

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**Scienze nefrologiche ed uro-andrologiche**

Ciclo XXIV

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/D2**

**Settore Scientifico disciplinare: MED/14**

**TITOLO TESI**

**Impatto della glomerulopatia cronica da trapianto  
sulla disfunzione tardiva del rene trapiantato**

**Presentata da: Dr.ssa Francesca Valerio**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof Sandro Mattioli**

**Relatore**

**Prof Sergio Stefoni**

**Correlatore**

**Prof Giovanni Cancarini**

**Esame finale anno 2012**

## INDICE

Introduzione.....	pag. 3
Anticorpi anti-donatore e C4d .....	pag. 4
Patogenesi del danno anticorpo-mediato nel rigetto d'organo .....	pag. 6
Rigetto cronico: istologia e classificazione.....	pag. 7
Scopo dello studio .....	pag. 11
Pazienti e metodi .....	pag. 12
Biopsia renale.....	pag. 12
Anticorpi anti-donatore.....	pag. 14
Analisi statistica.....	pag. 14
Risultati .....	pag. 15
Popolazione in studio.....	pag. 16
Caratteristiche generali.....	pag. 18
Caratteristiche alla biopsia renale.....	pag. 20
Diagnosi morfologiche .....	pag. 22
Altre lesioni morfologiche riscontrate alla biopsia renale.....	pag. 24
Presenza di C4d su tessuto .....	pag. 26
Alloanticorpi anti-donatore.....	pag. 27
Andamento della funzione renale.....	pag. 28
Sopravvivenza dei pazienti.....	pag. 29
Sopravvivenza del rene trapiantato.....	pag. 30
Discussione.....	pag. 32
Bibliografia .....	pag. 38

## INTRODUZIONE

Una delle principali problematiche riguardanti la gestione del paziente con trapianto di rene è rappresentato dalla disfunzione tardiva del rene trapiantato, definita clinicamente dalla comparsa, dopo almeno un anno dal trapianto, di peggioramento funzionale, proteinuria ed ipertensione arteriosa. Negli ultimi anni, l'ottimizzazione della gestione della terapia immunosoppressiva ha infatti permesso di ottenere una significativa riduzione dell'incidenza di rigetto acuto, senza tuttavia migliorare l'outcome a lungo termine (1, 2). A fronte di una sopravvivenza del rene trapiantato superiore al 90% nel primo anno, il tasso annuale di perdita tardiva del graft è rimasto stabile intorno all'8%(1, 3, 4).

Nel processo patogenetico della disfunzione tardiva del rene trapiantato sembrano essere coinvolti diversi meccanismi, immunologici e non. Tra questi ultimi, molta attenzione è stata rivolta in passato alla nefrotossicità da inibitori delle calcineurine (CNI), farmaci in grado di indurre fibrosi interstiziale, atrofia tubulare ed arteriolopatia e di sostenere la comparsa di progressivo peggioramento della funzione renale, definito con il termine di nefropatia cronica da trapianto (CAN) (5, 6, 7). Nel 2003 Nankivell et al hanno documentato, su biopsie renali protocollari, che dopo 10 anni dal trapianto tutti i pazienti presentavano un grado più o meno severo di lesioni parenchimali riconducibili all'uso dei CNI. Tali riscontri hanno motivato lo sviluppo di protocolli terapeutici volti prima a ridurre la posologia, e poi a sospendere questa classe di farmaci.

Tuttavia, a partire dalla fine degli anni 90, diverse sono state le segnalazioni in letteratura del ruolo svolto (8, 9, 10, 11, 12) dai meccanismi immunologici, e tra questi in particolare dalla risposta umorale, nella patogenesi della disfunzione tardiva del trapianto.

- **Anticorpi anti-donatore e C4d**

Le prime segnalazioni della possibile relazione tra rigetto e immunità umorale risalgono agli anni 70: è in quegli anni che Jeannot M e al. (13) osservarono una correlazione tra comparsa di arteriolopatia cronica e presenza nel siero di anticorpi anti-HLA donatore specifici (DSA) prodotti de novo e che Kissmeyer-Nielsen e al. ipotizzarono una possibile correlazione esistente tra immunità umorale e rigetto iperacuto (14). Nonostante queste precoci segnalazioni, negli anni successivi l'interesse dei ricercatori si focalizzò principalmente sul ruolo dell'immunità cellulare nella patogenesi del rigetto acuto. Soltanto negli anni 90, Halloran et al. (8, 9) rinnovarono l'attenzione verso la risposta anticorpale anti-donatore, dimostrando che lo sviluppo de novo di anticorpi DSA anti-HLA era in grado di condizionare negativamente la sopravvivenza del rene trapiantato, avanzando l'ipotesi che il danno d'organo fosse mediato dall'attivazione del sistema complementare e dai granulociti neutrofili, senza tuttavia riuscire ad identificare il marcatore tissutale della risposta umorale. Più recentemente, diversi sono gli autori che hanno confermato come la presenza di DSA anti-HLA si associ a aumentato rischio di perdita del rene trapiantato (10, 11, 12, 13, 14, 15)

E' a Feucht et al. (16, 17) e Collins et al. (18) che si deve l'identificazione della deposizione a livello dei capillari peritubulari del marker tissutale della risposta umorale, il C4d. Il legame degli anticorpi anti-donatore all'endotelio vascolare determina infatti l'attivazione della via classica del complemento, con clivaggio di C4 e formazione di C4d, frammento inattivo di 42 KDa, capace di legarsi covalentemente alle cellule endoteliali grazie alla presenza nella sua struttura di un gruppo tioestere (21). Negli ultimi anni, diversi autori hanno studiato l'impatto della positività del C4d sulla sopravvivenza del rene trapiantato. Regele et al. (22), Lederer et al. (21) e Herzenberg et al. (24) hanno dimostrato che la positività di tale marcatore a livello dei capillari peritubulari correlava significativamente con una peggiore sopravvivenza del rene trapiantato, nonché con valori di PRA (Panel Reactive Antibody) più elevata al momento del trapianto, confermando quindi lo stretto

nesso tra C4d-positività ed immunità umorale. Paduval et al. (25) e Jianghua et al. (26) hanno più recentemente confermato tali dati, dimostrando come la positività del C4d a livello dei capillari peritubulari sia in grado di condizionare una peggiore sopravvivenza del rene trapiantato e di ridurre la risposta ai trattamenti anti-rigetto convenzionali. Come segnalato da Collins et al. (18) e da Kawamura et al. (27), i capillari peritubulari non rappresentano l'unica sede di deposizione tissutale del C4d, che può essere rinvenuto anche a livello glomerulare ed arteriolare: in questi casi, tuttavia, la sua deposizione pare non essere indicativa di attivazione umorale. Il C4d può infine essere rinvenuto a livello tissutale anche nei casi di danno anticorpo-mediato diretto contro antigeni diversi da quelli del sistema HLA, come dimostrato nei casi di rigetto umorale in pazienti sottoposti a trapianto di rene ABO-incompatibile (28).

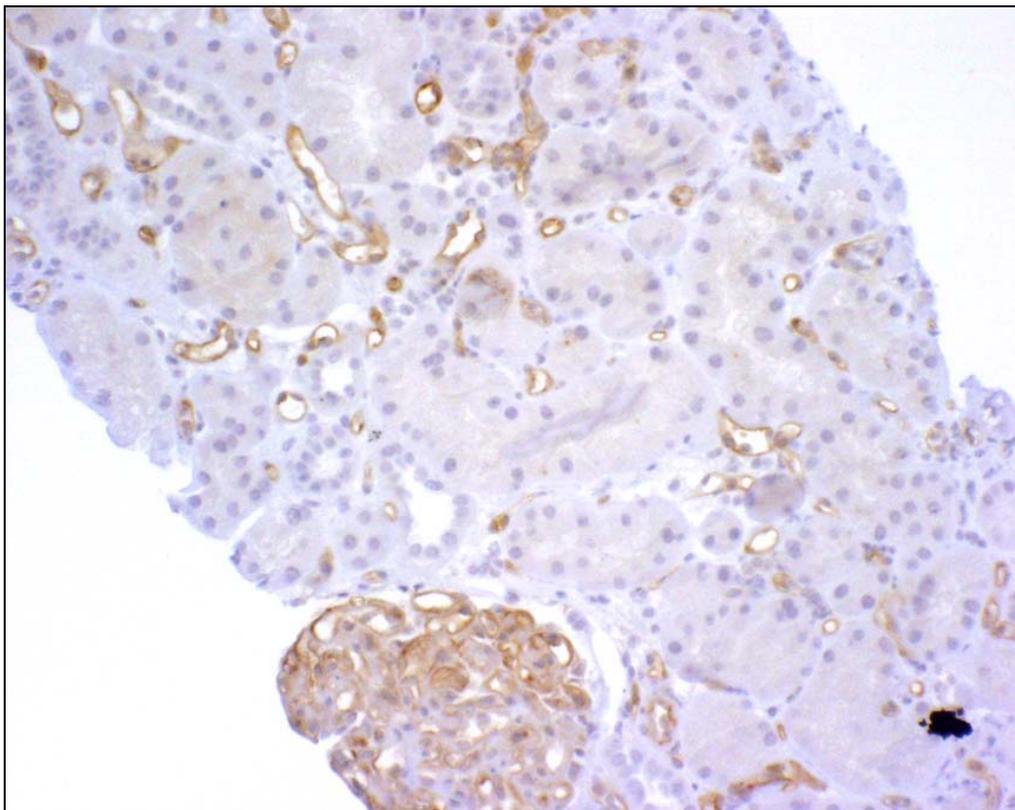


Figura 1. Glomerulopatia Cronica da Trapianto: intensa positività del C4d sui CPT e sulle anse glomerulari (tecnica di immunoistochimica).

- **Patogenesi del danno anticorpo-mediato nel rigetto d'organo**

La risposta immunitaria di tipo umorale svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi della disfunzione cronica del rene trapiantato. La conoscenza dei meccanismi in grado di innescare tale risposta è fondamentale per ottimizzare le strategie terapeutiche volte a migliorare la sopravvivenza dell'organo, non solo a breve termine, ma anche e soprattutto a medio-lungo termine. E' la risposta complementare anticorpo-mediata la principale responsabile del danno d'organo, di cui il C4d rappresenta il marcatore a livello tissutale. In particolare, il complesso di attacco alla membrana (MAC), costituito dai componenti finali della cascata complementare (C5b-C9) e il frammento C5a della cascata complementare, sembrano svolgere un ruolo patogenetico fondamentale: essi sono in grado di indurre apoptosi a livello endoteliale, di promuovere la produzione di alcuni fattori di crescita pro-fibrotici (PDGF e  $\beta$ -FGF) coinvolti nel danno cronico dell'organo trapiantato (29), di modificare a livello endoteliale l'espressione delle molecole di adesione deputate alla migrazione transendoteliale delle cellule infiammatorie (30), nonché di stimolare la formazione di microtrombi capillari, conferendo alle cellule endoteliali un fenotipo procoagulante. Studi sperimentali hanno chiaramente documentato che una difettiva formazione del MAC in ratti C6-deficienti sia in grado di prevenire lo sviluppo di rigetto iperacuto, acuto e cronico nel trapianto di organi solidi (31, 32).

Nonostante i meccanismi del danno anticorpo-mediato siano oggi noti, il *primum movens* della produzione di anticorpi anti-HLA non è ancora chiarito: come ipotizzato da Sellares et al (33) le due spiegazioni più plausibili potrebbero essere rappresentate dalla non-aderenza alla terapia e dalla eccessiva minimizzazione della terapia immunosoppressiva, auspicata negli ultimi anni allo scopo di ridurre i rischi di tossicità da CNI.

▪ **Rigetto cronico: istologia e classificazione**

Atrofia tubulare, fibrosi interstiziale, glomerulopatia cronica da trapianto, vasculopatia ed infiltrati infiammatori rappresentano le alterazioni anatomo-patologiche potenzialmente correlate alla disfunzione cronica del rene trapiantato. Per anni tali alterazioni sono state considerate sinonimo di “nefropatia cronica”, pur essendo alcune di esse aspecifiche presenti anche in biopsie renali eseguite in pazienti con funzione renale stazionaria. Per ovviare a tale confusione terminologica, la classificazione di Banff del 1997 (34) ha introdotto il termine di “nefropatia cronica da trapianto (CAN)”, definita dalla presenza di atrofia tubulare e fibrosi interstiziale, distinguendola dal “rigetto cronico”, definito invece dalla presenza di endoarterite proliferativa (ispessimento subintimale dei vasi di medio-grosso calibro) e/o di glomerulopatia cronica da trapianto (ispessimento e sdoppiamento delle membrane basali glomerulari e ipercellularità glomerulare). Studi successivi (35, 36) hanno dimostrato come tali lesioni correlino significativamente con positività del C4d a livello dei capillari peritubulari, nonché con positività di DSA anti-HLA. La natura immunologica del rigetto cronico è ben sottolineata dalla revisione della classificazione di Banff del 2005 (37), che ha introdotto il termine di rigetto cronico umorale, condizione patologica definita dalla seguente triade:

- 1) evidenza istologica di danno cronico (richiesti due criteri su quattro):
  - ispessimento fibrotico subintimale senza elastosi
  - duplicazione delle membrane basali
  - fibrosi interstiziale con atrofia tubulare
  - multislaminazione delle membrane basali tubulari
- 2) evidenza di attività immunologia su tessuto (C4d positività)
- 3) presenza nel siero di anticorpi anti-donatore specifici

Allo scopo di raggiungere maggiore chiarezza terminologica, la stessa classificazione abolisce il termine di nefropatia cronica da trapianto, sostituendolo con il termine di “fibrosi interstiziale/atrofia tubulare (IF/TA)”.



Figura 2. Glomerulopatia Cronica da Trapianto: sdoppiamento diffuso delle membrane basali glomerulari, con componente essudativa: granulociti e monociti nelle anse (colorazione PAS).

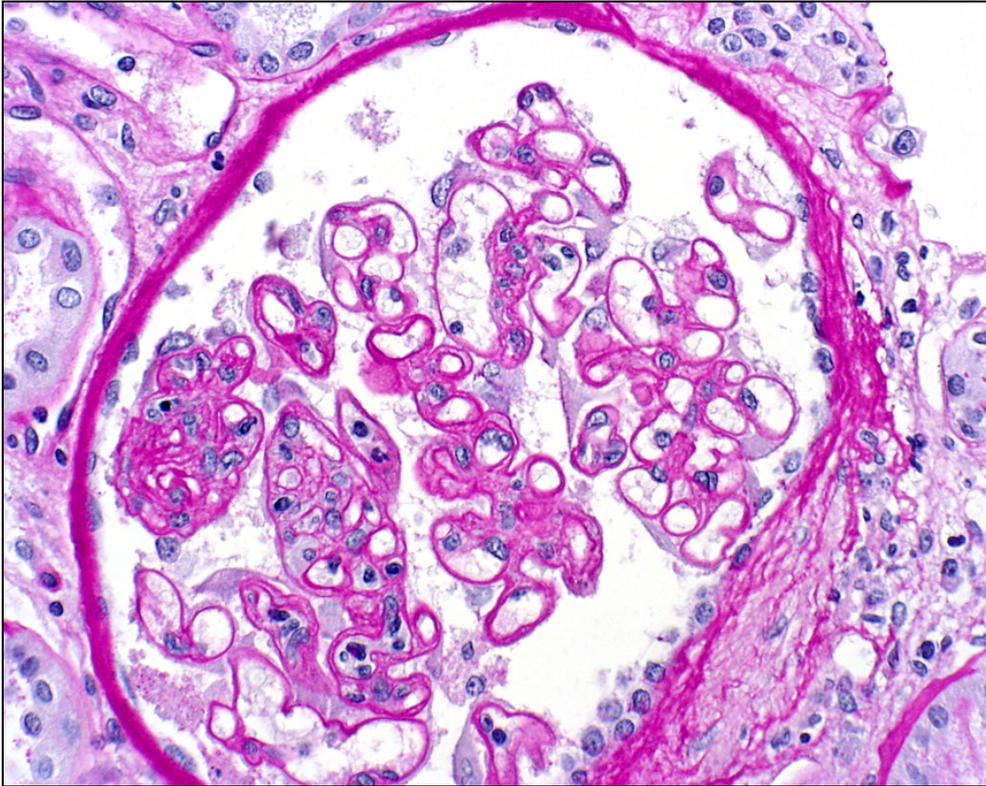


Figura 3. Glomerulopatia Cronica da Trapianto: sdoppiamento segmentale delle membrane basali glomerulari (colorazione PAS).

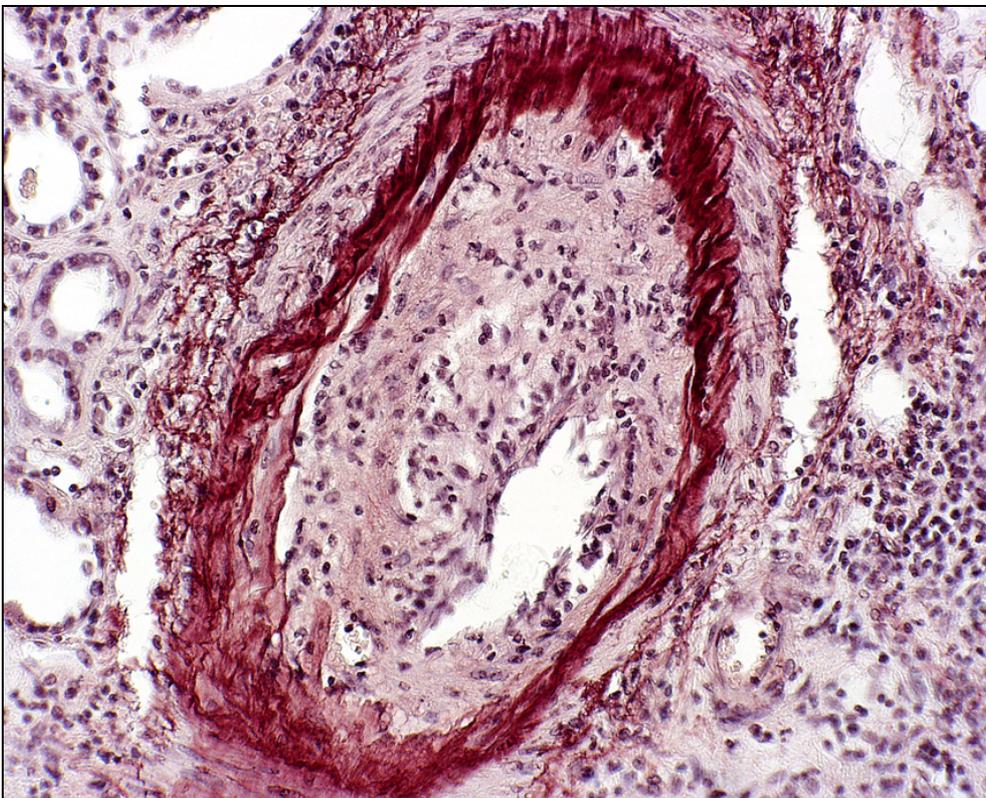


Figura 4. Endoarterite Proliferativa: inspessimento intimale con presenza di foam cells e riduzione del lume vascolare (colorazione con orceina).

La diagnostica del rigetto cronico umorale è estremamente complessa: come riportato da Halloran e coll (14) molti casi di glomerulopatia cronica trapianto, pur associati a presenza nel siero di DSA, sono C4d negativi così come è possibile documentare casi di glomerulopatia cronica da trapianto C4d positiva in assenza di positività anticorpale; entrambe queste condizioni sono comunque a rischio di fallimento del trapianto. In considerazione di tali difficoltà classificative e diagnostiche, l'ultima revisione della classificazione di Banff (38) ha introdotto il termine di "rigetto cronico umorale sospetto", da riservare ai casi in cui il C4d (in presenza di positività anticorpale) o gli anticorpi antidonatore (in presenza di positività del C4d) non possano essere dimostrati pur in presenza di evidenza morfologica di danno tissutale anticorpo-mediato.

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Lo studio si pone come obiettivo quello di identificare le lesioni morfologiche riscontrabili in pazienti portatori di trapianto di rene da donatore deceduto sottoposti a biopsia renale per comparsa di disfunzione tardiva dell'organo e di valutarne l'impatto sulla sopravvivenza del rene trapiantato.

## **PAZIENTI E METODI**

Il seguente studio, prospettico monocentrico, condotto tra marzo 2004 e dicembre 2008, è stato rivolto a tutti i pazienti sottoposti a trapianto di rene da donatore cadavere presso la Sezione e U.O. di Nefrologia dell'Università e degli Spedali Civili di Brescia tra gennaio 1982 e settembre 2008. Sono stati considerati solamente i pazienti con più di dodici mesi di osservazione, regolarmente seguiti presso l'Ambulatorio Divisionale della struttura, portatori di I o II trapianto con creatininemia plasmatica non superiore a 2 mg/dl e con proteinuria inferiore ad un grammo nelle 24 ore alla fine dei primi 12 mesi di trapianto.

E' stata definita disfunzione tardiva del rene trapiantato la comparsa, dopo almeno un anno dal trapianto, di incremento della creatininemia maggiore al 30% del valore basale registrato al sesto mese post-trapianto e/o di proteinuria superiore al grammo nelle 24 ore. Sono stati arruolati nello studio tutti i pazienti che, per comparsa di disfunzione tardiva del graft, sono stati sottoposti a biopsia renale e a contemporanea ricerca di anticorpi anti-HLA nel siero.

Di ogni paziente sono stati raccolti i seguenti dati: data di nascita, sesso, durata del trattamento dialitico pre-trapianto, data del trapianto, età al trapianto, numero dei trapianti, età del donatore, numero di compatibilità in AB e DR, percentuale di anticorpi reattivi su pannello (PRA) al trapianto, anuria post-trapianto, numero di rigetti nel primo anno post-trapianto, status al termine dell'osservazione con relative eventuali cause di morte e di perdita del rene trapiantato. Sono inoltre stati registrati i valori di creatinina a sei mesi dal trapianto, alla biopsia e a dodici, ventiquattro e trentasei mesi dall'esecuzione della stessa.

### **Biopsia renale**

Nei pazienti con disfunzione tardiva del rene trapiantato, il protocollo di studio prevedeva l'esecuzione di agobiopsia renale. Previa acquisizione di consenso informato ed in assenza di controindicazioni assolute, la biopsia renale veniva eseguita in regime di ricovero o di Day Hospital.

Sempre preceduta da valutazione della coagulazione mediante controllo di conta piastrinica, tempo di protrombina, INR e tempo di tromboplastina parziale, nonché del tempo di sanguinamento mediante test di Ivy (valore normale  $\leq 7$  minuti), la manovra veniva eseguita, sempre sotto guida ecografica, mediante utilizzo di un ago di 18 Gouge fino a dicembre 2006 e successivamente di 16 Gouge. Veniva sempre prelevato un campione per la valutazione in microscopia ottica (MO), eventualmente associato a prelievo per immunofluorescenza (IF) e/o microscopia elettronica (ME) laddove clinicamente indicato (sospetto di recidiva o comparsa de novo di glomerulonefrite).

Tutte le biopsie renali eseguite venivano inviate al 2° Servizio di Anatomia Patologica degli Spedali Civili di Brescia, valutate sempre dallo stesso patologo e refertate secondo la classificazione di Banff 1997-2005.

I campioni destinati alla valutazione in MO venivano fissati in Bouin Duboscq (acido picrico, formalina ed acido acetico), inclusi in paraffina e poi sottoposti a processazione standard con taglio in sezioni da 2  $\mu\text{m}$  e colorati con le quattro colorazioni standard previste per la biopsia renale (ematossilina-eosina, PAS, tricromica ed argentea secondo Jones). Per la valutazione in IF, i campioni venivano congelati con isopentano e tagliati al criostato, mentre per la valutazione in ME venivano fissati in glutaraldeide.

Veniva posta diagnosi di rigetto cronico in presenza di endoarterite proliferativa e/o di glomerulopatia cronica da trapianto (definita precoce se focale e segmentale, conclamata se diffusa). In ogni biopsia era inoltre sempre valutata l'assenza o presenza di glomerulite, atrofia tubulare/fibrosi interstiziale, tubulite e arteriolopatia ialina.

In tutti i casi veniva inoltre effettuata la ricerca di C4d su tessuto con tecnica di immunistochimica su materiale incluso in paraffina. Veniva definita positività la presenza di C4d in più del 25% dei capillari peritubulari sia corticali che midollari e/o delle anse glomerulari (anche come unica sede di deposizione).

Di ogni biopsia renale venivano considerati l'intervallo di tempo intercorso dal trapianto, la motivazione clinica che giustificava l'esecuzione della biopsia stessa (comparsa di peggioramento

funzionale, proteinuria > 1 grammo/24 ore o entrambi) e la relativa data di comparsa, calcolandone l'intervallo dalla data di trapianto.

### **Anticorpi anti-donatore**

Il protocollo di studio prevedeva al momento della biopsia di ricerca su siero di anticorpi anti-HLA, anti-donatore specifici (DSA) e non, la cui ricerca è stata eseguita presso il Centro di Immunologia dei Trapianti di Organi e Tessuti dell'Ospedale Maggiore Policlinico di Milano con tecnica Bead Array (Luminex).

### **Analisi statistica**

Dei vari fattori considerati, è stata eseguita la statistica descrittiva; i dati sono stati confrontati usando il test t di Student o il test di Wilcoxon in base alla distribuzione dei dati. Le frequenze sono state confrontate con il test  $\chi^2$ -quadro. Le curve di sopravvivenza sono state ottenute con analisi univariata (Kaplan-Meier con confronto mediante logrank test). L'analisi statistica è stata condotta con STATGRAPHICS® *Plus* versione 5.0. Il livello di significatività utilizzato è stato  $p < 0.05$ .

## RISULTATI

Nel periodo compreso tra marzo 2004 e dicembre 2008, 642 pazienti erano regolarmente seguiti presso il Centro Trapianti di Rene dell'U.O. di Nefrologia dell'Università degli Studi e degli Spedali Civili di Brescia. Di questi, 529 (82%) sono stati arruolati nello studio, mentre 113 (18%) sono stati esclusi in quanto già affetti da disfunzione del rene trapiantato precedentemente all'inizio dello studio. In particolare, dei 113 pazienti esclusi, 78 (69%) presentavano creatininemia > 2 mg/dl, 30 (27%) proteinuria > 1grammo/24 ore e 5 (4%) entrambe le alterazioni (figura 5).

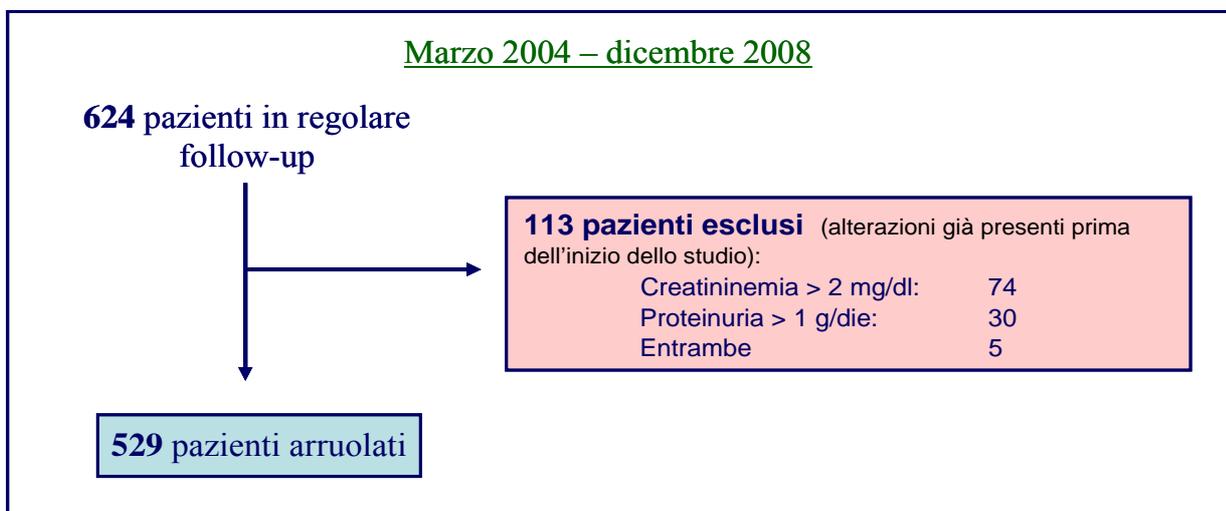


Figura 5. Pazienti arruolati nello studio.

Durante l'osservazione, 134 dei 529 pazienti arruolati (25%) hanno sviluppato disfunzione del rene trapiantato, manifestatosi clinicamente con peggioramento funzionale in 74 casi (56%), con proteinuria superiore ad 1 grammo/24 ore in 30 casi (22%) e con peggioramento funzionale associato a proteinuria dosabile in 30 pazienti (22%). Nel corso dello studio 109 (81%) dei 134 pazienti con disfunzione tardiva del rene trapiantato, sono stati sottoposti a biopsia renale di controllo. Nell'ambito delle diverse cause di disfunzione considerata (peggioremento funzionale, comparsa di proteinuria o entrambe) la percentuale di pazienti sottoposti a biopsia renale è risultata sovrapponibile: sono infatti stati sottoposti a biopsia 52 (91%) dei 57 pazienti con peggioramento funzionale, 23 (82%) dei 28 con proteinuria > 1 g/die e 18 (75%) dei 24 pazienti con entrambe le alterazioni (P=NS). Sono state considerate 93 (85%) delle 109 biopsie renali eseguite, mentre 16

sono state escluse per non aderenza al protocollo (non effettuato dosaggio degli anticorpi antiHLA al momento della biopsia).

### **Popolazione in studio**

I 93 pazienti sottoposti a biopsia renale erano stati trapiantati tra gennaio 1982 ed agosto 2007. L'età media al trapianto era di  $46 \pm 13$  anni (mediana 46 anni; range 18-70 anni); 30 (32%) erano femmine e 63 (68%) erano maschi. L'età dialitica media della popolazione era di  $4.8 \pm 3.5$  anni (mediana 4.0 anni; range 0.6-20.1 anni).

Ottanta pazienti (86%) erano al I trapianto, mentre 13 (14%) erano al II trapianto di rene. L'età media del donatore era pari a  $44 \pm 17$  anni (mediana 48 anni; range 10-77 anni). Il tempo medio di ischemia fredda era di  $15 \pm 3$  ore. Dopo il trapianto, 32 pazienti (34%) avevano presentato ritardata ripresa funzionale con durata media dell'anuria post-trapianto di 10 giorni. Trentotto pazienti (41%) avevano presentato almeno un episodio di rigetto durante i primi 6 mesi post-trapianto, mentre 46 (49%) entro il dodicesimo mese post-trapianto.

Per quanto riguarda il rischio immunologico al trapianto, i dati di incompatibilità AB tra donatore e ricevente erano disponibili in 81 pazienti: in 55 (68%) di essi vi erano al massimo due incompatibilità, mentre più di due incompatibilità erano presenti in 26 casi (32%). I dati riguardanti la percentuale di anticorpi reattivi su pannello (PRA) erano disponibili in 81 pazienti: di questi solamente 3 (4%) presentavano positività superiore al 50%.

L'intervallo di tempo mediamente intercorso tra il trapianto e la biopsia renale era di  $7.4 \pm 6.3$  anni (mediana 5.1 anni; range 1.0-25.6 anni).

Delle 93 biopsie considerate, 52 (56%) venivano eseguite per peggioramento funzionale, 23 (25%) per comparsa di proteinuria superiore ad 1 grammo/die e 18 (19%) per peggioramento funzionale associato a proteinuria dosabile (figura 6).

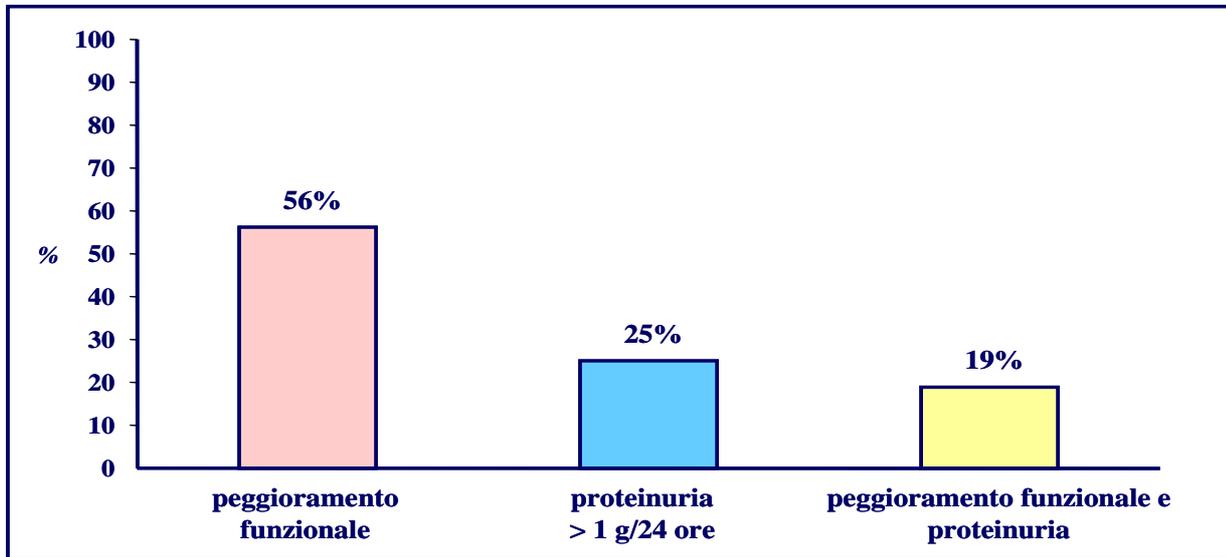


Figura 6. Motivazione clinica delle biopsie renali eseguite

Al momento della biopsia, i pazienti presentavano valori medi di creatinina (s-Creat) di  $2.7 \pm 1.4$  mg/dl (mediana 2.4 mg/dl; range 1.1-11.4 mg/dl). Come riportato in tabella I, nei pazienti sottoposti a biopsia renale per comparsa di peggioramento funzionale più o meno associato a proteinuria si registravano valori medi di creatininemia significativamente superiori a quelli dei pazienti biopsiati per comparsa di sola proteinuria isolata ( $p = 0.0009$  e  $p < 0.0001$ ).

Tabella I. Creatinina (s-Creat) sierica alla biopsia renale

Motivo della biopsia	n°	s-Creat (mg/dl)		
		media±DS	mediana	range
Peggioramento funzionale	52	$2.9 \pm 1.5$	2.4	1.6-11.4
Proteinuria > 1 gr/die	23	$1.8 \pm 0.5$	1.8	1.1-3.3
Peggioramento funzionale + proteinuria > 1 gr/die	18	$3.2 \pm 1.4$	2.9	1.8-7.7

$p$  peggioramento funzionale vs proteinuria: 0.0009

$p$  peggioramento funzionale + proteinuria vs proteinuria: <0.0001

Dopo 12 mesi dalla biopsia i pazienti presentavano una creatininemia media di  $2.4 \pm 1.1$  mg/dl (mediana 2.2 mg/dl; range 1.1-7.0 mg/dl), risultata non significativamente differente da quella registrata al momento della biopsia renale (p:NS).

Per quanto riguarda la terapia immunosoppressiva al momento della biopsia renale, in 76 pazienti (82%) lo schema immunosoppressivo prevedeva l'utilizzo di inibitori delle calcineurine (tacrolimus in 31 casi e ciclosporina in 45 casi) e di steroide in 48 (52%) pazienti.

La durata dell'osservazione dopo la biopsia renale era di  $3.3 \pm 1.8$  anni (mediana 3.7 anni).

La popolazione in studio è stata suddivisa in due gruppi in base alla presenza/assenza alla biopsia renale di lesioni morfologiche compatibili con rigetto cronico. Glomerulopatia cronica da trapianto era riscontrata nelle biopsie renali di 49 (53%) pazienti (gruppo "GCT") mentre non era presente in nessuna delle biopsie eseguite nei restanti 44 (47%) pazienti (gruppo "no-GCT").

### **Caratteristiche generali**

#### **▪ Pazienti con glomerulopatia cronica da trapianto**

I 49 pazienti con GCT erano 20 (41%) femmine e 29 (59%) maschi con età media al trapianto di  $45 \pm 13$  anni (mediana 44 anni; range 18-67 anni) ed età dialitica media pari a  $5.1 \pm 3.8$  anni (mediana 4.5 anni; range 0.6-20.1 anni).

Quarantuno pazienti (84%) erano al I trapianto, mentre 8 (16%) erano al II trapianto. L'età media del donatore era di  $41 \pm 19$  anni (mediana 46 anni; range 10-70 anni); il tempo medio di ischemia fredda era di  $15 \pm 4$  ore. Dopo il trapianto, il 47% dei pazienti di questo gruppo aveva presentato ritardata ripresa funzionale con durata media dell'anuria post-trapianto di 10 giorni. Al trapianto, 16 (33%) pazienti presentavano più di due incompatibilità in AB e 2 (4%) pazienti presentavano positività della PRA superiore al 50%. Venti pazienti (41%) avevano presentato almeno un episodio di rigetto durante i primi 6 mesi post-trapianto, mentre 24 (49%) entro il dodicesimo mese post-trapianto.

▪ **Pazienti senza glomerulopatia cronica da trapianto**

I 44 pazienti senza GCT alla biopsia renale, 10 (23%) femmine e 34 (77%) maschi, presentavano un'età media al trapianto di  $49\pm 13$  anni (mediana 50 anni; range 21-70 anni) ed età dialitica media pari a  $4.4\pm 3.2$  anni (mediana 3.9 anni; range 0.6-17.3 anni).

Trentanove pazienti (89%) erano al I trapianto, mentre 5 (11%) erano al II trapianto. L'età media del donatore era di  $47\pm 15$  anni (mediana 49 anni; range 16-73 anni); il tempo medio di ischemia fredda era di  $15\pm 3$  ore. Nove (20%) pazienti di questo gruppo avevano presentato anuria post-trapianto (durata media: 8 giorni). Al trapianto, 10 (23%) pazienti presentavano più di due incompatibilità in AB; 1 (2%) solo paziente presentava positività della PRA superiore al 50%. Almeno un episodio di rigetto entro il sesto e dodicesimo mese post-trapianto era stato osservato rispettivamente in 12 (27%) e 16 (36%) pazienti di questo gruppo.

Il confronto delle caratteristiche generali dei pazienti appartenenti ai due diversi gruppi è riportato in tabella II.

Tabella II. Caratteristiche generali dei pazienti dei due gruppi con e senza GCT

	<b>Gruppo GCT (N=49)</b>	<b>Gruppo no-GCT (N=44)</b>	<b>p</b>
Sesso maschile (%)	29 (59%)	34 (77%)	NS
Età al trapianto ( <i>anni</i> )	45±13	49±13	NS
Età dialitica ( <i>anni</i> )	5.1±3.8	4.4±3.2	NS
II trapianti (%)	8 (16%)	5 (11%)	NS
Età donatore ( <i>anni</i> )	41±19	47±15	NS
Ischemia fredda ( <i>ore</i> )	15±4	15±3	NS
Pazienti con più di 2 incompatibilità in AB	16 (33%)	10 (23%)	NS
Pazienti con PRA > 50% (%)	2 (4%)	1 (2%)	NS
Pazienti con anuria post-trapianto (%)	23 (47%)	9 (20%)	0.0073
Pazienti con almeno un rigetto entro il 6° mese (%)	20 (41%)	12 (27%)	NS
Pazienti con almeno un rigetto entro il 12° mese (%)	24 (49%)	16 (36%)	NS

### **Caratteristiche alla biopsia renale**

#### ▪ **Pazienti con glomerulopatia cronica da trapianto (gruppo “GCT”)**

I pazienti di questo gruppo venivano sottoposti a biopsia renale dopo un intervallo medio dal trapianto di 9.3±6.7 anni (mediana 7.2 anni; range 1-26 anni). La disfunzione tardiva del rene trapiantato si manifestava clinicamente con peggioramento funzionale in 19 (38%) casi, con comparsa di proteinuria > 1 g/die in 15 casi (31%) e con entrambe le alterazioni in 15 (31%) pazienti.

Al momento della biopsia, i pazienti presentavano valori medi di creatinina di  $2.9 \pm 1.3$  mg/dl (mediana 2.6 mg/dl; range 1.3-7.7 mg/dl).

Per quanto riguarda la terapia immunosoppressiva al momento della biopsia renale, in 37 pazienti (76%) lo schema immunosoppressivo prevedeva l'utilizzo di inibitori delle calcineurine (tacrolimus in 12 casi e ciclosporina in 25 casi) e di steroide in 27 (55%) pazienti.

La durata dell'osservazione dopo la biopsia renale era di  $2.7 \pm 1.8$  anni (mediana 3.0 anni).

#### ▪ **Pazienti senza glomerulopatia cronica da trapianto**

Nei pazienti con rigetto cronico, la biopsia renale veniva eseguita mediamente dopo  $5.3 \pm 5.2$  anni (mediana 3.6 anni; range 1.0-24.2 anni) ed era motivata da comparsa di peggioramento funzionale in 33 (75%) casi, da comparsa di proteinuria  $> 1$  g/die in 8 casi (18%) casi e con entrambe le alterazioni in 3 (7%) pazienti.

Al momento della biopsia, i pazienti presentavano valori medi di creatinina di  $2.4 \pm 1.5$  mg/dl (mediana 2.3 mg/dl; range 1.1-11.4 mg/dl); 39 (87%) pazienti erano in terapia con inibitori delle calcineurine (19 con tacrolimus e 20 con ciclosporina) e 21 (48%) erano in terapia con steroide.

La durata dell'osservazione dopo la biopsia renale era di  $4.1 \pm 1.4$  anni (mediana 4 anni).

Il confronto delle caratteristiche dei due gruppi di pazienti al momento della biopsia renale è riportata in tabella III.

Tabella III. Caratteristiche dei due gruppi alla biopsia renale

	<b>Gruppo GCT (N=49)</b>	<b>Gruppo no-GCT (N=44)</b>	<b>p</b>
Intervallo trapianto-biopsia ( <i>anni</i> )	9.3±6.7	5.3±5.2	0.002
s-Creat alla biopsia (mg/dl)	2.9±1.3	2.4±1.5	NS
Pazienti con proteinuria alla biopsia (%)	30 (61%)	11 (25%)	0.0004
FU post-biopsia ( <i>anni</i> )	2.7±1.8	4.1±1.4	0.0001
Pazienti in terapia con Tacrolimus alla biopsia (%)	12 (24%)	19 (43%)	NS
Pazienti in terapia con Ciclosporina alla biopsia (%)	25 (51%)	20 (45%)	NS

### **Diagnosi morfologiche**

#### ▪ **Pazienti con glomerulopatia cronica da trapianto**

In tutti i 49 pazienti di questo gruppo la biopsia renale documentava presenza di glomerulopatia cronica da trapianto, associata ad endoarterite proliferativa in 9 casi (18%). La GCT risultava essere segmentale in 17 (35%) casi e diffusa nei restanti 32 casi (65%). Il riscontro di rigetto cronico era associato a recidiva di glomerulonefrite proliferativa mesangiale da IgA in 2 (4%) pazienti e a rigetto acuto II A in 1 (2%) paziente.

#### ▪ **Pazienti senza glomerulopatia cronica da trapianto**

In assenza di rigetto cronico, la causa della disfunzione del rene trapiantato era sostenuta da recidiva di glomerulonefrite (R-GN) in 12 (27%) pazienti, atrofia tubulare/fibrosi interstiziale (IF/TA) in 10 (23%) pazienti, nefrite interstiziale da Poliomavirus BK (N-BKV) in 4 (9%) casi e da

rigetto acuto in 10 (23%) casi. In 8 (18%) pazienti, la biopsia renale documentava infine presenza di lesioni lievi ed aspecifiche, prive di significato patologico (figura 7).

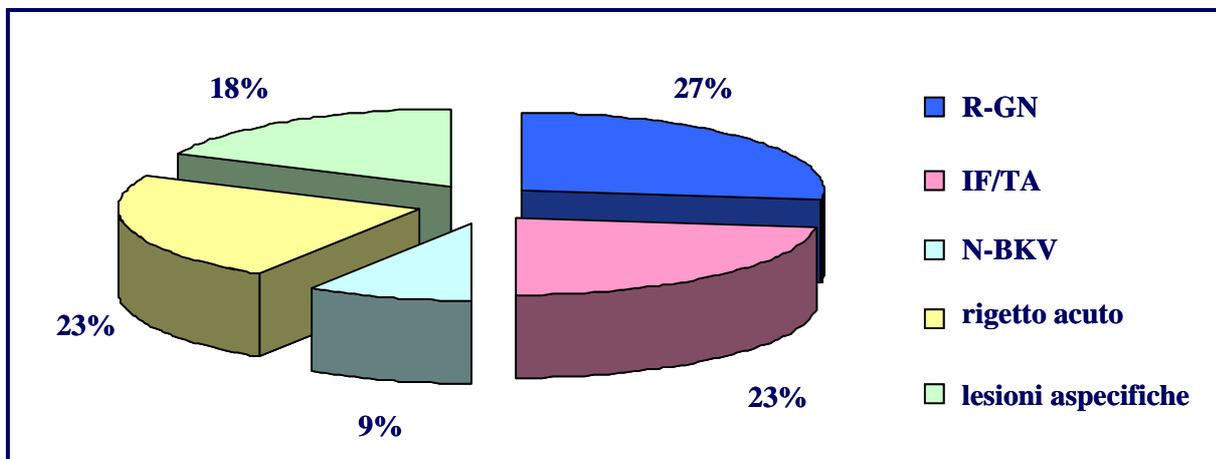


Figura 7. Diagnosi morfologiche in assenza di rigetto cronico

La classificazione delle recidive di glomerulonefrite osservate è riportata in figura 8. .

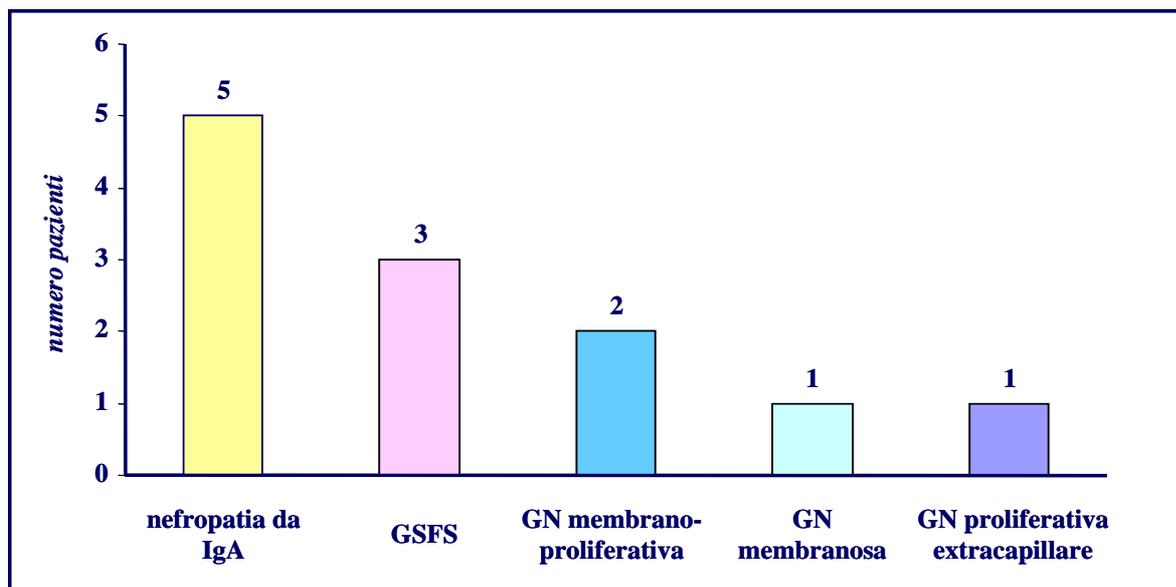


Figura 8. Classificazione delle recidive di glomerulonefrite nel gruppo "no-GCT".

Nell'ambito dei 10 casi di rigetto acuto osservati, 4 erano di tipo cellulare, 4 di tipo umorale e 2 di tipo misto (cellulare ed umorale).

### Altre lesioni morfologiche riscontrate alla biopsia renale

I dati relativi al riscontro di glomerulite, tubulite, atrofia tubulare/fibrosi interstiziale e ialinosi arteriolare nelle biopsie dei pazienti con e senza glomerulopatia da trapianto, sono riportati in tabella IV.

Tabella IV. Lesioni morfologiche diverse da GCT nei due gruppi.

Lesione morfologica	Gruppo "GCT" N=49	Gruppo "no-GCT" N=44	p
glomerulite	39 (76%)	7 (16%)	< 0.0001
tubulite	3 (6%)	14 (32%)	0.0014
Atrofia tubulare/fibrosi interstiziale	39 (80%)	34 (77%)	NS
Ialinosi arteriolare	32 (65%)	22 (50%)	NS

In particolare, nei pazienti del gruppo senza glomerulopatia cronica da trapianto, le lesioni morfologiche sopra citate risultavano essere così distribuite:

- glomerulite: veniva riscontrata in 3 (25%) dei 12 pazienti con recidiva di glomerulonefrite (1 GSFS e 2 glomerulonefriti membrano-proliferative) , in 3 (30%) dei 10 pazienti con rigetto acuto (2 umorali e 1 cellulare), in 1 (10%) dei 10 pazienti con diagnosi di IF/TA; non era presente in nessuno dei pazienti con diagnosi istologica di nefrite da Poliomavirus BK e con lesioni aspecifiche (figura 9, pannello a).
- tubulite: era presente in tutti e 10 (100%) i pazienti con rigetto acuto, in 1 (10%) dei 10 pazienti con diagnosi istologica di IF/TA, in 2 (50%) dei 4 pazienti con nefrite da

Poliomavirus BK e in 1 (13%) degli 8 pazienti con lesioni aspecifiche; non era presente in nessuno dei casi di recidiva di glomerulonefrite (figura 9, pannello b)

- atrofia tubulare e fibrosi interstiziale: erano presente in 10 (83%) dei pazienti con recidiva di glomerulonefrite, in 6 (60%) dei 10 pazienti con rigetto acuto (4 cellulari, 1 misto e 1 umorale), in tutti e 10 (100%) i pazienti con diagnosi di IF/TA, in tutti e 4 (100%) i pazienti con nefrite da Poliomaivrus BK e in 4 (50%) degli 8 pazienti con lesioni aspecifiche (figura 9, pannello c)
- ialinosi arteriolare: veniva riscontrata in 9 (75%) dei 12 casi di recidiva di glomerulonefrite, in 2 (17%) dei 12 casi di rigetto acuto (1 cellulare e 1 misto), in 9 (90%) dei casi di IF/TA e in 2 (25%) degli 8 casi con lesioni aspecifiche; non era presente in nessuno dei 4 casi di nefrite da Poliomaivrus BK (figura 9, pannello d).

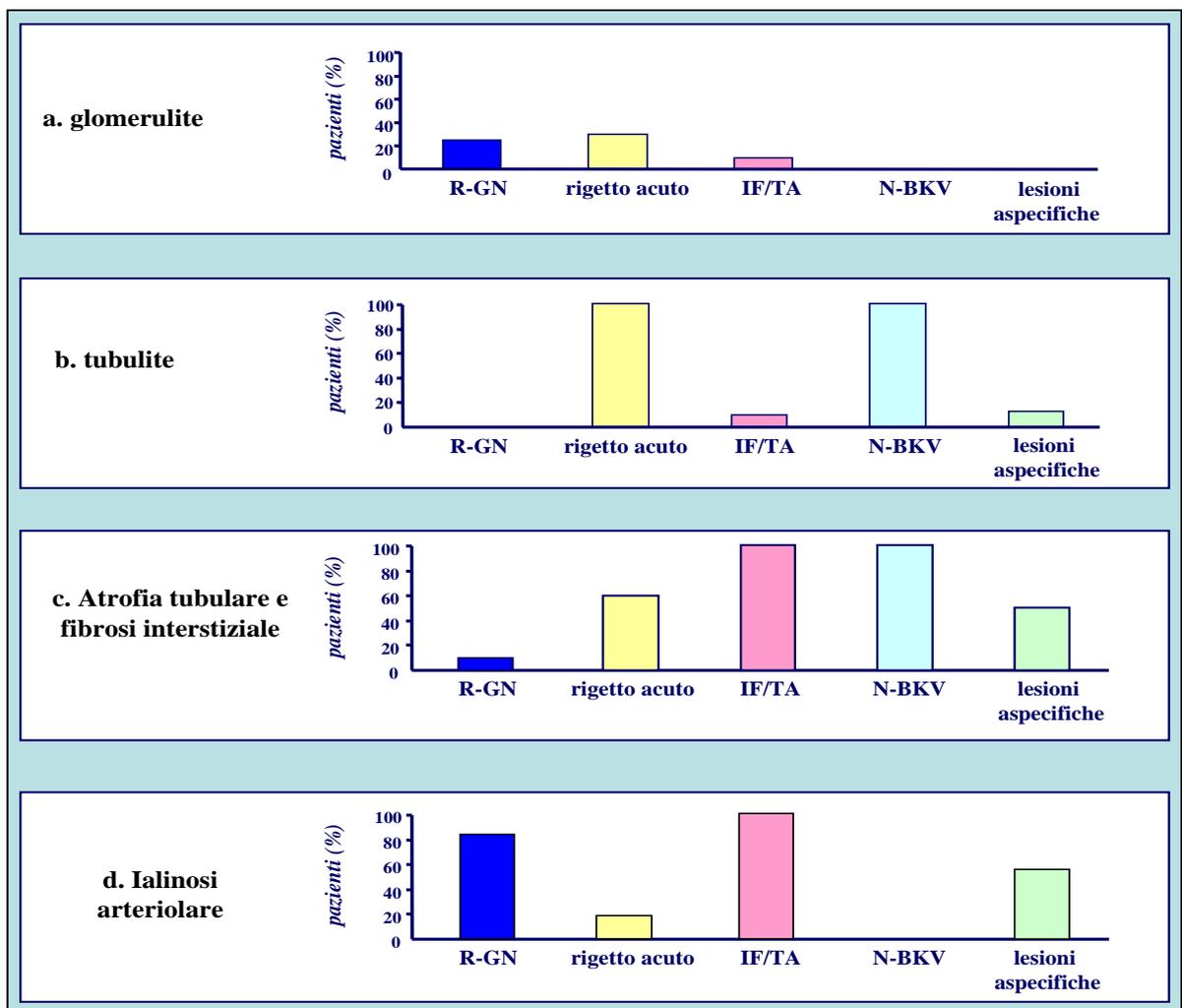


Figura 9. Gruppo “no-GCT”: distribuzione delle lesioni morfologiche nelle diverse diagnosi.

## Presenza di C4d su tessuto

### ▪ **Pazienti con glomerulopatia cronica da trapianto**

La ricerca su tessuto del C4d veniva effettuata in tutte le 49 biopsie renali eseguite dai pazienti di questo gruppo, risultando positiva in 41 casi (84%). In questi pazienti, veniva posta diagnosi istologica di “rigetto cronico umorale”.

### ▪ **Pazienti senza glomerulopatia cronica da trapianto**

Il C4d risultava positivo in 11 (25%) delle 44 biopsie eseguite, dato statisticamente inferiore a quanto osservato nel gruppo con glomerulopatia cronica da trapianto ( $p < 0.0001$ ).

Nell’ambito delle diverse diagnosi istologiche, l’indagine risultava positiva in 6 (60%) dei 10 pazienti con rigetto acuto (3 con rigetto acuto misto e 3 con rigetto acuto umorale), in 3 dei 12 pazienti (25%) dei pazienti con recidiva di glomerulonefrite (1 con diagnosi di recidiva di glomerulonefrite membrano-proliferativa, l’altro con diagnosi di recidiva di IgA) e in 2 degli 8 pazienti (25%) con lesioni morfologiche aspecifiche. In nessuna delle biopsie con evidenza di IF/TA e di nefrite da Poliomavirus-BK veniva riscontrata C4d-positività.

La frequenza della positività del C4d nelle diverse diagnosi istologiche è riportata in figura 10.

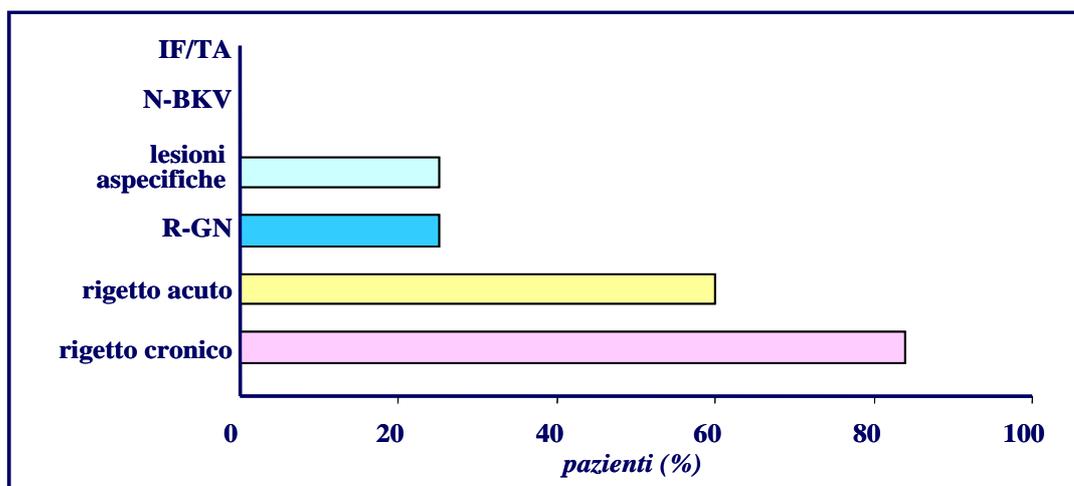


Figura 10. Positività del C4d su tessuto in tutte le diagnosi.

## Alloanticorpi anti-donatore

### ▪ **Pazienti con glomerulopatia cronica da trapianto**

La ricerca di alloanticorpi anti-donatore su siero eseguita al momento della biopsia renale documentava positività degli anticorpi anti-HLA in 35 (71%) dei 49 pazienti di questo gruppo. Di questi, 16 (46%) avevano anticorpi anti-donatore specifici (DSA) e 14 (40%) avevano anticorpi non donatore specifici (non DSA); in 5 (14%) casi non si disponeva della tipizzazione HLA del donatore per cui non era possibile determinare la specificità anticorpale (figura 11). In 31 casi (89%), la positività anticorpale si associava a presenza di C4d su tessuto.

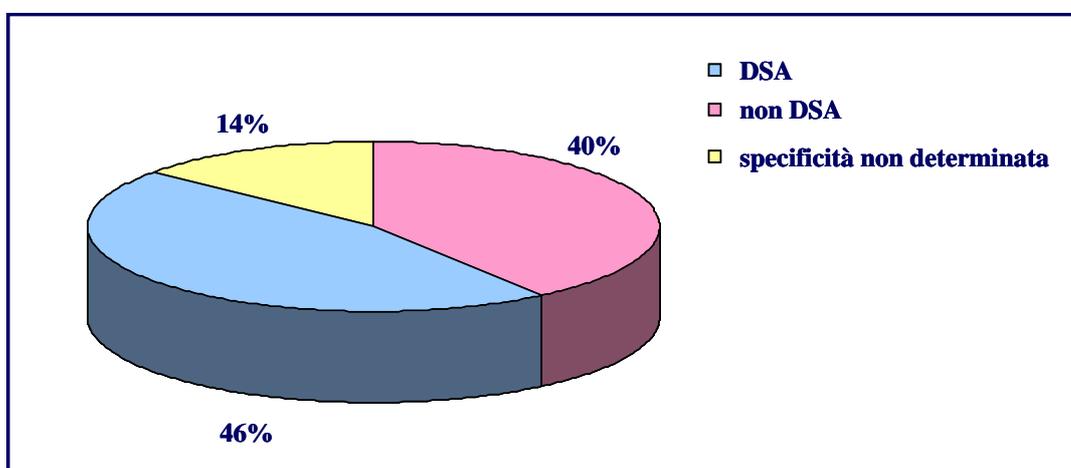


Figura 11. Specificità anticorpale anti-HLA dei 35 pazienti con anticorpi e GCT.

### ▪ **Pazienti senza glomerulopatia cronica da trapianto**

Tredici (30%) dei 44 pazienti di questo gruppo presentavano positività degli anticorpi anti-HLA al momento della biopsia ( $p=0.0001$  con gruppo GCT). Di questi, 7 (54%) avevano DSA, 5 (38%) avevano anticorpi anti-HLA non donatore specifici; in 1 (8%) caso non era possibile determinare la specificità anticorpale a causa nella mancanza della tipizzazione HLA del donatore.

La presenza di almeno un marker di attività umorale (C4d e/o Ab anti-HLA) era riscontrata nel 92% dei pazienti del gruppo GCT e nel 43% di quelli del gruppo “no-GCT” ( $p=0.0001$ ).

## Andamento della funzione renale

Per la valutazione dell'andamento della funzione renale nel tempo sono stati considerati i valori di creatininemia registrati al sesto mese post-trapianto (valore basale), al momento della biopsia renale, a 12,24 e 36 mesi dalla biopsia. I risultati ottenuti sono riportati in tabella V e rappresentati graficamente in figura 12.

Tabella V. Andamento della funzione renale nei pazienti con e senza GCT con rene funzionante

s-Creat	Gruppo "GCT" (N=49)		Gruppo "no-GCT" (N=44)		p
	n° (%)	s-Creat (mg/dl)	n° (%)	s-Creat (mg/dl)	
VI mese post-trapianto	49 (100%)	1.4±0.3	44 (100%)	1.4±0.3	NS
alla biopsia	49 (100%)	2.9±1.3	44 (100%)	2.4±1.5	NS
12 mesi dopo la biopsia	38 (78%)	2.7±1.2	40 (91%)	2.1±0.9	0.013
24 mesi dopo la biopsia	30 (61%)	2.8±1.2	38 (86%)	2.1±0.9	0.004
36 mesi dopo la biopsia	24 (49%)	2.9±1.1	35 (79%)	2.1±0.7	0.0004

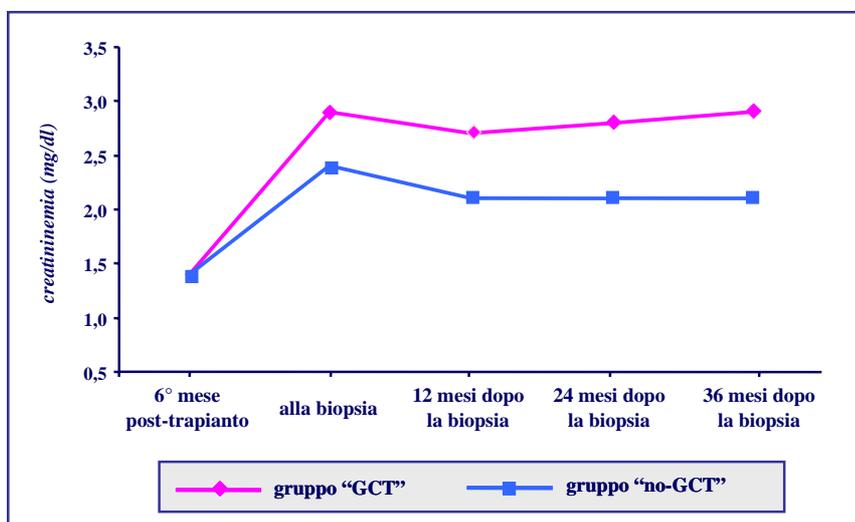


Figura 12. Andamento della funzione renale nei pazienti con e senza GCT con rene funzionante.

## Sopravvivenza dei pazienti

Durante l'osservazione, 5 (5%) dei 93 pazienti considerati venivano persi per decesso.

Tre appartenevano al gruppo con glomerulopatia cronica da trapianto: le rispettive cause di decesso erano rappresentate da neoplasia in due casi e da morte improvvisa da causa non determinata in un caso. Nel gruppo senza glomerulopatia cronica da trapianto si osservavano 2 decessi uno per ictus e uno per neoplasia.

Dopo sei anni di osservazione, la sopravvivenza dei pazienti (figura 12) nei due gruppi era rispettivamente dell'81% (gruppo "GCT") e del 93% (gruppo "no-GCT") (p=NS).

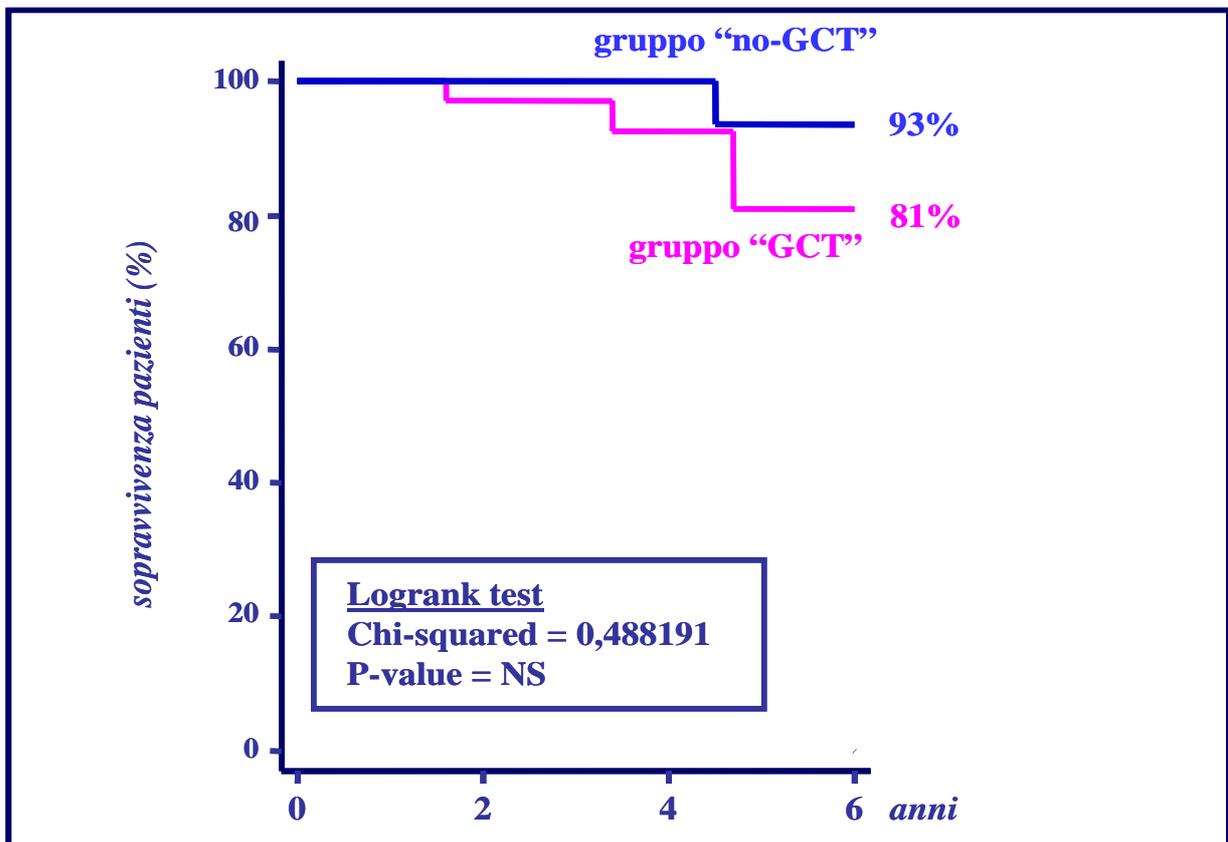


Figura 12. Sopravvivenza dei pazienti nei due gruppi.

## **Sopravvivenza del rene trapiantato**

Durante il periodo di osservazione, 33 (35%) dei 93 pazienti considerati, rientravano in dialisi per perdita del rene trapiantato. Di questi, 27 appartenevano al gruppo con GCT (55%) e 6 al gruppo senza GCT (14%).

### ▪ **Pazienti con glomerulopatia cronica da trapianto**

Dei 27 che perdevano la funzione del rene trapiantato, 25 (93%) presentavano segni istologici di attività umorale (C4d positività), associati a positività nel siero degli anticorpi anti-HLA in 20 (83%) casi. Due (67%) dei 3 pazienti che, pur non presentando segni di attività umorale alla biopsia renale, incorrevano in perdita del graft, presentavano positività anticorpale anti-HLA.

La positività del C4d condizionava negativamente la sopravvivenza del trapianto: dei 42 pazienti C4d positivi, infatti, 25 (60%) perdevano la funzione del rene trapiantato, mentre dei 7 pazienti con negatività del C4d solamente 1 (14%) incorreva in fallimento del trapianto ( $p=0.02$ ).

### ▪ **Pazienti senza glomerulopatia cronica da trapianto**

Nei 6 pazienti che perdevano la funzione del rene trapiantato era stata posta diagnosi istologica di rigetto acuto umorale in 2 casi, di IF/TA in 2 casi e di recidiva di glomerulonefrite (una recidiva di nefropatia da IgA e una di glomerulonefrite membrano-proliferativa) in 2 casi. I 2 pazienti con rigetto acuto umorale presentavano sia C4d positività che positività anticorpale anti-donatore specifica.

A 5 anni dalla biopsia, nei pazienti con e senza glomerulopatia cronica da trapianto, la sopravvivenza del rene trapiantato (figura 13) era rispettivamente pari al 45.3% e del 86.3% ( $p=0.00005$ ).

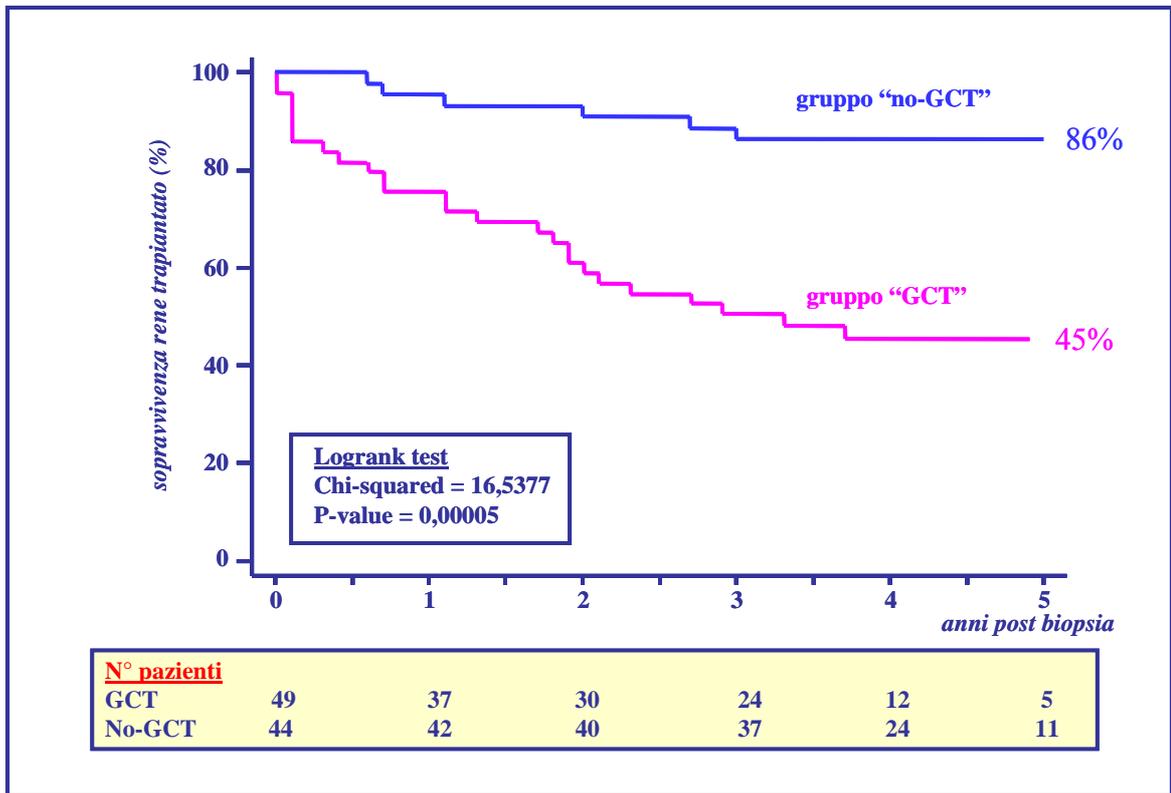


Figura 13. Sopravvivenza del rene trapiantato nei due gruppi

## DISCUSSIONE

Il miglioramento delle tecniche chirurgiche, della terapia immunosoppressiva e delle tecniche di reperimento degli organi, ha determinato negli ultimi anni un significativo incremento dell'attività di trapianto di rene. Il trapianto è diventato pertanto una realtà terapeutica efficace per un sempre maggiore numero di pazienti, permettendo di migliorarne non solo la qualità ma anche la speranza di vita. Tuttavia, se l'ottimizzazione della gestione della terapia immunosoppressiva ha permesso di superare le difficoltà nella gestione del rigetto acuto incontrate in passato (39), la disfunzione cronica dell'organo trapiantato costituisce, insieme con la morte del paziente con rene funzionante, la principale causa di perdita dell'organo a medio-lungo termine (1, 2): l'identificazione delle cause del fallimento tardivo e delle relative strategie terapeutiche è così diventata negli ultimi tempi obiettivo primario della ricerca trapiantologica.

Negli ultimi vent'anni il problema della disfunzione tardiva del trapianto è stato ampiamente trattato in letteratura (40, 41, 42). Sebbene tutti gli autori avessero riconosciuto il ruolo dei fattori immunologici e non nella patogenesi di questo evento, la maggiore attenzione è stata per lungo tempo rivolta all'azione nefrotossica di alcuni tra i principali farmaci immunosoppressori. Questo atteggiamento, se da un lato ha permesso di ottimizzare l'utilizzo dei farmaci disponibili, dall'altro ha distolto l'attenzione dei ricercatori dal tentativo di identificare quale fosse il ruolo svolto dai meccanismi immunologici nella patogenesi del danno dell'organo trapiantato. Solamente a partire dagli anni '90 quest'ultimo aspetto è stato rivalutato (8, 9, 10, 11, 12). La disponibilità di test sierologici in grado di identificare la presenza nel siero di anticorpi anti-HLA e di determinarne la rispettiva specificità, nonché la disponibilità di tecniche di immunoistochimica in grado di determinare la presenza su tessuto di lesioni morfologiche riconducibili all'attività umorale, permette oggi di differenziare lesioni da cause immunologiche da quelle di altra natura.

Il nostro studio ha confermato come la disfunzione cronica del trapianto rappresenti un problema clinicamente molto rilevante: dopo un intervallo medio dal trapianto di 7.4 anni, il 25% della popolazione selezionata ha infatti sviluppato tale problematica clinica. Presente nel 44% dei casi, la proteinuria si è confermata un'importante segno di disfunzione tardiva del graft.

Il fatto che la disfunzione tardiva dell'organo trapiantato possa interessare anche pazienti considerati a basso rischio immunologico, rappresenta un aspetto importante dell'analisi condotta. Analizzando le caratteristiche della popolazione in studio emerge infatti come tra i pazienti arruolati solo il 14% fosse al II trapianto di rene e solamente il 4% fosse immunizzato (PRA > 50%). La bassa incidenza di pazienti ad alto rischio immunologico nella popolazione in studio può essere spiegata da una probabile selezione effettuata al momento dell'arruolamento, legata al fatto di avere escluso dallo studio i pazienti con disfunzione del rene trapiantato (creatinina > 2 mg/dl e/o proteinuria > 1 g/die) nei primi dodici mesi post-trapianto. E' noto infatti come i pazienti ad alto rischio immunologico presentino elevata perdita del rene trapiantato durante i primi anni di trapianto.

Nel nostro studio, non tutti i pazienti che hanno sviluppato disfunzione tardiva del rene trapiantato sono stati sottoposti a biopsia renale: la manovra è infatti stata eseguita nell'81% dei casi. Il motivo per il quale alcuni pazienti non sono stati sottoposti ad approfondimento istologico è stato di ordine clinico od organizzativo (per esempio residenza dei pazienti distante dal Centro) o di rifiuto del paziente; non è stata invece operata selezione dei pazienti stessi come documenta il fatto che la percentuale di pazienti biopsiati per peggioramento funzionale isolato, per proteinuria o per comparsa di entrambe le alterazioni è risultata sovrapponibile (dal 75% al 91%).

Dalla valutazione morfologica delle biopsie è emerso che il 53% delle disfunzioni tardive osservate era da attribuire a fattori immunologici. La glomerulopatia cronica da trapianto, lesione recentemente rivalutata come espressione di eventi umorali rivolti contro l'endotelio vascolare (35,

36) è stata la lesione più rappresentata nella diagnosi di rigetto cronico. E' noto che si tratta di una lesione evolutiva nel tempo, per cui accanto a forme iniziali e segmentali si associano forme evolute e diffuse, che nel nostro studio hanno rappresentato il 65% di tutte quelle osservate, dato che sembrerebbe confermare l'ipotesi che la glomerulopatia cronica da trapianto abbia un decorso subclinico per lungo tempo e si renda manifesta solamente quando la lesione morfologica è più avanzata e meno suscettibile di trattamento. Questa ipotesi, proposta da Chapman (43, 44) anche per le altre lesioni morfologiche renali, ha portato a suggerire come tecnica di monitoraggio, l'impiego di biopsie protocollari nel trapianto da affiancare al monitoraggio clinico.

La ricerca del frammento complementare C4d su tessuto ha permesso di attribuire a meccanismi umorali anticorpo-mediati la patogenesi dell'84% dei casi di rigetto cronico. In accordo con i dati di Mauiyyedi et al (35) e di Regele et al (36), la positività del C4d è risultata strettamente correlata al riscontro istologico di glomerulopatia cronica da trapianto ( $p < 0.0001$ ). Nei casi di glomerulopatia cronica da trapianto C4d negativi, la lesione è verosimilmente da inquadrare più come esito di insulti immunologici di tipo cellulare.

Come per la positività del C4d, anche la positività anticorpale anti-HLA correlava significativamente con la diagnosi di glomerulopatia cronica da trapianto ( $p = 0.0001$ ), in accordo con quanto segnalato in letteratura da Mauiyyedi et al (35) e da Hourmant et al (10). La possibilità di negatività anticorpale pur in presenza di evidenza istologica di rigetto cronico è una evenienza nota in letteratura (14) e può essere attribuita o a transitoria riduzione dei livelli di anticorpi circolanti, non rilevabili dalle metodiche attualmente disponibili o, più frequentemente, alla presenza di anticorpi rivolti contro antigeni diversi da quelli del sistema HLA (MICA, MHC class I-related chain).

Il riscontro istologico di glomerulopatia cronica da trapianto ha condizionato significativamente la sopravvivenza del rene trapiantato. Nei pazienti con rigetto cronico, infatti, la sopravvivenza del rene a 5 anni dalla biopsia è risultata infatti del 41% inferiore rispetto a quella osservata nei pazienti con altre diagnosi. Inoltre, nei casi che mantenevano la funzione dell'organo trapiantato, il riscontro istologico di glomerulopatia cronica da trapianto correlava significativamente con una più spiccata tendenza al peggioramento funzionale.

Per quanto riguarda le altre cause di disfunzione tardiva, l'IF/TA ha avuto un'incidenza del 23%, simile a quella del rigetto acuto (23%) e delle recidive di glomerulonefrite (27%). La bassa frequenza di IF/TA nel nostro studio contrasta con quella riportata da molti autori in letteratura ed in particolare con quella pubblicata da Nankivell nel 2003 (7). Questa differenza può essere attribuibile alle diverse caratteristiche della popolazione in studio e alle diverse tecniche di immunistochimica utilizzate. Il lavoro di Nankivell, infatti, considera biopsie protocolлари effettuate annualmente in pazienti asintomatici con funzione renale stabile, mentre il nostro lavoro documenta le lesioni morfologiche responsabili di un peggioramento clinicamente manifesto. La bassa incidenza di IF/TA da noi osservata è invece in accordo con quanto espresso nella classificazione di Banff del 2005 (37), che ha sottolineato come questo termine dovrebbe essere riservato solamente a forme di disfunzione tardiva del trapianto non altrimenti inquadrabili.

Un altro aspetto degno di nota è rappresentato dall'alta incidenza di rigetto acuto tardivo. E' noto come il rigetto acuto si manifesti solitamente entro il primo anno di trapianto e sia l'espressione di un adattamento immunologico. Gli eventi più tardivi sembrano invece essere associati a scarsa adesione dei pazienti alla terapia o a variazioni terapeutiche. I rigetti acuti da noi osservati si sono rivelati anticorpo-mediati nel 60% dei casi: se l'alta incidenza di rigetto acuto conferma da un lato l'importanza di una corretta aderenza alla terapia anche dopo molti anni dal trapianto, l'elevata

percentuale di rigetti acuti umorali osservata pone dall'altro il problema dell'esistenza di meccanismi non ancora indagati potenzialmente coinvolti nella patogenesi di eventi acuti tardivi.

Una considerazione particolare merita il riscontro di lesioni lievi ed aspecifiche prive di significato patologico osservato nell'8% delle biopsie renali eseguite. E' degno di nota il fatto che il 25% dei casi sia risultato positivo alla ricerca del C4d su tessuto. Questi casi potrebbero essere interpretati come situazioni in cui è presente un meccanismo umorale rivolto contro il rene trapiantato, documentato dalla presenza del C4d, che ha dato manifestazioni cliniche che hanno motivato l'esecuzione della biopsia renale, ma nelle quali sono ancora evidenti lesioni morfologiche conclamate. Questi pazienti sono a nostro avviso da ritenere a rischio di sviluppo di glomerulopatia cronica da trapianto e andrebbero studiati con biopsie renali ripetute nel tempo.

Per meglio comprendere il ruolo delle lesioni croniche nella perdita del rene trapiantato abbiamo poi valutato la presenza di altre lesioni morfologiche quali la ialinosi arteriolare, l'atrofia tubulare e la fibrosi interstiziale, alterazioni patologiche considerate per lungo tempo espressione di nefropatia cronica da trapianto e considerate per anni responsabili del fallimento tardivo del rene trapiantato. L'incidenza di queste lesioni nei pazienti con glomerulopatia cronica da trapianto o altre diagnosi è risultata sovrapponibile in tutti i casi, escludendo quindi un loro coinvolgimento nei risultati clinici. L'unica lesione che è risultata essere significativamente più frequente nei pazienti senza rigetto cronico è stata la tubulite, presente nel 100% dei pazienti con rigetto acuto e nel 50% dei pazienti con nefrite da Poliomavirus BK, dato in accordo con la classificazione diagnostica delle lesioni stesse.

Concludendo, possiamo affermare che questo studio dimostra che l'insorgenza di disfunzione tardiva del rene trapiantato è un evento epidemiologicamente rilevante anche a distanza di tempo dal trapianto. Nell'ambito di questo fenomeno, determinante è il ruolo svolto dai meccanismi immunologici anticorpo-mediati nella patogenesi del rigetto cronico umorale. Diventa pertanto fondamentale, al fine di migliorare la sopravvivenza a lungo termine del trapianto, raggiungere una migliore comprensione dei processi in grado di innescare la risposta anticorpale per mettere in atto strategie preventive e terapeutiche più appropriate.

## BIBLIOGRAFIA

1. Meier-Kriesche H-U, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies?. *Am J Transplant* 2004; 4: 1289-1295
2. Meier-Kriesche H-U, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004; 378-383.
3. Jevnikar AM, Mannon RB. Late kidney allograft loss: what we know about it, and what we can do about it. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3 (S 2): S56- S67
4. Najafian B, Kasiske BL. Chronic allograft nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 149-155
5. Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B. Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 1998; 20: 759-771
6. Young BA, Burdinann EA, Johnson RJ. Cyclosporine A induced arteriopathy in a rat model of chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 1995; 48: 431-438.
7. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326-2333.
8. Halloran PF, Waggymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of anti-class I antibody response. Clinical and pathologic features of anti-class I mediated rejection. *Transplantation* 1990; 49: 85-91.
9. Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of anti-class I antibody response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation* 1992; 53: 550-555.
10. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16 (9): 2804-2812.

11. Mizutani K, Terasaki P, Bignon JD, et al. Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Hum Immunol* 2006; 67 (9): 683-691.
12. Mao Q, Terasaki PI, Cai J, et al. Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am J Transplant* 2007; 7: 864-871.
13. El Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* 2009; 9: 527-535.
14. Einecke G, Sis B, Reeve J, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009; 9: 2520-2531.
15. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation* 2010; 90: 68-74.
16. Feucht HE, Feber E, Gokel MJ, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 464-470.
17. Feucht HE, Feber E, Gokel MJ, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early graft loss. *Kidney Int* 1993; 43: 1333-1338.
18. Collins AB, Scneeberger EE, Pascual MA et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2208-2214.
19. Jeannet M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russel PS. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med* 1979; 282: 111-117.
20. Kissmeyer-Nielsen F, Oslen S, Peterson VP, et al. Hyperacute rejection of kidney allograft, associated with pre-existing antibodies against donor cell. *Lancet* 1966; 2: 662-665.
21. Platt JL. C4d and the fate of organ allografts. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2417-2419.
22. Regele H, Exner M, Watschinger B, et al. Endothelial C4d deposition is associated with inferior kidney allograft outcome independently of cellular rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 2058-2066.

23. Lederer SR, Kluth-Pupper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int* 2001; 59: 334-341.
24. Herzenberg AM, Gill JS, Djurdidjev O, Magil AB. C4d deposition in acute rejection: an independent long-term prognostic factor. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 234-241.
25. Paduval RD, Kadambi PV, Josephson MA, et al. Implication of immunohistochemical detection of C4d along peritubular capillaries in late acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2005; 79: 228-235.
26. Jianghua C, Wenqing X, Huiping W, Juan J, Jianyong W, Qiang H. C4d as a significant predictor for humoral rejection in renal allografts. *Clin Transplant* 2005; 10: 1399-1406.
27. Kawamura N, Tomita M, Hasegawa M, et al. Complement C4d deposition in transplanted kidneys: preliminary report on long-term graft survival. *Clin Transplant* 2005; 19 (S14): S 27- S31.
28. Onitsuka S, Yamoguchi Y, Tanabe K, Takahashi K, Toma H. Peritubular capillary deposition of C4d complement fragment in ABO-incompatible renal transplantation with humoral rejection. *Clin Transplant* 1999; 13 (S1): S33- S37.
29. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypert* 2002; 11: 609-618.
30. Segerer S, Bohming GA, Exner M, et al. When allografts turn DARC. *Transplantation* 2003; 75: 1030-1034.
31. Brauer RB, Baldwin WM, Ibrahim S, Sanfilippo F. The contribution of terminal complement components to acute and hyperacute allograft rejection in the rat. *Transplantation* 1995; 59: 288-293.
32. Qian Z, Hu W, Liu J, Sanfilippo F, Hruban RH, Baldwin WM. Accelerated graft arteriosclerosis in cardiac transplant: complement activation promotes progression of lesions from medium to large arteries. *Transplantation* 2001; 72: 900-906.

33. Sellares J, De Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 2012; 12 (2): 388-399.
34. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713-723.
35. Muiyyedi S, Della Pelle P, Saidman S, et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 574-582.
36. Regele H, Bohmig GA, Habicht A, et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allograft is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2371-2380.
37. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 05 meeting report : differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7: 518-526.
38. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology : updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8: 753-760.
39. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342: 605-612.
40. Gill JS, Tonelli M, Mix CH, Pereira BJJ. The change in allograft function among long-term kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1636-1642.
41. Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3015-3026.
42. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ, Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: immunologic and non immunologic risk factors. *Kidney Int* 1996; 49: 518-524.

43. Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2006; 6: 2006-2012.
44. Chapman JR. Introduction: targets for improving outcomes in renal allografts transplanted during the next ten years. *Transplantation* 2008; 85 (S7): S1-S2.