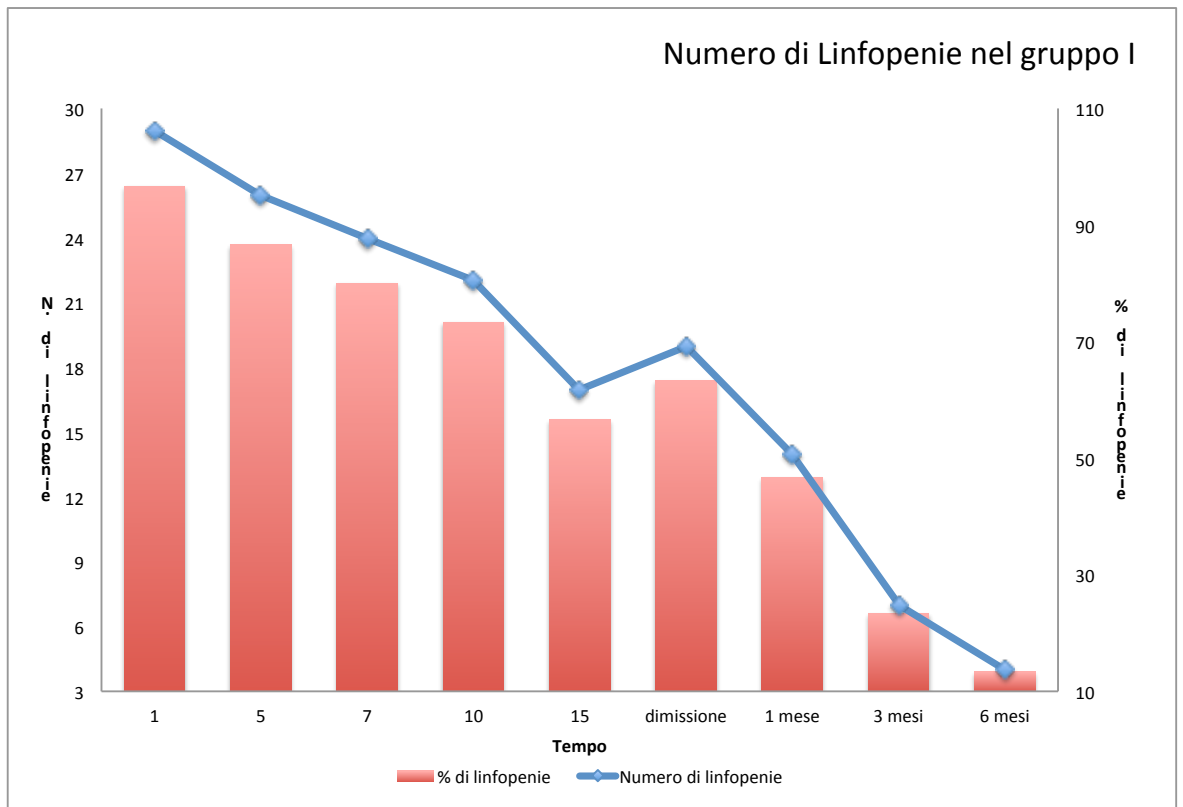


Grafico n. 8



BIBLIOGRAFIA

1. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai - Immunologia cellulare e molecolare. Casa Editrice Elsevier Masson, VI edizione aggiornata (2010). Edizione italiana a cura di Silvano Sozzani.
2. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. Mr Clark's Surgical Unit, Glasgow Royal Infirmary. *Journal of Anatomy* 1943, 77 (Pt 4): 299-310.
3. Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the relationship between the antigens of blood and skin. *British Journal of Experimental Pathology* 1946, 27:15-24.
4. Hildemann WH, Medawar PB. Relationship between skin transplantation immunity and the formation of humoral isoantibodies in mice. *Immunology* 1959, 2(1): 44-52.
5. Medawar PB. Immunosuppressive agents, with special reference to antilymphocytic serum. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. Royal Society (Great Britain)*. 1969, 174(35): 155-72. Review lecture.
6. Medawar PB. Immunosuppressive agents ADM; *Revista de la Asociacion Dental Mexic*. 1969, 26(1): 75-81.
7. Levey RH, Medawar PB. Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1966, 56(4): 1130-7.
8. Medawar PB. The storage of living skin. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* [1954, 47(1): 62-4.
9. Brent L, Medawar PB. Cellular immunity and the homograft reaction *British Medical Bulletin* [1967, 23(1): 55-60]. Review.
10. Snell GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *Journal of Genetics* 1948, 49(2): 87-108.
11. Snell GD, Higgins GF. Alleles at the histocompatibility-2 locus in the mouse as determined by tumor transplantation. *Genetics*. 1951, 36(3): 306-10.

12. Snell GD. The immunogenetics of tumor transplantation. *Cancer Research*. 1952, 12(8): 543-6.
13. Snell GD, Smith P, Gabrielson F. Analysis of the histocompatibility-2 locus in the mouse. *Journal of the National Cancer Institute*. 1953, 14(3): 457-80.
14. Snell GD. The H-2 locus of the mouse: observations and speculations concerning its comparative genetics and its polymorphism. *Folia Biologi*. 1968, 14(5): 335-58.
15. Snell GD, Cherry M, Démant P. H-2: its structure and similarity to HL-A. *Transplant. Reviews* 1973, 15:3-25.
16. Snell GD. The major histocompatibility complex: its evolution and involvement in cellular immunity. *Harvey Lectures* 1980, 74:49-80.
17. Snell GD. The Nobel Lectures in Immunology. Lecture for the Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1980: Studies in histocompatibility. *Scandin. Journal of Immunology* 1992, 36(4): 513-26.
18. Benacerraf B., McDevitt H.O. The histocompatibility linked immune response genes. *Science* 1972 175:273.
19. Benacerraf B, McDevitt. HO Histocompatibility-linked immune response genes. *Science (New York, N.Y.)*. 1972, 175(19): 273-9. Review.
20. Benacerraf B Editorial: Immune response genes. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1974, 3(4): 381-6.
21. Benacerraf B, Katz DH The histocompatibility-linked immune response genes. *Advances in Cancer Research*. 1975, 21:121-73.
22. Benacerraf B Role of major histocompatibility complex in genetic regulation of immunologic responsiveness. *Transplantation Proceedings* 1977, 9(1): 825-31.
23. Benacerraf B Role of MHC gene products in immune regulation. *Science (New York, N.Y.)*. 1981, 212(4500): 1229-38.
24. Linee Guida Italiane sull'utilizzo dei farmaci antiretrovirali e sulla gestione diagnostico-clinica delle persone con infezione da HIV-1. Luglio 2010. Prot. 2642/CNT 2009.

25. Tyan Db, Li Va, Czer L, Trento a, Jordan SC. Intravenous immunoglobulin suppression of HLA alloantibody in highly sensitized transplant candidates and transplantation with a histocompatible organ. *Transplantation* 1994; 57: 553-62.
26. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation *NEJM* 2008; 359: 242-51.
27. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7; 256 5517, 495-7.
28. Amlot P.L. et al: Prolonged action of a chimeric interleukin-2 receptor (CD25) monoclonal antibody used in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1995,60 n. 7: 748-756.
29. Hutchinson IV. Immuno mechanism of long-term graft acceptance. *ADV Nephrol* 25; 17-37, 1996.
30. Metchnikoff E. Etudes sur la resorption des cellules. *Ann Inst. Pasteur* 1899;17:737.
31. Tyan Db, Li Va, Czer L, Trento a, Jordan SC. Intravenous immunoglobulin suppression of HLA alloantibody in highly sensitized transplant candidates and transplantation with a histocompatible organ. *Transplantation* 1994; 57: 553-62.
32. Remberger M., Ashan J., Barkholt L., Treatment of severe acute graft-versus-host-disease with anti-tymocyte globulin. *Clin Transplant* 2001; 15:147.
33. Remberger M, Mattsson J, Ringden O. Polyclonal anti T cell globulin as part of the preparative regimen for pediatric allogeneic stem-cell transplantation. *Pediatr Transplant* 2001; 5:285.
34. Teraura M., Kobayashi s., Iwabe K., et al. Mechanism of action of antitymocyte globulin in the treatment of aplastic anemia: In vitro evidence for presence of immunosuppressive mechanism *Br J Haematol* 1997; 96:80.
35. Hardinger KL, Shnitzler MA, Miller B, e al. Five years follow-up of

- tymoglobulin versus ATGAM induction in adult renal transplantation. *Transplantation* 2004; 78:136.
36. Esposito L, Kamar N, Durand D, Rostaing L. Comparison of induction based on continuous vs discontinuous administration of thymocyte globulins in renal transplant patients: Efficacy and long-term Safety. *Transplant Proc.* 2005; 37:892.
 37. Muller TF, Grebe SO, Neuman MC, et al., Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation* 1997; 64:132.
 38. Hammer C, Thein E: Visualization of the effect of polyclonal antithymocyte globulins on adhesion of leucocytes. *Transplant Proc* 2003;34:2486-2487. (ATG monografia).
 39. A. Nocera Protocolli di desensibilizzazione in riceventi immunizzati nel trapianto di rene da donatore vivente *GIN* 2009 n. 4 - 499-515.